



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-theses-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>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Romina MASTRONICOLA

**Etude de la dissémination des cellules tumorales liée à l'acte
chirurgical dans les carcinomes épidermoïdes
des voies aérodigestives supérieures**

Le 14 Décembre 2015

Membres du jury :

Rapporteurs :

**Pr. Béatrice BARRY, PU-PH
Pr. Serge EVRARD, PU-PH**

**Hôpital Xavier Bichat-Claude Bernard Paris
Institut Bergonié Bordeaux**

Examineurs :

Pr. Jean-Louis MERLIN, PU-PH

**Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy
Co- Directeur de thèse**

Dr. Gilles DOLIVET, Praticien spécialiste CLCC HDR

**Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy
Directeur de thèse**

Membre invité: Pr. Gilbert FAURE, PU-PH

Centre Hospitalier Universitaire de Nancy

CNRS UMR 7039 CRAN, Département SBS Campus Sciences- BP 70239-54506

VANDOEUVE Cedex

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude envers les membres de mon jury de thèse :

À mon Maître et Directeur de Thèse, Monsieur le Dr Gilles DOLIVET

Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre équipe J'ai le plaisir et l'honneur de travailler depuis 8 ans à l'Institut de Cancérologie de Lorraine tant que praticien spécialiste de CLCC sous votre direction, et je tiens à vous exprimer ma plus sincère gratitude pour vos conseils, votre patience, votre confiance, votre disponibilité et votre bienveillance à mon égard. Vous m'avez appris tout ce que je sais soit dans le domaine de la cancérologie cervico-faciale soit dans le domaine de la biologie moléculaire, ce travail n'aurait jamais pu voir le jour sans vous et votre soutien. Veuillez-trouver ici l'assurance de mon plus profond respect.

À Madame le Professeur Beatrix BARRY

Je vous remercie de me faire l'honneur d'être rapporteur afin de juger mon travail. Merci pour votre gentillesse et pour la qualité de nos échanges au cours des différentes manifestations auxquelles j'ai toujours plaisir à vous rencontrer (depuis mon arrivé en France dans le 2005). Veuillez-trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

À Monsieur le Professeur Serge EVRARD

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Votre présence représente pour moi l'opportunité de voir mon travail jugé dans le domaine de la recherche des cellules tumorales. Je toujours bien aimé les échanges que nous avons eu sur le sujet, depuis la table ronde du Congrès de la Société Française de ORL (2011) Veuillez-trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Jean-Louis MERLIN

Je vous remercie d'avoir accepté d'être le co-directeur de ce travail. Merci puis de m'avoir encadré pour mon Master 2 et donc de m'avoir transmis l'amour pour la recherche de la biologie moléculaire. Je tiens également à vous remercier sincèrement pour vos conseils, votre soutien et votre bienveillance à mon égard durant l'ensemble des années passés dans votre laboratoire. Veuillez-trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

À Monsieur le Professeur Gilbert FAURE

Je vous remercie d'avoir accepté aussi spontanément de juger mon travail. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire, c'est un honneur pour moi de voir mon travail jugé par un expert reconnu dans le domaine des cellules tumorales circulantes. Veuillez-trouver ici l'expression de mon profond respect.

Ensuite, je voudrais témoigner ma plus sincère reconnaissance à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail :

Au Directeur de l'UMR 7039 CRAN, Monsieur le Professeur Didier Wolf

Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans votre laboratoire. Veuillez-trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

À Monsieur le Directeur de l'Institut de Cancérologie de Lorraine, Monsieur le Professeur Thierry Conroy

Je vous remercie de me permettre d'exercer au sein de l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Veuillez-trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

À Madame le Docteur Sophie Cortese

Sophie, je te remercie de m'avoir soutenu et supporté pendant toutes ces années ! Je suis chanceuse de travailler avec toi qui es une personne de grande qualité et sensibilité. Merci pour tes encouragements, ton aide et tes conseils.

À Carole Ramacci

Je te remercie de m'avoir soutenu et supporté pendant toutes ces années ! Je suis chanceux de travailler avec toi. Je suis heureuse de pouvoir travailler et échanger avec toi jour après jour.

À Julia Salleron

Je te remercie sincèrement pour tes compétences professionnelles et humaines ainsi que pour toute l'aide que tu m'as apportée pour traiter l'aspect statistique de ce travail.

À mon mari Marco

Je te remercie pour ton amour et ton inconditionnel soutien depuis toujours. MERCI

Avant-Propos

Ce travail de thèse a été effectué durant les quatre dernières années pendant mon travail de chirurgien cervico-faciale à l'Institut de Cancérologie de Lorraine, au sein de l'unité de recherche CNRS UMR 7039 CRAN, Université de Lorraine.

Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications :

Périodiques internationaux à comité de lecture

[1] Detection of disseminated tumor cells in aspirative drains after neck dissection

Mastronicola R., Berteau C., Tu Q., Cortese S., Guillet J., Phulpin B., Gangloff P., Bezdetnaya L., Melin JL, Faure G., Dolivet G.

Eur Arch Otorhinolaryngol. 2015 Jan 30.

Communications orales :

[1] Detection of tumoral cells during head and neck surgery"

Mastronicola R., Cortese S., Phulpin B., Merlin J-L, Gillon V., Dolivet G.

Congrès 20 th IFOS, Séoul 1-5 juin 2013

[2] Journée d'échanges sur la Recherche en Cancérologie en Lorraine 26-09-2014

R. Mastronicola

Recherche des cellules tumorales circulantes liées à l'acte chirurgical dans les cancers épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures (VADS) de stades III et IV. Etude préliminaire.

[3] Congrès SFORL 11-13 octobre 2014 Recherche des cellules tumorales circulantes dans les rédons après curage cervical.

R. Mastronicola , C.Berteau , Q.Tu , J.Merlin , G.Faure , G.Dolivet.

[4] Congrès de la SFCCF 4-5 Décembre 2014 Montpellier :

Communication orale : Recherche des cellules tumorales circulantes dans les cancers de l'oropharynx stade III et IV

R.Mastronicola, S.Cortese, JL Merlin, G .Faure, G.Dolivet

[5] Congrès SFORL 10-12 octobre 2015 Paris

Recherche des cellules tumorales circulantes liées à l'acte chirurgical dans les cancers épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures (VADS) de stades III et IV. Résultats sur 40 patients

R.Mastronicola, S. Cortese, V. Gillon, JL Merlin, G. Faure, G. Dolivet

Communications Affichées :

[1] Tumoral Cells Detection In Cervical Drain After Head And Neck Surgery

5th World Congress IFHNOS in New York from July 26-30, 2014.

Romina Mastronicola, Sophie Cortese, Berengere Phulpin, Caroline Berteau, Julie Guillet, Quin Tu, Veronique Gillon, Gilbert Faure, Gilles Dolivet

Table des matières

Remerciements.....	
Avant Propos.....	
Liste des figures et tableaux.....	
Liste des abréviations.....	
Introduction générale.....	1
Généralités sur les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS)	3
Epidémiologie et facteurs de risque	4
Modalités thérapeutiques	4
Chapitre I	8
1.1 Introduction bibliographique et objectifs du travail	9
1.1.1 Introduction	9
1.1.2 Caractéristiques des cellules souches par rapport à la dissémination tumorale.....	10
1.1.3 Caractéristiques des cellules souches par rapport à la dormance et aux métastases	12
1.1.4 Caractéristiques des cellules souches par rapport à la formation de métastases cliniquement manifestes	13
1.1.5 Conséquences thérapeutiques et perspectives des cellules souches cancéreuses migrantes	15
1.2 Marqueurs tumoraux.....	17
1.2.1 CEA.....	17
1.2.2 SCCA	18
1.2.3 Ep-CAM	19
1.2.4 EphB4	20
1.2.5 CK 17 18 19.....	21
1.2.6 EGFR	22
1.2.7 PVA	23
1.2.8 Elf 3.....	24
1.3 Le processus métastatique lié à l'acte chirurgical	25
1.3.1 Les Cellules Tumorales Circulantes (CTCs)	26
1.3.2 L'intérêt diagnostique	26
1.3.3. L'intérêt pronostique	27

1.3.4. L'intérêt dans le suivi du patient	27
1.4. La détection des CTCs	28
1.4.1. Les techniques d'immunomarquage.....	28
1.4.2. La biologie moléculaire.....	28
1.4.3. Les systèmes industriels	30
Chapitre II	31
2.1 Procédure sentinelle et cancers des VADS.....	32
2.1.1 Principe technique.....	35
2.1.2 Méthodes d'analyse du GS	37
2.2 La biologie moléculaire.....	38
2.2.1 Les marqueurs biologiques tumoraux	38
2.2.2 Techniques de détection des marqueurs	39
2.2.2.1 La PCR quantitative en temps réel.....	39
2.2.2.2 La méthode OSNA®: One-step nucleic acid amplification.....	40
2.3 Hypothèses et objectifs de l'étude.....	44
2.4 Matériels et méthodes	45
2.4.1 Type d'étude.....	45
2.4.2 Pré requis à l'étude	45
2.4.3 Les marqueurs moléculaires	46
2.4.4 Population.....	46
2.4.5 Traitement des échantillons	48
2.4.5.1 Méthode de prélèvement.....	48
2.4.5.2 Méthode de préparation et de conservation des échantillons.....	48
2.5 Méthodes d'analyse des échantillons.....	49
2.5.1 Analyse en qRT-PCR.....	49
2.5.2 Analyse en OSNA®	52
2.6 Résultats.....	54
2.6.1 Validation des amorces étudiées.....	54
2.6.2 Résultats de l'analyse en qRT-PCR (Annexe 7)	54
2.6.2.1 Analyse globale de l'expression des différents marqueurs dans la population étudiée.	54
2.6.2.2 Niveau d'expression des marqueurs dans le ganglion bénin et la glande salivaire (Figure 8)	55
2.6.2.3 Profil d'expression individuel des marqueurs	57

2.7 Résultats obtenus en OSNA.....	60
2.8 Discussion	61
2.9 Conclusion.....	65
Chapitre III	66
3.1 Recherche des cellules tumorales disséminées dans les drains de Redon après curage cervical	67
3.2 Introduction.....	67
3.3 Patients et méthodes.....	68
3.4 Résultats.....	68
3.5 Conclusion.....	69
Chapitre IV	75
4 Recherche des cellules tumorales circulantes après acte chirurgical pour carcinomes epidermoïdes des VADS stade III et IV	76
4.1 Hypothèse de travail et objectifs du travail.....	76
4.2 Patients et méthodes.....	77
4.2.1 Le matériel biologique	78
4.2.2 Mesure de la concentration en ARN totaux extrait	78
4.2.3 RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) en temps réel	79
4.2.4 CellSearch	81
4.2.5 Analyse Statistique	83
4.3 Résultats.....	84
4.3.1 Les résultats pour la technique qRT- PCR par marqueurs	85
4.3.1.1 CEA	85
4.3.1.2 EphB4	85
4.3.1.3 CK18.....	86
4.3.1.4 Ep-CAM	87
4.3.1.5 PVA.....	87
4.3.1.6 Elf3.....	88
4.3.1.7 CK 19	88
4.3.1.8 EGFR.....	89
4.3.1.9 SCCA.....	89
4.3.1.10 GAPDH	90

4.3.2 CTC avec cell search.....	90
4.4 Discussion et perspectives	93
4.4.1 Discussion.....	93
4.4.2 Perspectives	96
Chapitre V	97
5 Conclusion générale	98
Annexes	101
Références bibliographiques.....	152

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Localisation des cancers des voies aérodigestives supérieures

Figure 2 : Systématisation des aires ganglionnaires cervicales

Figure 3 : Méthodes de détection du GS

Figure 4 : La PCR en temps réel – Quantification

Figure 5 : Principe de la RT-LAMP

Figure 6 : Préparation des échantillons pour OSNA®

Figure 7: Niveau d'expression moyen des marqueurs dans la tumeur primitive, le ganglion métastatique et le tissu sain péri tumoral

Figure 8: Niveau d'expression moyen des marqueurs au sein du ganglion bénin et de la glande salivaire

Figure 9: Profil d'expression individuel des marqueurs au niveau de la tumeur primitive , du ganglion métastatique et du tissu sain péri tumoral

Figure 10 Protocole utilisé

Figure 11 CellTracks Analyser

Figure 12 CellTracks Autoprep

Figure 13 Résultats CEA

Figure 14 Résultats EphB4

Figure 15 Résultats CK18

Figure 16 Résultats Ep-CAM

Figure 18 Résultats Elf3

Figure 19 Résultats CK19

Figure 20 Résultats EGFR

Figure 21 Résultats SCCA

Figure 22 Résultats GAPDH

Figure 23 Image de CTC avec la méthode CellSearch

Figure 24 Résultats CTC CellSearch

Figure 25 Résultats EGFR CellSearch

Tableau 1: Niveaux ganglionnaires cervicaux

Tableau 2 : Représentation des résultats en OSNA®

Tableau 3 : Caractéristiques anatomopathologiques de la population

Tableau 4 : Résultats en OSNA®

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ARNm: Acide Ribonucléique messenger

BDL :Base de langue

CD: Cluster of Differentiation

CEA: carcinoma embryonnaire antigen

CEVADS : Carcinome epidermoïde des voies aéro-digestives supérieures

CK : Cytokeratine

CS-IHC :Immunohistochimie

CSCs: cellules souches du cancer

CTCs : Cellules Tumorales Circulantes

DAPI : 4', 6diamidin-2-Phénylindole

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

DTCs : Cellules tumorales disséminées

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tetra Acétique

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

Elf 3: marqueurs E74-like3

EMT: Cellules à transition épithéliale-mésenchymateuse

Ep-CAM: Epithelial Cellular Adhesion Molecule

EphB4: Ephrin-type B recetor 4

GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GS: Ganglion sentinelle

HMLEM : Cellules épithéliales mammaires transformées

HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Ig: Immunoglobuline

MA:Macrométastases

MET : Cellules à transition mésenchymateuses-épithéliales

MI :Micrométastase

ORL: Oto-Rhino-Laryngologie

OSNA: one-step nucleic acid amplification

PCR: Polymerase Chain Reaction

PVA: Pemphigus vulgaris antigen

RCP :réunion de concertation pluridisciplinaire

ROS : Réactive oxygène species

RT -PCR: Reverse Transcriptase Polymérase Chain Reaction

RT-LAMP :Reverse trascription loop-mediated isothermal amplification

SCCA:Squamous cell carcinoma antigen

UICC: Union internationale contre le cancer

5 FU : 5 Fluoro-uracile

Introduction générale

Le cancer représente actuellement la première cause de mortalité en France chez les personnes âgées de 45 à 75 ans. En 2012, il a été enregistré 148 000 décès par cancer en France soit 85 000 chez l'homme et 63 000 chez la femme.

Chez la femme, la première cause de décès par cancer est le cancer du sein (11 886 décès), suivi du cancer colorectal (8 000 décès) et le cancer du poumon (6 300 décès). Ces trois types de cancers représentent 43% de la mortalité par cancer chez la femme.

Le cancer de la prostate se situe au 1^{er} rang des cancers chez l'homme, (8 876 décès) par cancer de la prostate. En deuxième le cancer du poumon est cause de mortalité chez les hommes (22 000 décès). En troisième position vient le cancer colorectal avec 9 000 décès et enfin le cancer de la prostate (8 900 décès). Cela représente 45% de la mortalité par cancer chez l'homme.

Depuis 1950, l'évolution de la mortalité à âge égal est différente entre les hommes et les femmes. En effet, chez les hommes, elle a augmenté fortement jusqu'en 1989 et diminué nettement depuis, à raison de 1,5% par an. Ainsi, en 2012, elle a atteint le niveau observé en 1957. Chez la femme, la mortalité diminue depuis 1963 de 0,6% par an. Cette diminution est observée entre autre, par l'augmentation des campagnes de prévention et des dépistages automatiques. Il a été observé 74% d'augmentation des diagnostics de cancer du sein. La mortalité par cancer diminue régulièrement pour les deux sexes confondus et pour la plupart des cancers grâce à la prévention mise en place depuis de nombreuses années. De ce fait, l'incidence c'est-à-dire le nombre de nouveaux diagnostics de cancer dans l'année divisé par l'effectif de la population est en augmentation. En effet, l'incidence du cancer de la prostate a été multipliée par quatre alors que la mortalité diminue de 2% par an. Pour conclure, l'incidence est indépendante des progrès thérapeutiques alors, qu'au contraire, la mortalité diminue avec l'efficacité des traitements (Guérin S., 2009).

Généralités sur les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS)

Ces cancers regroupent l'ensemble des cancers de la cavité buccale, du pharynx, du larynx et des sinus de la face (Figure 1). La classification clinique est le **T**, **N**, **M** selon l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) (Annexe 1).

T : taille de la tumeur primitive, **N** : l'extension ganglionnaire, **M** : métastase.

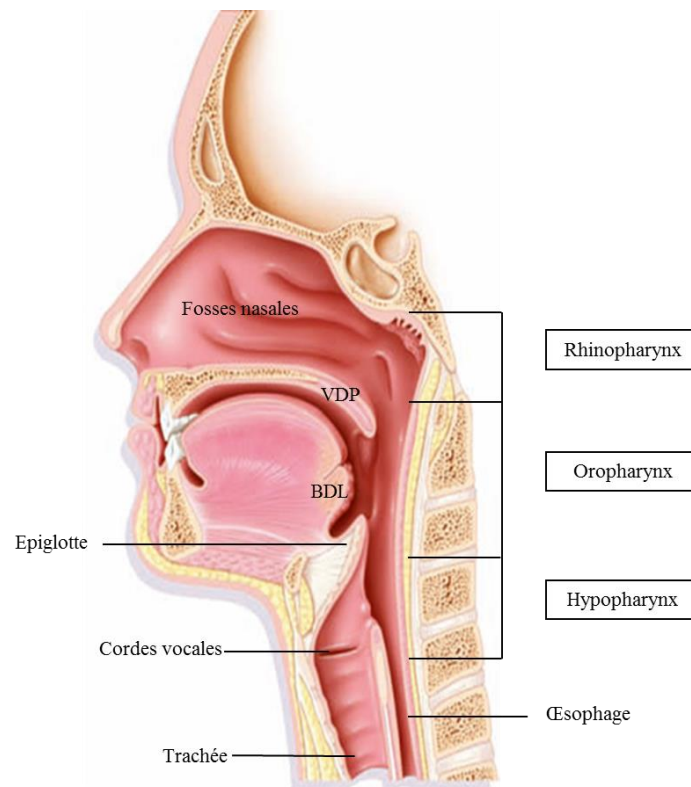


Figure 1 : Localisation des cancers des voies aéro-digestives supérieures
Voile du palais (VDP), base de langue (BDL)

Epidémiologie et facteurs de risque

On dénombre, en France, environ 17 000 nouveaux cancers des VADS par an et 10 500 décès. Notre pays est au premier rang européen pour ces cancers qui représentent un véritable problème de santé publique.

Les principaux facteurs de risque reconnus sont le tabac et l'alcool qui agissent en synergie et sont responsables de plus de 90% des cancers des VADS. Parmi les autres causes habituellement incriminées on retrouve l'exposition à certaines substances chimiques (le chrome, l'amiante, les hydrocarbures), aux virus (HPV 16 et 18) et une mauvaise hygiène buccale.

Ces cancers sont majoritairement représentés par des carcinomes épidermoïdes (90%). Les autres étiologies (lymphomes malins non-Hodgkiniens, sarcomes, carcinomes glandulaires...) sont beaucoup plus rares.

Modalités thérapeutiques

- La chirurgie

Généralement réalisée en première intention, elle occupe une place majeure dans l'arsenal thérapeutique. Les marges d'exérèse tumorale doivent être macroscopiquement d'au moins 1 cm. Un examen histologique extemporané permet de s'assurer en per-opératoire de la qualité de l'exérèse chirurgicale. En cas de résection importante, la réparation de la perte de substance est assurée par des lambeaux (pédiculés ou libres). Un curage ganglionnaire cervical est systématiquement réalisé dans le même temps opératoire.

- La radiothérapie

Elle est réalisée le plus souvent sous forme de radiothérapie externe et concerne la tumeur et les aires ganglionnaires. La dose totale délivrée est de 55 à 70 Grays.

L'autre modalité de la radiothérapie est la curiethérapie interstitielle qui utilise des fils à l'iridium 192 implantables. Ses principales indications sont représentées par les cancers de la cavité buccale et de l'oropharynx.

- La chimiothérapie

Le 5 Fluoro-uracile (5 FU) et les dérivés du platine (cisplatine ou carboplatine) sont les principales molécules utilisées. La radiochimiothérapie concomitante est proposée en cas de tumeur évoluée ou de facteurs histopronostiques défavorables. La chimiothérapie peut être utilisée en induction dans les protocoles de préservation laryngée. Son efficacité en tant que traitement adjuvant seul n'a jamais fait sa preuve.

- La thérapie ciblée

La principale molécule développée dans les cancers des VADS est le cetuximab (Erbix®) il s'agit d'un anticorps monoclonal spécifique de l'EGFR (Epidermal growth factor receptor) qui est surexprimé dans plus de 90% des cancers des VADS (Kalyankrishna and Grandis 2006).

La cancérogénèse est l'ensemble des mécanismes aboutissant à la formation et au développement de cancers.

Dans un tissu sain, il existe un équilibre entre la prolifération cellulaire et l'élimination des cellules soit par apoptose, soit par sénescence, c'est l'homéostasie tissulaire.

Cet équilibre est perturbé lors du processus de transformation néoplasique soit par une augmentation de la prolifération cellulaire, soit par une inhibition de la mort cellulaire.

La transformation cellulaire maligne est un processus conduisant une cellule de phénotype normal à une cellule transformée suite à l'accumulation de mutations non réparées. Ceci permet à la cellule initiée d'acquérir de nouvelles propriétés lui permettant de proliférer en échappant aux systèmes de contrôle du cycle cellulaire (systèmes de

réparations de l'ADN par exemple). Les cellules transformées possèdent alors plusieurs caractéristiques comme la capacité de proliférer en absence de facteurs de croissance car elles sont capables de synthétiser leurs propres facteurs par une stimulation autocrine. Mais aussi, la perte d'inhibition de contact, de nécessité de support d'ancrage. Elles sont également insensibles aux facteurs antiprolifératifs, de ce fait, elles ont un potentiel illimité de réplication et une résistance à l'apoptose.

Pour passer d'un état bénin à un état de prolifération maligne, les cellules tumorales subissent de nombreuses altérations génétiques qui interagissent afin de leur permettre d'atteindre le phénotype tumoral complet. La transformation maligne fait intervenir des proto-oncogènes qui acquièrent le statut d'oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs inactivés. Ceci résulte des phénomènes de mutations ponctuelles, d'amplification génique et de délétions. De plus, des événements épigénétiques interviennent dans la dérégulation de l'expression des gènes.

Les oncogènes sont des gènes qui stimulent l'acquisition du phénotype malin par une cellule. Ce sont des gènes qui exercent une pression positive sur la prolifération (effets angiogéniques) et protègent la cellule du phénomène d'apoptose. Mais il s'agit également de gènes qui favorisent la dissémination cellulaire. Il y a différents types d'oncogènes codant des récepteurs membranaires ou encore impliqués dans les voies de signalisation.

Les gènes suppresseurs de tumeurs interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires, entre autre le maintien du cycle cellulaire et de l'intégrité du génome, l'apoptose, la différenciation cellulaire, la transcription et la transduction du signal. Des mutations germinales ou somatiques au niveau de ces gènes engendrent leur perte d'expression et favorisent l'oncogenèse. La plupart des cancers sont sporadiques ; il s'agit d'une succession d'événements mutationnels spontanés et isolés touchant une cellule unique. La tumeur dérive de la division de cette cellule tumorale. Seule une faible proportion de cancers trouve une origine dans une anomalie constitutionnelle ou germinale de l'ADN.

Il a été vu que les cellules tumorales acquièrent de nombreuses propriétés leur permettant de proliférer de façon anarchique. Elles sont également capables par sécrétion autocrine de facteurs pro-angiogéniques, entre autre, de se détacher du site primaire. Ainsi, ces cellules peuvent former, à distance de la tumeur primitive, des foyers tumoraux .

Mon travail de thèse se porte sur la thématique de la dissémination des cellules tumorales en période péri-chirurgicale dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou de stade avancé.

Les travaux sur cette thématique se sont déclinés en trois protocoles expérimentaux visant à déterminer la présence ou la variation de la concentration des cellules tumorales dans des sites ganglionnaires cervicaux et sanguins.

- 1) Etude des marqueurs moléculaires pour le diagnostic d'envahissement ganglionnaire des carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures réalisée par PCR quantitative en temps réel et en OSNA.
- 2) Recherche des cellules tumorales disséminées dans les drains de Redon après curage cervical
- 3) Recherche des cellules tumorales circulantes après acte chirurgical pour carcinomes épidermoïdes des VADS stade III et IV.

Chapitre I

Introduction bibliographique et objectifs du travail

1.1 Introduction bibliographique et objectifs du travail

1.1.1 Introduction

La plupart des tumeurs solides sont des cancers épithéliaux de type cancer de sein, poumon, côlon, prostate et ovaire. Ils représentent environ 80 % de l'intégralité des cancers (Visvader et Lindeman, 2008). Cependant, plus de 90 % de la mortalité des patients atteints est attribuée à la propagation des cellules cancéreuses aux tissus éloignés (Weigelt et al., 2005; Jemal et al., 2006; Steeg, 2006). On imagine bien que la menace de la récurrence tumorale, même après radio et/ou chimiothérapie, reste réelle. Dans le cancer du sein, par exemple, les métastases peuvent survenir même après des décennies exemptes de maladie (Meltzer, 1990; Uhr et coll., 1997). Ce phénomène est appelé la dormance tumorale clinique et est fréquemment observé chez les patients cancéreux. Les observations cliniques et des modèles expérimentaux ont révélé que, chez certains patients atteints de cancer, des centaines de milliers de cellules cancéreuses peuvent être disséminées dans la circulation, et qu'une petite partie seulement peut évoluer vers la forme clinique de métastases (Tarin et al., 1984; Weiss, 1990, 1992).

La formation d'une métastase est un processus en plusieurs étapes. Il est bien établi que les cellules cancéreuses capables de métastases acquièrent un phénotype du genre : transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) leur permettant de diffuser la tumeur primitive et de s'introduire dans la circulation. Une fois en circulation, les cellules cancéreuses disséminées, doivent survivre et, si possible, envahir d'autres tissus. Enfin, le peu de cellules qui sont capables de s'adapter au microenvironnement, forment des macrométastases. L'évidence expérimentale a démontré qu'au cours de cette première étape de formation (introduction, survie, arrestation et extravasation), les cellules métastatiques peuvent être très efficaces (Cameron et al., 2000; Suzuki et al., 2006).

Toutefois, il faut noter que seul un petit sous-ensemble de ces cellules (environ 2 %) peut déclencher la croissance de micrométastases, et une plus petite fraction cellulaire encore (~ 0,02 %) est capable de persister et de former des macrométastases (Cameron et al., 2000; Chambers et al., 2000, 2001; Suzuki et al., 2006). Par conséquent, les dernières étapes de formation semblent être les étapes les plus critiques de la dormance métastatique.

Malgré l'importance clinique des métastases, les mécanismes qui sous-tendent le processus de dormance et de croissance des macrométastases restent mal compris.

Beaucoup de preuves suggèrent qu'une sous-population de cellules tumorales possède des propriétés de prolifération des cellules souches caractéristiques, et est capable d'initiation tumorale, de croissance invasive et de diffusion à des organes éloignés (Reya et coll., 2001; Li et al., 2007; Liu et al., 2010; Marotta et Polyak, 2009; O ' Brien et al., 2009). Ces cellules souches du cancer (CSCs) ont la capacité de se renouveler pour donner lieu à d'autres cellules cancérogènes, et de se différencier pour donner naissance à des cellules cancéreuses non cancérogènes, phénotypiquement diversifiées. Plusieurs caractéristiques des CSCs, y compris la plasticité phénotypique, les rendent plus susceptibles d'arriver au terme des étapes ultérieures de la formation métastatique.

Ce chapitre a pour objectif de mettre en évidence les caractéristiques spécifiques des cellules souches relatives aux métastases cancéreuses, et les implications de la théorie de la CSCs sur les stratégies thérapeutiques contre les métastases.

1.1.2 Caractéristiques des cellules souches par rapport à la dissémination tumorale

Il est bien établi que certaines cellules cancéreuses peuvent être l'objet d'une transformation de type EMT, développant ainsi un phénotype migrateur capable de se détacher de la tumeur primitive (Kang et Massague, 2004; Micalizzi et coll., 2010; Gomes et al., 2011; Nauseef et Henry, 2011; Dit et Williams, 2011; Yao et al., 2011). L'EMT est un processus biologique qui permet aux cellules épithéliales de subir de multiples transformations biochimiques, leur conférant un phénotype de cellules mésenchymateuses avec une forte capacité de migration et d'invasivité, une résistance élevée à l'apoptose et une production importante de composantes extra-cellulaires (Jean-Jacques, 2009; Yilmaz et Christofori, 2009).

Il est supposé que les CSCs sont la sous-population diffusant. En effet, de nombreuses preuves vont dans ce sens puisque les CSCs expriment aussi des marqueurs EMT et, plus important encore, l'induction de l'EMT dans les cellules épithéliales transformées favorise la

génération de CSCs (Yang et al., 2004; Mathieu et al., 2008; Plancher et al., 2011; Jordan et al., 2011; Wu, 2011; Wu et Yang, 2011; Krantz et al., 2012).

Par exemple, dans le cancer du côlon, l'accumulation nucléaire de β -caténine, signalant l'activation de la caractéristique des cellules souches, se retrouve sur le front invasif de la tumeur primitive (Fodde et Brabletz, 2007). Des cellules similaires aux cellules souches isolées dans les glandes mammaires normales et dans les cancers du sein expriment aussi des marqueurs de l'EMT (Damonte et coll., 2007; Mathieu et al., 2008). Des cellules tumorales type souches du cancer du sein, isolées des cellules cancéreuses et exposées aux cycles de l'hypoxie et de la réoxygénation, montrent également une augmentation de plusieurs facteurs induisant EMT (Louie et al., 2010).

La surexpression de facteurs de transcription induisant EMT, comme Snail ou Twist, dans les cellules épithéliales mammaires transformées (HMLEM) a augmenté la fréquence de déclenchement des tumeurs chez les souris immunodéficiences (Mathieu et al., 2008). De la même façon qu'au moment de la programmation embryonnaire de l'EMT, l'activation de la signalisation EMT dans les CSCs est aussi réglée par une boucle de feed-back réciproque entre la famille ZEB d'inducteurs d'EMT et la famille miR-200 de suppresseurs d'EMT (Hurteau et coll., 2007; Burk et coll., 2008; Gregory et al., 2008; Korpál et al., 2008; Park et al., 2008), ainsi qu'une deuxième boucle de feed-back réciproque entre miR-34, suppresseur d'EMT et Snail, inducteur d'EMT (Kim et al., 2011. Siemens et al., 2011). Associées, ces observations soutiennent le modèle des CSCs migrantes, qui leur confère la plasticité de commuter entre les états cellulaires et de se détacher efficacement de la tumeur primitive.

1.1.3 Caractéristiques des cellules souches par rapport à la dormance et aux métastases

En plus du renouvellement automatique et du phénotype de l'EMT, les CSCs présentent d'autres propriétés des cellules souches qui leur servent à s'adapter au microenvironnement étranger et éventuellement, à donner des manifestations cliniques de métastases.

Il paraît évident que, parmi leurs propriétés propres, celle d'assurer la longévité des cellules souches normales peut contribuer à la protection des CSCs dans le microenvironnement défavorable. Par exemple, les cellules souches normales ont une capacité de réparation de l'ADN plus importante et expriment des niveaux plus élevés de protéines anti-apoptotiques que les cellules différenciées (Cairns, 2002; Potten et al., 2002; Wang et al., 2003; Parc et Gerson, 2005; S et al., 2006). Une fois que les cellules tumorales disséminées sont dans le nouveau microenvironnement, l'organe cible peut former une barrière pour freiner la progression des métastases et induire la dormance. En effet, les propriétés anti-apoptotiques et les capacités de réparation de l'ADN des CSCs pourraient augmenter la survie des CSCs pendant une longue période dans l'organe cible, sous l'effet d'un stress métabolique et/ou d'autres stress environnementaux (comme l'hypoxie), leur permettant de trouver des solutions d'adaptation.

Pour prouver cette hypothèse, on peut s'appuyer sur plusieurs études qui montrent que les CSCs sont notamment capables de résister aux médicaments. Par exemple, il a été démontré que cette sous-population de cellules tumorales type souches exprime des niveaux élevés de transporteurs de cassette de liaison d'ATP (ABC), ce qui peut modifier activement les effets des médicaments et protéger ces cellules des effets nocifs de l'agression chimiothérapeutique (Pardal et coll., 2003; Lou et Dean, 2007; Dean, 2009; Donnenberg et al., 2009; Ding et al., 2010; Moitra et al., 2011).

Les CSCs présentent également une résistance intrinsèque à l'apoptose. Par exemple, on a montré que la production autocrine de cytokines telles que IL-4 augmente le taux de protéines anti-apoptotiques et induit une résistance à la thérapie et à la cytotoxicité induite par le traitement de différents types de cancers (Conticello et al., 2004). Pour les patients atteints de cancer du côlon, il a été montré que l'antagoniste d'IL-4 améliore fortement

l'efficacité anti-tumorale des chimiothérapies conventionnelles par le biais d'une sensibilisation sélective des CSCs du côlon qui sont CD133+ (Todaro et coll., 2007). Il semble de plus en plus clair aussi que les CSCs sont naturellement résistantes aux radiations (Koepke, 2006; Rich, 2007; Debeb et al., 2009; Pajonk et coll., 2010; Croker et Allan, 2012; Andrea, 2012). Par exemple, l'efficacité de la radiothérapie est modifiée par l'induction d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). Toutefois, il a été constaté, tant chez l'homme que chez la souris, que les CSCs mammaires présentent un niveau faible de ROS par rapport aux cellules tumorales différenciées, et que leur ADN est moins endommagé par les radiations (Diehn et al., 2009). Le plus faible niveau de ROS dans les CSCs semble résulter d'une expression accrue du système d'élimination des radicaux libres. (Diehn et al., 2009; Wang et al., 2010; Kobayashi et Suda, 2012; Shi et al., 2012).

Les preuves expérimentales et les observations cliniques montrent donc que la résistance aux médicaments est apparemment plus élevée dans la maladie métastatique. Plus important encore, la propriété intrinsèque de pharmacorésistance des CSCs peut, en réponse au stress, les protéger et leur permettre de persister dans les tissus étrangers pendant une longue période.

1.1.4 Caractéristiques des cellules souches par rapport à la formation de métastases cliniquement manifestes

Il a été observé qu'une forte proportion de métastases formées à distance est différenciée, et que dans certains cas, les métastases peuvent montrer un niveau de différenciation cellulaire plus important que les tumeurs primitives. Par exemple, dans les prélèvements de patients humains, une expression augmentée de E-cadhérine a été observée dans les métastases par rapport aux tumeurs primaires (Oka et al., 1993; Kowalski et coll., 2003; Chao et al., 2010).

Par ailleurs, l'importance du phénotype épithélial dans la formation de tumeurs secondaires a été démontrée dans plusieurs cas différents, dont le cancer de la vessie (Chaffer et al., 2005, 2006, 2007), le cancer de la prostate (Oltean et al., 2006; Yates et coll., 2007), le cancer colorectal (Vincan et al., 2007) et le cancer du sein (Tsuji et al., 2008, 2009; Chao et al., 2010). L'expérience clinique et l'évidence expérimentale ont prouvé

communément la nécessité de transformation des cellules disséminées cancéreuses de mésenchymateuses à épithéliales (MET) dans le microenvironnement secondaire pour former des macrométastases.

Par conséquent, on suppose que les cellules métastatiques possèdent une plasticité phénotypique, acquérant le phénotype type EMT pour diffuser à partir de la tumeur primitive dans un premier temps et par la suite, se modifiant à l'état de type MET afin de faciliter la formation des tumeurs métastatiques dans les organes cibles (Brabletz, 2012).

Toutefois, nous ne savons pas si les cellules cancéreuses type souches EMT (CSCs) coopèrent avec des cellules cancéreuses non-EMT pour coloniser les organes cibles, ou si les CSCs maintiennent un phénotype de cellules fusionnées avec des caractéristiques épithéliales incomplètes ou mixtes et s'adaptent ultérieurement dans le microenvironnement étranger. Par exemple, Tsuji et coll. (2008) ont montré que les cellules cancéreuses avec un état induit EMT augmentent localement dans la tumeur primitive, mais ne parviennent pas à promouvoir la colonisation lointaine lorsqu'elles sont introduites dans la circulation.

En outre, une co-culture d'hépatocytes et de cellules cancéreuses de la prostate de type souches EMT a entraîné une augmentation de la E-cadherin dans ces cellules (Yates et coll., 2007). Nous avons également constaté que les cellules métastatiques du cancer du cerveau et du sein utilisent le métabolisme oxydatif, similaire à celui des cellules épithéliales normales, contrairement au métabolisme glycolytique utilisé par les cellules cancéreuses type EMT du sein pour une prolifération rapide (Chen et al., 2007).

De surcroît, la niche métastatique peut également fournir des facteurs extrinsèques influençant la prolifération et l'état cellulaire des cellules cancéreuses métastatiques. La prolifération des CSCs disséminées dans les organes cibles peut être régulée par des facteurs suppresseurs de croissance et stimulateurs de croissance sécrétés par ou dans le microenvironnement. Par exemple, une seule cellule cancéreuse dormant ou une micro-métastase dormant, peut se transformer en une métastase cliniquement décelable par l'intermédiaire d'une augmentation de la sécrétion de facteurs angiogéniques dans la niche métastatique dont le but est de favoriser le recrutement et la formation de nouveaux

vaisseaux sanguins (angiogenèse ; Takahashi et Mai, 2005; Gao et al., 2008; Raza et coll., 2010; Saharinen et al., 2011; Garcia et Kandel, 2012).

Il a été rapporté que les CSCs promeuvent l'angiogenèse tumorale en favorisant la sécrétion active de facteurs angiogéniques comme le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF ; Bao et al., 2006; Seton-Rogers, 2011).

En plus des facteurs sécrétés, les interactions cellule-cellule dans le microenvironnement peuvent également créer une protection des CSCs disséminées dans la niche métastatique. Par exemple, il a été démontré que les cellules souches mésenchymateuses (CSMs), lorsqu'elles sont cultivées conjointement aux cellules du cancer du sein, induisent la production de cellules T régulatrices (Tregs) permettant de subversion immunitaire des cellules mammaires cancéreuses dans la moelle osseuse (Patel et al., 2010).

En outre, il a été démontré que les CSMs de la moelle osseuse pourraient favoriser l'expansion de la population des CSCs dans le système de co-culture et accélérer la croissance de la tumeur dans le modèle de xénogreffe de souris (Liu et al., 2011). Donc, les interactions entre les CSCs diffusées et les MSCs associées aux tumeurs peuvent jouer un rôle en empêchant l'élimination des cellules cancéreuses par la réponse immunitaire physiologique anti-tumorale dans le microenvironnement métastatique.

1.1.5 Conséquences thérapeutiques et perspectives des cellules souches cancéreuses migrantes

La présence de caractéristiques des cellules souches chez les cellules tumorales circulantes et disséminées a une importance clinique dans la formation de métastases et de récidives, mais aussi dans la résistance aux traitements anticancéreux conventionnels. Les propriétés des cellules type souches des CSCs ont démontré leur rôle dans la protection contre l'environnement et le stress génotoxique.

La plasticité phénotypique des CSCs et leurs capacités anti-apoptotiques intrinsèques peuvent potentiellement les rendre capables de naviguer au sein de toute la cascade métastatique. Il est évident que les stratégies thérapeutiques actuelles ne tiennent pas compte des différences moléculaires et prolifératives potentielles entre les différentes sous-

populations de cellules tumorales. Ceci peut expliquer la raison pour laquelle la plupart des thérapies échoue dans le traitement des patients atteints de maladies métastatiques. Le modèle des CSCs a également des implications importantes en ce qui concerne la progression du cancer.

On observe notamment que la rémission tumorale s'obtient de plus en plus difficilement au fur et à mesure des rechutes de la maladie métastatique, et que le taux de survie des patients atteint de maladie métastatique se réduit significativement.

Ceci suggère que la population des cellules tumorales devient de plus en plus agressive au fil du temps, ce qui est en rapport avec l'apoptose sélective des cellules non-oncogènes et la résistance des cellules tumorales aux traitements.

En effet, les preuves expérimentales accumulées ont confirmé cette théorie et démontré l'avantage potentiel de cibler sélectivement la sous-population de cellules type souches dans la prévention de la progression du cancer (Gupta et al., 2009; Newman et al., 2012). Cependant, il existe d'autres modèles alternatifs aux CSCs, en effet, il existe aussi des preuves suggérant que les CSCs peuvent ne pas être le seul type de cellules à soutenir la croissance tumorale et à générer des métastases (Kelly et al., 2007; Yoo et Hatfield, 2008).

Malgré l'origine controversée ou la source des sous-populations type cellules souches, il est clair qu'une meilleure définition et compréhension des CSCs en dormance tumorale clinique, mais aussi en cas de rechute du cancer, auront un impact significatif sur la mortalité des patients à un stade avancé du cancer.

1.2 Marqueurs tumoraux

Les marqueurs tumoraux sont des molécules libérées dans le sang ou dans les urines par les cellules cancéreuses. Ils correspondent généralement à des molécules formées en petites quantités par des cellules normales mais qui se retrouvent produites en excès par les cellules tumorales, hyperactives. Ainsi, la concentration de ces marqueurs est généralement corrélée au nombre de cellules cancéreuses. Selon la nature du cancer, il existe un ou plusieurs marqueurs tumoraux. Certains sont communs à plusieurs types de tumeurs, d'autres sont très spécifiques à un cancer en particulier.

L'enjeu serait de trouver des cibles spécifiques qui permettraient de s'assurer du caractère tumoral de cellules distinctes. D'après Tong X., 2007, il serait intéressant de rechercher en RT-PCR les transcrits d'ARNm de SCCA (pour Squamous Cell Carcinoma Antigen), de différentes cytokératines et d'EGFR simultanément. Deux autres auteurs, Xi L. (2007) et Hashimoto T. (2008), ont montré que la détection, par RT-PCR, de transcrits d'ARNm de CEA aurait un intérêt dans les CEVADS car il n'est exprimé que par les cellules tumorales. Ils citent également SCCA, CK19 et EGFR.

En s'inspirant à ces travaux et aussi aux travaux de Sinha (2003,2006), nous nous sommes intéressés à 9 marqueurs pour leur implication dans la cancérogénèse, leur capacité à l'adhésion cellulaire, à la migration cellulaire.

1.2.1 CEA

L'antigène carcinoembryonnaire CEA, acronyme de l'Anglais Carcino-Embryonic Antigen, est une glycoprotéine avec un poids moléculaire approximatif de 210.000 daltons. Il est produit par les cellules fœtales de l'appareil digestif principalement, du foie et du pancréas, pendant les deux premiers trimestres de gestation essentiellement. Le CEA présente une spécificité moléculaire immunologique différente selon les tissus dans lesquels il est synthétisé, ceci à cause de variations dans le composant glucidique de la molécule. Plus qu'une macromolécule unique, on parle d'un pool de molécules hétérogènes. Chez l'adulte, d'infimes quantités de CEA sont secrétées par les cellules du côlon, du parenchyme pulmonaire et du tissu mammaire pendant la lactation. Le taux

plasmatique de CEA, particulièrement faible, peut augmenter dans de nombreuses conditions pathologiques, néoplasique ou non.

Des taux de CEA augmentés modérément peuvent être observés dans les carcinomes pulmonaire, gastrique, ovarien, utérin, hépatique, mammaire et rénal, ainsi que dans les leucémies, les lymphomes et les sarcomes.

A noter que le CEA se retrouve fréquemment impliqué dans le carcinome du côlon, notamment pour contrôler la réponse thérapeutique des patients traités (par chirurgie ou autre), ou comme marqueur de récurrence.

Une autre pathologie maligne associée à une augmentation sensible du taux de CEA est le cancer du pancréas, plus rare que le carcinome colique, mais dont le pronostic est beaucoup plus défavorable.

Il est nécessaire de surveiller les taux de CEA en période pré-opératoire, parce qu'il est étroitement lié au risque de récurrence néoplasique après résection de la tumeur primitive ; mais également en période post-opératoire, car une augmentation sensible est un signe précoce de métastases et /ou de récurrence locale, les méthodes cliniques et instrumentales existantes ne pouvant les déceler.

Au final, le CEA n'est pas spécifique d'un type de néoplasie, même si on observe⁵ que des valeurs supérieures à 20 µg/ml sont significativement corrélées à la présence de métastases et/ou à un carcinome primitif du pancréas ou du côlon-droit.

1.2.2 SCCA

Le Squamous Cell Carcinome Antigen, SCCA, est une protéine au haut poids moléculaire, (45 KDalton), codifiée par deux gènes hautement homogènes, SCCA1 et SCCA2 localisés sur le locus 18q21.3. Il appartient à la famille des sérpines. Les sérpines (serine protéinase inhibiteur) sont inhibiteurs de différents protéinase sériniques qui entrent dans la régulation de différentes voies de transduction du signal comme :

1. La reconstitution du cytosquelette,
2. L'adhésion cellulaire,
3. La mort cellulaire programmée,
4. La prolifération cellulaire.

SCCA est surexprimé dans différentes néoplasies malignes d'origine squamo-cellulaire (carcinome du col utérin, œsophagien, pulmonaire, etc.)

Des études récentes indiquent que le SCCA peut induire une croissance tumorale à travers l'inhibition de l'apoptose et la dérégulation de la prolifération cellulaire. Son taux est augmenté dans les réactions inflammatoires de la peau, eczéma, psoriasis et LES, dans l'ARDS (adult respiratory distress syndrome), dans la tuberculose, dans l'insuffisance rénale ; Il serait donc probablement impliqué dans la surveillance immunologique de certaines pathologies chroniques.

Actuellement il est utilisé comme marqueur sérologique du carcinome squameux du col utérin pour l'évaluation des effets thérapeutiques, le contrôle d'éventuelles récives néoplasiques du col utérin, et enfin comme marqueur sérologique et tissulaire dans les pathologies hépatiques (hépatite, cirrhose, et adénocarcinome).

1.2.3 Ep-CAM

La molécule d'adhérence cellulaire épithéliale (Ep-CAM) est une glycoprotéine d'environ 40 kdalton, qui à l'origine a été identifiée comme un marqueur carcinologique, étant donné son expression importante dans les tumeurs rapidement prolifératives d'origine épithéliale. Les épithéliums normaux expriment Ep-CAM de façon variable, mais généralement moins que les épithéliums carcinomateux.

Dans certaines études, Ep-CAM a été proposé comme molécule d'adhérence inter-cellulaire. Cependant, des recherches récentes ont révélé un rôle plus polyvalent d'Ep-CAM. Il participerait non seulement à l'adhérence cellulaire, mais également à des processus divers comme la signalisation, la migration cellulaire, la prolifération et la différenciation.

Au final, on a remarqué que l'expression superficielle cellulaire d'EpCAM peut en réalité empêcher l'adhérence entre cellules. De plus, Ep-CAM a le potentiel oncogène via sa capacité à réguler c-myc, e-fabp et les cyclines A et E. Puisqu'Ep-CAM est exprimé exclusivement dans des épithéliums et des néoplasmes épithéliaux dérivés, Ep-CAM peut être utilisé comme marqueur diagnostique pour des cancers divers. Il semble jouer un rôle dans la cancérogénèse et la formation de métastases, par conséquent, il pourrait aussi jouer le rôle de marqueur pronostique et représenter un objectif pour des stratégies immunothérapeutiques.

Le marqueur Ep-CAM est un antigène de différenciation pan-épithélial. Son expression est retrouvée dans nombreux de carcinomes. Il existe des immunothérapies ciblant ce marqueur dans certains traitements anti-cancéreux.

1.2.4 EphB4

Les récepteurs tyrosine kinase EPH (erythropoietin producing hepatocellular) et leurs ligands éphrines constituent un système de communication cellulaire important, notamment pour leur rôle dans les processus tels que l'adhérence, la migration, l'invasion des cellules, leur prolifération et leur survie. Ce système est crucial dans le développement embryonnaire et le maintien de l'homéostasie dans de nombreux organes adultes.

Il n'est pas surprenant que de nombreuses études aient mis en corrélation l'altération de l'expression et des fonctions du système éphrine avec le développement et la progression du cancer. La liaison éphrine-Eph est une cible potentielle dans l'évolution de nouvelles stratégies de lutte contre le cancer. De nombreux récepteurs Eph et/ou éphrine sont exprimés aussi bien dans les cellules cancéreuses que dans le microenvironnement entourant la masse tumorale (stroma).

Les éléments de preuve jusqu'à présente sur le rôle éphrine dans les tumeurs présentent une variabilité attribuant à chaque membre de ce système, selon les néoplasies étudiées et le stade de la tumeur elle-même, la promotion ou la suppression des tumeurs.

L'expression d'EphA2 par exemple, présent dans plusieurs types de cancer, est associée à un plus grand degré de malignité et un plus mauvais pronostic dans plusieurs études. Le

récepteur EphB4 est aussi largement exprimé dans les cellules cancéreuses et, dans ces cas particuliers, il a été constaté une corrélation directe entre son expression et la progression de la maladie.

1.2.5 CK 17 18 19

Les cytokératines sont des filaments intermédiaires de kératine se trouvant dans le cytosquelette intracytoplasmique des tissus épithéliaux normaux et cancéreux.

Les filaments forment dans le cytoplasme un complexe qui s'étend de la surface du noyau à la membrane cellulaire. Du fait de cette conformation, les cytokératines sont impliquées dans l'organisation du cytoplasme et les mécanismes de communication cellulaire. De plus, elles jouent un rôle dans la différenciation, les mouvements cellulaires et les processus mitotiques et post-mitotiques. Il existe deux types de cytokératines : celles de hauts poids ou cytokératines acides de type I (CK1 à 9) et celles de bas poids ou cytokératines basiques ou neutres de type II (CK10 à 20). Leur expression est souvent organe ou tissu spécifique.

Les CK basiques et neutres comprennent les CK1 à CK 9.

Les CK acides sont de la CK10 à la CK20.

L'expression de ces CK est souvent spécifique à un organe ou à un tissu. Par exemple, la CK7 est exprimée au niveau de l'épithélium de l'appareil génito-urinaire, alors que la CK20 se retrouve plus communément dans l'appareil gastro-intestinal.

L'expression de groupes de CK par une cellule épithéliale dépend principalement du type d'épithélium à qui elles appartiennent et du stade de développement. Ainsi, le type de CK spécifique exprimé permet de classer les épithéliums selon leur profil d'expression. A savoir que ce classement reste valide pour les tumeurs malignes des épithéliums (les carcinomes), puisque le profil des CK exprimées a tendance à rester constant même en cas de transformation d'un épithélium en carcinome.

Les CK 17 CK 18 et CK 19 sont des protéines du cytosquelette, sont exprimés exclusivement à la surface des cellules épithéliales sont les CK plus abondantes dans les carcinomes avec la CK8

Le principal impact clinique apporté par l'étude du profil des CK (retrouvées grâce à des techniques d'immunohistochimie), serait qu'il permet de déterminer le type d'épithélium qui s'est transformé en carcinome, et la caractérisation du type de tumeur.

1.2.6 EGFR

Les récepteurs du facteur de croissance EGF sont des glycoprotéines transmembranaires, ayant un domaine de liaison extracellulaire protéique avec le facteur de croissance EGF puis un domaine intracellulaire d'action contenant une tyrosine kinase, qui traduit le signal de mutation, par l'intermédiaire d'autres molécules, jusqu'au noyau pour y induire la transcription de l'ADN. La séquence protéique en acides aminés du domaine extracellulaire du récepteur est connue pour un grand nombre de facteurs de croissance.

L'espacement des résidus cystéines permet de classer la structure tertiaire de ces récepteurs en deux catégories : le type immunoglobuline en boucles et le type en poches. La connaissance précise des sites de liaison permet la fabrication d'agonistes et d'antagonistes spécifiques synthétiques. Le récepteur et le facteur de croissance EGF sont ensuite internalisés dans la cellule, en général en moins d'une heure. Il se forme une vésicule : l'endosome. Pour permettre une nouvelle stimulation, la cellule doit reconstituer de nouveaux récepteurs dont la demi-vie n'est que de 4 heures. Les cellules répondent aux stimuli extérieurs par une synthèse accrue de récepteurs.

EGFR possède un rôle dans le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse ainsi qu'un rôle dans la régulation des métalloprotéases matricielles. EGFR possède également un rôle dans la régulation des phénomènes d'angiogenèse tumorale, notamment grâce à son rôle de régulation du VEGF-A. Enfin, un lien de plus en plus évident semble exister entre les récepteurs EGFR et les cellules souches tumorales.

Enfin, EGFR permet de manière indépendante de son activité kinase, de favoriser la survie cellulaire par inhibition des phénomènes d'autophagie de par son rôle stabilisant des transporteurs du glucose.

EGFR est une cible privilégiée dans le traitement des cancers pulmonaires, des voies aérodigestives supérieures et colorectaux. Des inhibiteurs de kinase comme le gefitinib ou l'erlotinib sont ainsi utilisés chez les patients atteints d'un cancer bronchique non à petites

cellules présentant une mutation de sensibilité sur le gène *EGFR*, et le cetuximab et le panitumumab sont deux anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement EGFR et utilisés dans le traitement du cancer colorectal métastatique.

1.2.7 PVA

L'antigène Pemphigus Vulgaris (PVA) fait partie de la famille de cadhérines. Les cadhérines sont une classe de glycoprotéines s'exprimant à la surface des cellules. Elles jouent un rôle important dans l'adhésion cellulaire assurant la liaison intercellulaire au sein des tissus. Leur fonctionnement dépend des ions calcium (Ca^{2+}), d'où leur nom.

La superfamille des cadhérines comprend les cadhérines, les protocadhérines, les cadhérines desmosomales comme les desmoglénines et les desmocollines, etc. D'un point de vue structurel, elles partagent des « séquences cadhérine », qui sont les domaines de liaison extracellulaires du Ca^{2+} .

Les cadhérines vont former soit des jonctions d'adhérence soit des desmosomes. Dans le premier cas, elles seront liées en intracellulaire à des caténines. Les caténines vont servir d'intermédiaire de liaison avec le cytosquelette. Les cadhérines sont fixées aux β et γ -caténine, elles-mêmes fixées à des α -caténines qui viennent se fixer aux filaments d'actine du cytosquelette.

Dans le second cas, les cadhérines sont aussi appelées cadhérines desmosomales. Elles se fixent du côté cytoplasmique à des protéines différentes selon la cadhérine présente. Si la cadhérine est une desmocolline, elle sera ancrée sur une plakoglobine, puis une desmoplakine, et enfin au filament intermédiaire du cytosquelette. Si la cadhérine est une desmoglénine, elle va se fixer sur une plakophiline puis une desmoplakine et enfin au filament intermédiaire.

Elles sont également impliquées dans le phénomène d'inhibition de contact, c'est-à-dire qu'elles permettent aux cellules normales d'arrêter de proliférer quand il n'y a plus de place: on parle de confluence. Les cellules cancéreuses sont dépourvues de tout ou d'une partie de leur cadhérine, il n'y a donc pas d'inhibition de contact ce qui est à l'origine des métastases.

1.2.8 Elf 3

Le marqueur E74-like 3, fait partie de la famille des régulateurs de la transcription. Il est exprimé dans la majorité des types de cellules épithéliales, et joue un rôle dans la différenciation des cytokératines. Il peut être associé au développement de la glande mammaire et règle aussi la différenciation cellulaire épithéliale. A savoir qu'il est surexprimé dans le cancer du sein.

Il a par conséquent un rôle important dans la différenciation cellulaire épithéliale et dans la cancérogenèse, notamment au niveau bronchique.

Il participe aussi à l'implantation embryonnaire du fœtus.

1.3 Le processus métastatique lié à l'acte chirurgical

Par définition, une métastase est la formation de foyers tumoraux secondaires liée à la capacité des cellules tumorales à se détacher de la tumeur primitive, de s'implanter dans un autre organe et de proliférer. A partir du foyer primitif, il peut y avoir une dissémination micrométastatique c'est-à-dire la libération dans le sang ou le réseau lymphatique de cellules tumorales isolées ou de petits amas cellulaires .

Ces micrométastases peuvent proliférer et donner naissance à des métastases. La difficulté est de déceler ces cellules tumorales isolées ou en micro-amas, et également d'évaluer leur valeur pronostique, ainsi que leur potentiel métastatique.

Dans cette étude, nous allons nous intéresser plus particulièrement au processus métastatique lié à l'acte chirurgical dans les cancers épidermoïde des voies aérodigestive supérieures (CEVADS) . En effet, dans ce type de cancers, la meilleure méthode pour établir un diagnostic est l'analyse anatomo-pathologique du prélèvement réalisé par biopsie. La principale barrière physique empêchant les cellules tumorales de migrer est la membrane du tissu atteint. Lors de la chirurgie, ces barrières sont détruites, ce qui facilite l'invasion du système vasculaire. Les cellules tumorales peuvent ainsi se loger dans les vaisseaux et proliférer à distance du site primitif pour former des tumeurs secondaires (Dyavanagoudar S., 2008).

Généralement, les métastases sont détectées par imagerie ou sérologie à un stade très avancé du cancer (Molloy TJ., 2008). Dans les cancers de l'œsophage, le taux de survie après 5 ans est d'environ 15% avec seulement 20 à 30% de survie dans les 2 ans après la chirurgie (Liu Z., 2008). Cela implique qu'il est important de pouvoir détecter ces micrométastases tôt dans le développement du cancer.

L'objectif de ces études expérimentales est de caractériser la présence de cellules isolées ou disséminées Cellules Tumorales Circulantes (CTCs) de CEVADS dans la circulation sanguine (taux ou cellules), dans les ganglions et dans les drains de Redon.

1.3.1 Les Cellules Tumorales Circulantes (CTCs)

Les CTCs sont des cellules tumorales issues de la tumeur primitive se retrouvant dans le sang spontanément ou après chirurgie.

Les carcinome épidermoïdes des VADS ou HNSCC (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) sont des cancers agressifs avec un pronostic défavorable malgré les progrès dans les procédures diagnostiques et les thérapies multi-disciplinaires. Le problème se trouve dans la détection des métastases par des techniques préopératoires conventionnelles comme l'imagerie traditionnelle (Hashimoto T., 2008).

La concentration précise en CTCs dans le sang varie entre 1 et 10 000 à un même stade clinique. Leur détection doit donc faire appel à des techniques très sensibles et hautement spécifiques (Bidard F.C., 2009). Les CTCs représentent environ une cellule sur 10^6 à 10^7 cellules mononuclées du sang. En général, les méthodes de détection comprennent une étape d'enrichissement ou sélection des CTCs puis une étape de détection qui peut être séparée ou non de la première étape (Xi L., 2007).

1.3.2 L'intérêt diagnostique

Dans les cancers épidermoïdes des VADS, la biopsie ou l'acte chirurgical réalisés pour le diagnostic peuvent engendrer une dissémination de cellules tumorales. Après chirurgie, les patients peuvent développer des métastases postopératoires ce qui suggère que des micrométastases soient présentes au moment de la chirurgie (Hashimoto T., 2008).

La recherche des CTCs dans le sang des patients est un acte beaucoup moins invasif que la biopsie ou la chirurgie. De plus, les cellules tumorales circulantes sont le reflet de la tumeur primitive.

L'analyse de la biopsie apporte des informations comme le type histologique, le grade tumorale, les différents marqueurs tumoraux. Les CTCs permettent de retrouver la plupart de ces données (Bidard F.C., 2009). Il s'agirait d'une aide au dépistage du cancer.

1.3.3. L'intérêt pronostique

Par simple prise de sang et quelle que soit la méthode utilisée, le nombre de CTCs par unité de sang peut être déterminé. Il a été démontré que cette valeur augmente avec le grade de la tumeur. Si le nombre de CTCs est inférieur à 5 par millilitre de sang, le pronostic est considéré comme bon lors du diagnostic de rechute. Si ce nombre est supérieur à 5, le pronostic est mauvais. Les variations quantitatives de cette valeur entre le diagnostic et après le premier cycle de chimiothérapie permettent de prédire la réponse au traitement. Cela de manière plus précoce que l'évaluation radiologique (Bidard F.C., 2009).

De plus, l'étude des CTC après isolement permet de prédire quel traitement sera efficace sur les métastases. Ainsi, le traitement pourra être adapté et être plus efficace (Schneider M., 2006).

1.3.4. L'intérêt dans le suivi du patient

En cours de traitement de cancers métastatiques, le suivi numérique des CTCs est un marqueur biologique précoce de réponse tumorale. Cela permet d'adapter la chimiothérapie avant l'examen radiologique habituellement réalisé après trois ou quatre cycles de chimiothérapie. Ce suivi semble apporter d'autres informations que celles données par la radiologie et les marqueurs sériques (Bidard F.C., 2009).

En effet, ce suivi permet de prédire les rechutes malgré le traitement adjuvant c'est-à-dire après chirurgie et ainsi de prendre en charge très tôt le risque de formation de métastases et de rechute (Schneider M., 2006).

1.4. La détection des CTCs

1.4.1. Les techniques d'immunomarquage

Il s'agit de techniques de détection par marquage des CTCs soit par immunohistochimie soit par immunofluorescence. Le marquage cible des marqueurs épithéliaux spécifiques des CTC recherchées. Les anticorps dirigés contre ces cibles peuvent être couplés à des fluorochromes.

Dans le cas de CTCs des CEVADS, il s'agit d'un anticorps primaire anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) qui va être reconnu par un anticorps secondaire anti-Ig biotinylé. Puis la streptavidine couplée à une enzyme (la peroxydase de raifort) va se fixer à l'anticorps secondaire et l'ajout d'un substrat chromogène va permettre de révéler le marquage. EGFR est un récepteur de surface cellulaire qui est activé par fixation de ligands spécifiques comme EGF et TGF (Transforming Growth Factor). Une fois activé par son ligand, le récepteur a une activité tyrosine kinase intracellulaire sur des protéines. Ces protéines (MAPK, Akt) jouent un rôle dans la migration cellulaire, l'adhésion et la prolifération. D'un point de vue clinique, il a été démontré que des anomalies géniques touchant le gène EGFR, entraînant une surexpression de ce récepteur et donc une prolifération cellulaire incontrôlée et sont associées à de nombreux cancers. Les cellules tumorales surexpriment donc ce récepteur.

Cette technique d'immunomarquage permet également une étude cytologique des cellules afin de s'assurer d'une bonne spécificité du marquage, de l'enrichissement et de la morphologie cancéreuse de la cellule.

1.4.2. La biologie moléculaire

D'après Bidard et al. (2009), la technique de référence pour la détection des CTC est la RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) En effet, la sensibilité de cette technique de biologie moléculaire est très importante, permettant de détecter une CTC

parmi un à dix millions d'autres cellules nucléées contre une CTC parmi 100 pour l'immunohistochimie.

Pour les cancers du sein, du colon, de la prostate, on a déjà des molécules cibles, mais pour les cancers des VADS on n'a pas d'études moléculaires spécifiques, c'est pour ça que nous avons choisi CK17 CK18, CK19, Ep-CAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) CEA, SCCA, PVA et EGFR Elf3, EphB4.

Les marqueurs cibles sont en partie les mêmes que pour l'analyse d'immunomarquage. Il s'agit de cibles spécifiques surexprimées par les CTCs des CEVADS.

Le principe général de cette technique est une synthèse d'ADNc (Acide DésoxyriboNucléique complémentaire) par une reverse transcriptase après extraction d'ARN (Acide RiboNucléique). Il s'agit d'une PCR classique avec amplification d'une séquence cible par une enzyme, la Taq polymérase. Une série de cycles de trois étapes est réalisée : dénaturation, hybridation des amorces et élongation. La lecture de l'amplification des brins se fait par fluorescence grâce à la présence de SyberGreen dans le mix PCR. Le SyberGreen est un agent intercalant fluorescent, qui s'incorpore à l'ADN uniquement lorsqu'il est sous forme double brin : c'est en fin de phase d'élongation que la fluorescence émise est mesurée et comme plusieurs molécules de SyberGreen peuvent se fixer sur un même double brin d'ADN, la fluorescence émise sera proportionnelle à la taille de l'amplicon et au nombre de molécules d'ADN synthétisées..

L'analyse par RT-PCR permet d'analyser qualitativement et quantitativement les CTC. Il est possible de réaliser une analyse de plusieurs marqueurs simultanément par PCR multiplex. Cela permet d'être plus spécifique mais l'aspect qualitatif est négligé.

Cette technique pose tout de même un problème. En effet, lorsque la détection repose sur l'analyse de transcrits épithéliaux, comme dans notre cas, la spécificité diminue.

Ces marqueurs épithéliaux peuvent être exprimés par des cellules non tumorales. Lors de l'extraction des ARN totaux, les différentes cellules peuvent être mélangées et donc il y a une hétérogénéité d'expression des marqueurs. C'est pour cela que l'étape d'enrichissement est très importante et détermine la spécificité de la détection par RT-PCR.

1.4.3. Les systèmes industriels

Il existe actuellement trois systèmes de détection des CTC. Deux sont au stade clinique expérimental (Adnagen[®] et Metagenex[®]) et le troisième a été validé par la FDA (Food and Drug Administration), il s'agit du CellSearch (Veridex[®]).

Le système développé par Adnagen[®] comporte une étape de séparation immunomagnétique non automatisé par des billes recouvertes d'anticorps. Ensuite, il y a une étape d'extraction des ARNm (Acide RiboNucléique messenger) suivie d'une transcriptase inverse. Une PCR multiplex est ensuite réalisée.

La technique ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor) de Metagenex[®] permet de caractériser les CTC d'un point de vue morphologique, cytologique et moléculaire. Une étape d'enrichissement par filtration est réalisée, les CTC sont retenues. Un immunocyto marquage permet de compter les CTC, suivie d'une microdissection⁴ des cellules puis d'une extraction des ARNm et enfin d'une analyse moléculaire.

La technique automatisée CellSearch de Veridex[®] permet d'analyser directement le tube de sang. Le sang est centrifugé puis un enrichissement immunomagnétique est réalisé par expression de Ep-Cam par les cellules tumorales. Les CTC sont détectées en fluorescence après marquage du noyau (DAPI, fluorescence bleue), immunomarquage de CK8, 18 et 19 (fluorescence verte) et de l'antigène CD45 (fluorescence rouge). Les cellules sont analysées une par une par un logiciel qui distingue les CTC sur plusieurs critères. Les CTC ont une morphologie ronde, un cytoplasme CK+ et n'expriment pas l'antigène CD45. Les résultats sont exprimés en nombre de CTC/7,5mL de sang. Cette technique permet une grande reproductibilité mais n'est actuellement réalisable que pour le kit de détection commercialisé c'est-à-dire dans le cas de cancer du sein, du colon et de la prostate (Bidard F.C., 2009).

Chapitre II

Etude de marqueurs moléculaires pour le diagnostic d'envahissement ganglionnaire des carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures analyse par pcr quantitative en temps réel et en OSNA

2.1 Procédure sentinelle et cancers des VADS

La dissémination métastatique par voie lymphatique représente la modalité de diffusion la plus commune des carcinomes. La richesse de la circulation lymphatique de la tête et du cou (environ 400 ganglions sur les 700 au total du corps humain), et la complexité de sa distribution anatomique expliquent le caractère lymphophile de ces tumeurs.

L'invasion du ganglion satellite proximal appelé ganglion sentinelle (GS) de la tumeur par les cellules tumorales correspond souvent à la première étape de la formation de métastases. Les cellules cancéreuses qui traversent un ganglion lymphatique y sont généralement séquestrées pour être détruites excepté dans certaines circonstances, ou elles peuvent s'y développer, et former ainsi un foyer tumoral secondaire (Schleiermacher and Delattre 2001). Les travaux de Rouvière dans les années 30 ont permis d'appréhender la systématisation des voies lymphatiques cervicales qui mettent en jeu des réseaux superficiels et profonds drainant préférentiellement selon leur localisation les tumeurs développées aux dépens de la muqueuse des VADS (Alex 2004) (Tableau 1).

Niveaux	Secteurs anatomiques	Sites anatomiques afférents
I	Sous mental (A), sous mandibulaire (B)	Lèvres, CB
II	Sous digastrique (A), spinal antérieur (B)	Larynx, pharynx, CB
III	Sus-homohyoïdien	Larynx, 3 étages du pharynx
IV	Jugulaire inférieur	Larynx, oro et hypopharynx
V	Spinal (A), sus-claviculaire (B)	Rhinopharynx, oropharynx
VI	Préviscéral antérieur	larynx

Tableau1: Les niveaux ganglionnaires cervicaux selon l’American Academy of Otolaryngology Head and Neck Surgery, 2002.

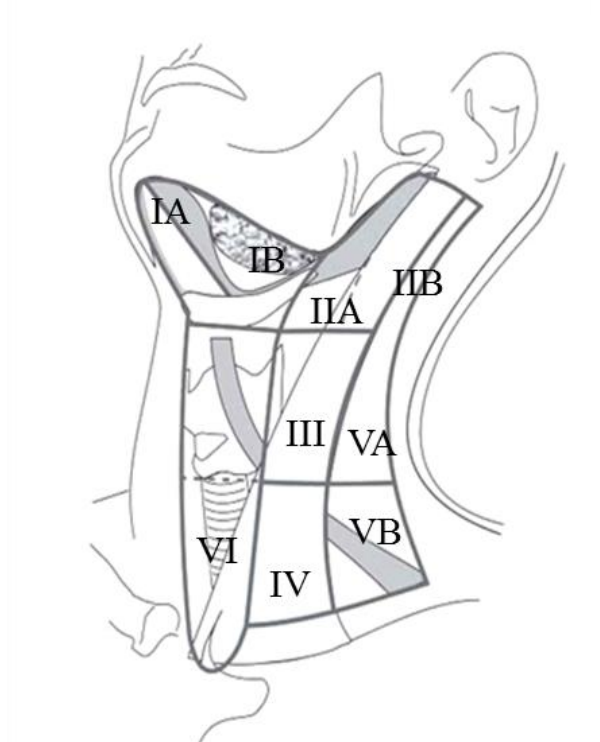


Figure 2: Systématisation des aires ganglionnaires cervicales.
(American Academy of Otolaryngology Head and Neck Surgery, 2002)

Le diagnostic pré-opératoire d'un envahissement ganglionnaire est à la fois clinique et radiologique. En dépit des progrès réalisés en matière d'imagerie (scanner, IRM, Morpho-TEP) celui-ci peut être sous-estimé lors du bilan pré-thérapeutique (Murakami, Uozumi et al. 2007; Mack, Rieger et al. 2008).

La littérature rapporte un taux de métastases ganglionnaires non détectées par l'examen clinique ou radiologique de l'ordre de 28 à 36%. (Tankere, Camproux et al. 2000). Or, l'envahissement ganglionnaire est reconnu comme étant l'un des facteurs pronostiques majeurs de ces cancers. Son influence sur la survie sans maladie, la survie spécifique et la survie globale a été démontrée (Stoeckli, Pfaltz et al. 2002; Greenberg, Fowler et al. 2003; Ross, Soutar et al. 2004).

Le risque de méconnaître ces métastases ganglionnaires justifie l'attitude communément admise de traiter systématiquement les aires ganglionnaires cervicales et ce même pour des petites tumeurs classées T1/T2N0.

Si l'indication d'une chirurgie première est retenue, un évidement cervical limité aux territoires de drainage théorique de la tumeur est réalisé de principe. Cette attitude repose sur la connaissance de l'anatomie fonctionnelle du système lymphatique et sur le concept que les tumeurs suivent des voies de drainage lymphatique «relativement» constantes et prédictives (Travaux de Rouvière et Fisch en 1938).

La classification de l'American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2002 sectorise les différents groupes ganglionnaires cervicaux permettant une corrélation anatomo-chirurgicale précise, véritable clé de voûte de la standardisation chirurgicale des évidements ganglionnaires (Figure 2).

L'évidement sélectif a un intérêt diagnostique en précisant le statut ganglionnaire, et thérapeutique en ôtant tous les ganglions susceptibles d'être envahis par une métastase. La découverte d'une métastase ganglionnaire cervicale implique la réalisation d'un traitement complémentaire par radiothérapie +/- chimiothérapie en cas d'effraction capsulaire ganglionnaire.

Cependant, ce curage sélectif n'était utile qu'à un petit nombre de patients N0. En effet, dans 2/3 des cas, l'examen anatomopathologique définitif ne retrouvait pas de métastases ganglionnaires et ces patients étaient finalement traités par excès.

Outre les problèmes liés à l'anesthésie, les complications possibles de l'évidement cervical sont l'hémorragie, l'infection, la fistule de chyle, la nécrose cutanée, les lésions nerveuses et surtout la persistance de douleurs cervicales et de l'épaule occasionnant une gêne fonctionnelle à la mobilisation du bras.

La technique du GS est intéressante dans un objectif de déflation thérapeutique car elle permet d'éviter un curage inutile sans majoration du risque carcinologique. Son principe repose sur le concept que la diffusion tumorale métastatique par voie lymphatique n'est pas un phénomène aléatoire, mais suit une progression spécifique et prévisible (Alex 2004).

La détection isotopique du ganglion sentinelle permet de localiser le premier relais ganglionnaire efférent de la tumeur. Le GS est considéré comme représentatif des autres ganglions et sa négativité suppose que le reste de la chaîne ganglionnaire est saine. En cas de positivité, l'évidement cervical doit être complété, dans le cas contraire une simple surveillance est indiquée.

Utilisée depuis de nombreuses années en routine dans les mélanomes et le cancer du sein où elle est devenue un référentiel, la procédure sentinelle est aujourd'hui validée pour les tumeurs de la cavité buccale et de l'oropharynx classée T1/T2 N0 (Ross, Soutar et al. 2004; Ross, Soutar et al. 2004; Benateau, Babin et al. 2005; Paleri, Rees et al. 2005; Stoeckli, Pfaltz et al. 2005; Mamelle, Temam et al. 2006; Stoeckli, Alkureishi et al. 2009). Pour des raisons évidentes d'accessibilité de la tumeur à l'injection du traceur radioactif la veille de l'intervention cette procédure se limite pour l'instant à ces indications.

2.1.1 Principe technique

La veille de l'intervention, un colloïde radioactif marqué au ^{99m}Tc est injecté par voie sous muqueuse aux 4 points cardinaux de la tumeur. Une scintigraphie plus ou moins couplée à une étude tomodensitométrique, voire tridimensionnelle permet de localiser le ganglion sentinelle (Figure 3 A, B, C).

Au cours de l'intervention son repérage précis se fait à l'aide d'une sonde de détection gamma. (Figure 3D).

- Si deux aires de drainage sont identifiées par la lymphoscintigraphie pré-opératoire, le chirurgien devra effectuer une lymphadénéctomie sélective de ces deux groupes ganglionnaires puisqu'il est impossible de prédire quel groupe serait le site de métastases éventuelles. En cas de GS positif une reprise chirurgicale est nécessaire pour compléter le curage.

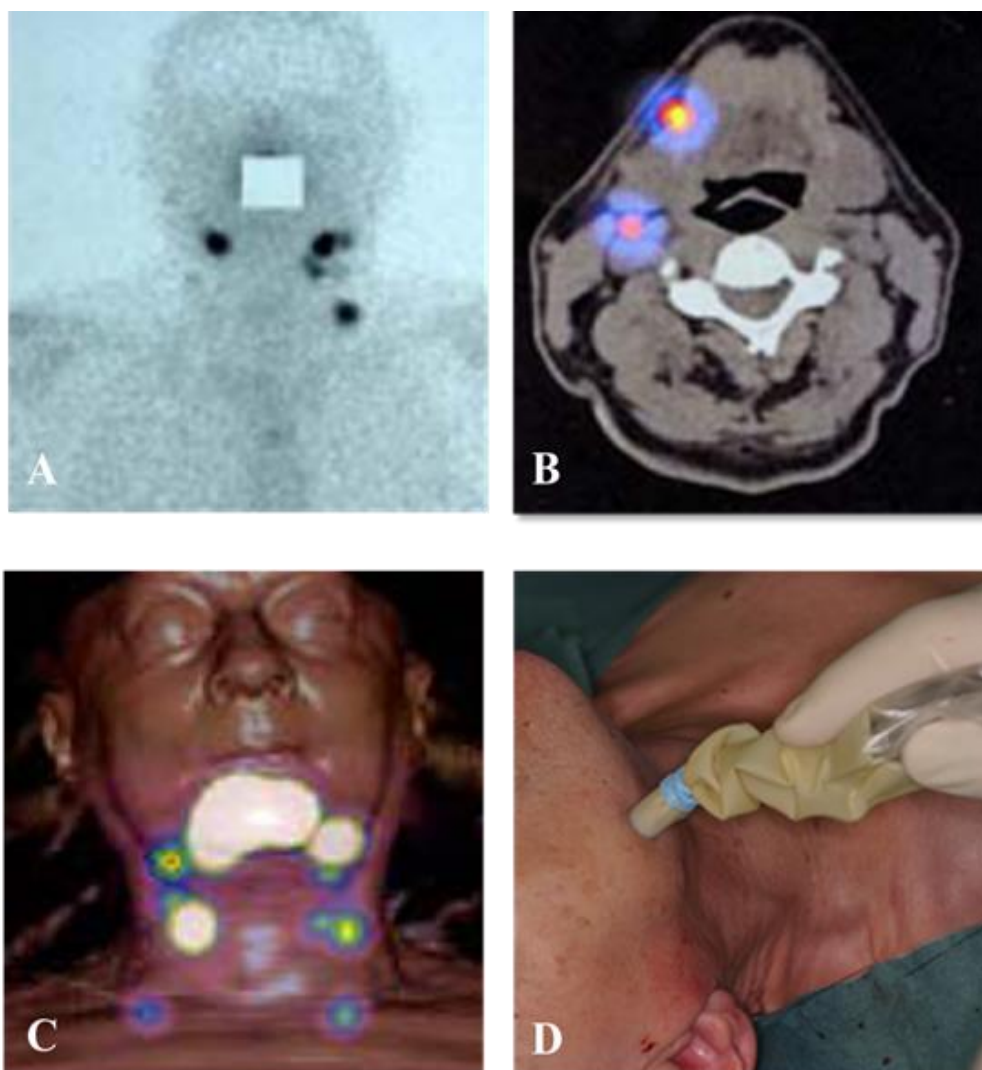


Figure 3 : Méthodes de détection du GS:

Localisation du GS la veille de l'intervention par : Lymphoscintigraphie (A), Spect-CT (B), 3D Spect-CT (C). *Détection per-opératoire du GS* avec la sonde gamma (D)

- Si plus de deux aires ganglionnaires sont identifiées ou si à l'inverse, il n'y a pas de ganglion clairement identifié, le malade bénéficiera du traitement habituel à savoir un évidement cervical.

2.1.2 Méthodes d'analyse du GS

Il est important de souligner que la détection d'un ganglion sentinelle ne préjuge en rien de son caractère métastatique.

- L'Immunohistochimie

L'immunohistochimie en coupes sériées (CS-IHC) par marquage avec des anticorps anti-cytokératine AE1/AE3 est une technique beaucoup plus sensible que l'histologie standard. Elle permet de détecter des micrométastases (MI < 2mm), voire des cellules tumorales isolées (CTI < 0.2mm) (Ross, Soutar et al. 2004). La découverte d'une micrométastase dans un GS impose la réalisation d'un évidement cervical.

L'IHC est considérée à l'heure actuelle comme la méthode de référence de l'analyse du GS.

Malheureusement, pour des raisons de lourdeur technique et médicale, il est impossible d'utiliser cette méthode en extemporanée. Le temps incompressible de cette analyse est de 48 heures.

Le GS est donc analysé en différé ce qui, oblige le chirurgien en cas de positivité à ré-opérer le patient pour compléter l'évidement ganglionnaire cervical.

- L'examen extemporané standard

L'analyse extemporanée sur coupes congelées est habituellement pratiquée sur une ou plusieurs sections de niveaux distincts après coloration à l'hématoxyline/éosine.

L'avantage de cet examen est sa rapidité mais, son manque de sensibilité, largement documenté est un des points faibles de cette technique

La pratique de plusieurs niveaux de coupes en extemporané augmenterait très certainement la sensibilité de cet examen mais au prix d'un alourdissement de la technique et d'une perte inévitable du matériel ganglionnaire.

La véritable difficulté du diagnostic extemporané du GS tient au fait que seule une infime partie est analysée. L'examen per-opératoire du GS n'a de valeur que s'il est positif,

c'est pourquoi, très peu d'équipes aujourd'hui ont recours à cette méthode pour une analyse extemporanée du GS.

2.2 La biologie moléculaire

La possibilité de connaître en per-opératoire le statut du GS par une méthode fiable et reproductible constitue le chaînon manquant de la stratégie de la procédure sentinelle dans les carcinomes épidermoïdes des VADS. L'analyse en biologie moléculaire est une alternative aux examens morphologiques qui a l'avantage de permettre une étude rapide et complète du GS. Il s'agit d'une technique extrêmement sensible allant jusqu'à détecter des métastases dans des GS supposés négatifs avec l'IHC et l'examen histologique standard combinés (Ghossein and Bhattacharya 2000).

2.2.1 Les marqueurs biologiques tumoraux

- Le marqueur idéal

Le marqueur utilisé pour la recherche de cellules tumorales à distance du site primitif (sang circulant, ganglion, moelle osseuse) doit répondre à plusieurs critères.

Le premier est sa spécificité vis-à-vis des cellules tumorales. Une positivité de ce marqueur dans un site secondaire doit pouvoir être rattachée de façon non ambiguë à la présence de cellules cancéreuses au niveau de ce site.

Le second critère concerne la sensibilité avec laquelle il permet la détection de cellules tumorales. La limite de détection doit être très largement inférieure à celle des techniques conventionnelles.

Le troisième critère est relatif à la capacité de ce marqueur d'apprécier de façon quantitative le degré d'envahissement du tissu considéré.

Enfin, la technique utilisée pour la détection de ce marqueur doit être simple, fiable et robuste pour pouvoir être standardisée (Schleiermacher and Delattre 2001).

- Les types de marqueurs

Schématiquement, il existe deux grands types de marqueurs tumoraux : ceux qui reconnaissent le tissu d'origine du cancer et ceux qui sont spécifiques des cellules tumorales elles-mêmes.

Les premiers, souvent qualifiés de « *tissu-spécifiques* », correspondent à des marqueurs qui sont exprimés dans les cellules tumorales au même titre que dans les cellules saines dont elles dérivent. C'est le cas par exemple des cytokératines qui sont des marqueurs du tissu épithélial et qui peuvent servir à détecter des carcinomes.

Les seconds, appelés « *tumeur-spécifiques* », correspondent en règle générale à des altérations génétiques survenues au cours de l'oncogenèse. Ils distinguent les cellules tumorales des cellules normales de l'organisme. La mutation du gène *KRAS* dans les cancers du côlon ou du pancréas en est un exemple.

2.2.2 Techniques de détection des marqueurs

Elles reposent essentiellement sur la PCR (polymerase chain reaction) qui est une technique qui amplifie de façon exponentielle des séquences d'ADN spécifiques grâce à une réaction enzymatique (ADN polymérase) en utilisant des amorces d'ADN (ou primers), situées de part et d'autre de la séquence d'ADN d'intérêt.

La sensibilité de cette technique est nettement supérieure aux techniques conventionnelles. Le seuil de détection est de l'ordre d'une cellule tumorale pour 10^6 , voire 10^7 cellules non tumorales (Ghossein, Carusone et al. 2000). Inventée en 1983 par Kary Mullis, Prix Nobel en 1993 cette technique connaît aujourd'hui de nombreuses applications.

2.2.2.1 La PCR quantitative en temps réel

Mise au point au milieu des années 90, elle a révolutionné l'utilisation de la PCR. Comme son nom l'indique, elle permet de connaître précisément la quantité d'ADN d'intérêt, ou d'ARN puisqu'il est possible de réaliser une RT-PCR quantitative avec le même appareillage (figure 4)

La méthode est basée sur la détection d'un signal fluorescent produit de façon proportionnelle à l'amplification du produit PCR (amplicon), cycle après cycle (Annexe 2). Elle nécessite un thermocycleur couplé à un système de lecture optique mesurant l'émission de fluorescence. Plusieurs études ont mis en avant la possibilité de détecter un

envahissement ganglionnaire dans les carcinomes épidermoïdes des VADS grâce à cette technique.

Le principal inconvénient de cette technique est qu'elle nécessite un temps machine incompressible d'environ 1 heure 30, incompatible avec un examen extemporané du GS.

2.2.2.2 La méthode OSNA®: One-step nucleic acid amplification

Cette technique très récente est désormais utilisée en routine pour le diagnostic extemporané du GS dans le cancer du sein. Il s'agit pour l'heure de la seule indication validée.

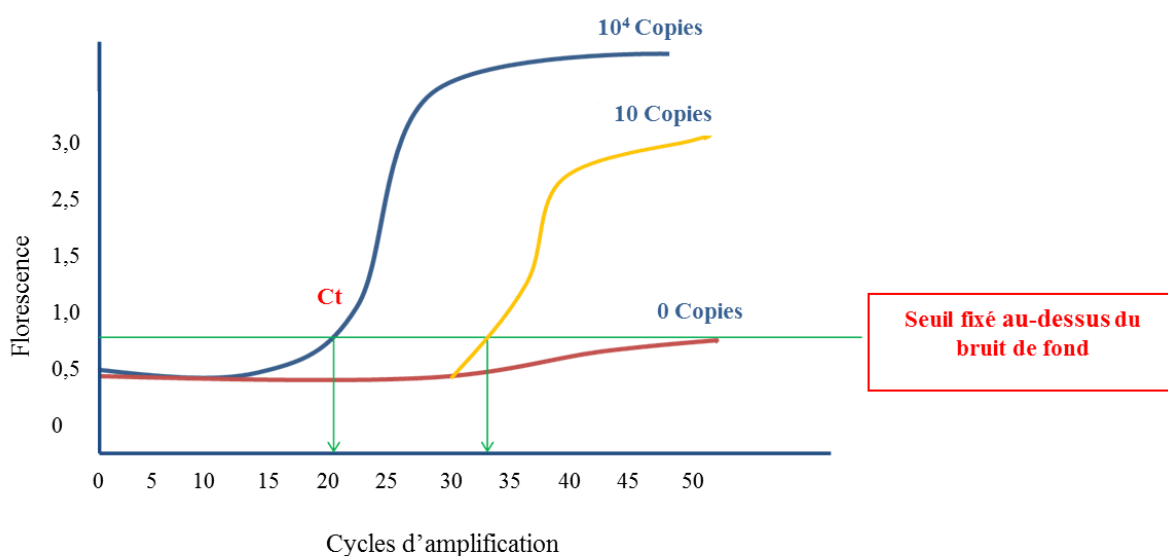


Figure 4 : PCR en temps réel - Quantification

Les valeurs de fluorescence sont corrélées à la quantité de produit amplifié :

Le concept de "cycle seuil" : Le Ct (Cycle threshold) est le point d'intersection de la courbe cinétique PCR avec la ligne seuil. Il correspond au point de départ de la phase exponentielle et se trouve directement lié à la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon. Le Ct représente le nombre de cycle d'amplification nécessaire pour obtenir un signal fluorescent statistiquement significatif par rapport au bruit de fond (valeur seuil).

☞ Plus le Ct est petit, plus l'échantillon est concentré

OSNA® est un dispositif d'amplification en une seule étape d'acides nucléiques. l'ARNm d'un marqueur épithélial, la cytokeratine 19 est directement amplifié à partir des lysats tissulaires selon une méthode isothermique : la RT-LAMP : Reverse transcription loop mediated isothermal amplification. Il n'y a pas d'étape d'amplification d'ADN ni d'isolement de l'ARN messager ce qui permet d'obtenir une réponse plus rapide.

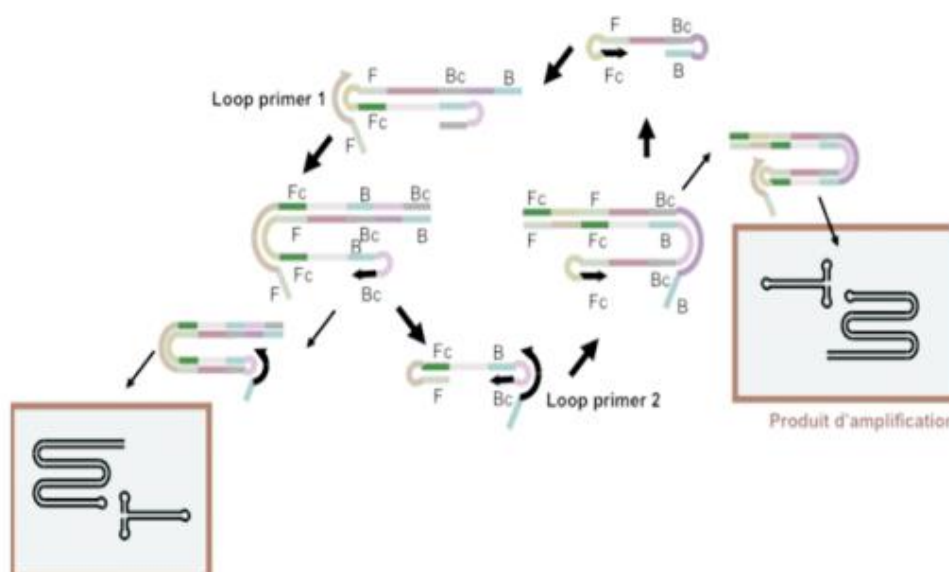


Figure 5: Principe de la RT-LAMP

Utilisation de 6 amorces différentes spécifiquement conçues pour détecter différentes zones de la séquence cible. La réaction utilise une ADN polymérase dotée d'une activité de déplacement du brin, et se déroule à une température constante d'environ 65°C. Les opérations d'amplification et de détection de la séquence cible peuvent être effectuée en une seule étape.

Echantillon (CK19)		Echantillon dilué (CK19-D) 1/10	
		Copies < 250	Copies ≥ 250
Qualitatif	Copies ≥ 5000	(++)	
	250 ≤ Copies < 5000	(+)	
	Copies < 250	(-)	(+) I

Tableau 2 : Représentation des résultats en OSNA®

Les amorces d'ADN utilisées sont particulières avec une forme en double boucle. La technique utilise 6 amorces différentes toutes très sensibles. (Figure 5). L'amplification se fait à une température stable de 65°C. L'absence d'étape de modification thermique comme au cours d'une amplification PCR classique réduit encore le temps d'analyse.

La quantification du nombre de copies se fait par la mesure de la turbidité de la solution. La synthèse d'acides nucléiques entraîne une production de pyrophosphates de magnésium à l'origine d'une modification de transparence de la solution. C'est donc cette opacité qui est mesurée pour quantifier le nombre de copie d'ARNm. Le processus est suivi en temps réel par le système d'amplification et d'automatisation (RD-100i®, Sysmex) Le ganglion lymphatique est analysé dans sa totalité et la quantité d'ARNm CK19 mesurée est corrélée à la taille du foyer métastatique. En fonction du nombre de copies, les résultats sont représentés selon 3 catégories : (Tableau 2, annexe 3).

Les avantages de cette procédure sont :

- Un résultat rapide, compatible avec une analyse extemporanée du GS.

En cas de positivité, le chirurgien peut compléter le curage ganglionnaire dans le même temps opératoire. L'un des intérêts de cette technique est la réduction des délais de prise en charge en cas de traitement adjuvant. Les résultats d'une récente étude effectuée au Centre Alexis Vautrin dans le cancer du sein ont mis en évidence une réduction significative du délai moyen de mise en œuvre du traitement complémentaire grâce à OSNA® (en moyenne 43 jours, versus 59 avec l'analyse immuno-histochimique standard.) (Klinger S 2012).

Une procédure sensible, spécifique, avec un haut degré d'automatisation et donc simple d'utilisation.

- Une analyse standardisée des métastases ganglionnaires.
- Une réduction des coûts hospitaliers.

La méthodologie OSNA® a été évaluée dans plusieurs études multicentriques principalement en Europe et au Japon. Le taux de concordance avec les méthodes histologiques standards était de 96.5%, la sensibilité de 95.6% et la spécificité de 96.7% (Tsujimoto, Nakabayashi et al. 2007; Visser, Jiwa et al. 2008; Schem, Maass et al. 2009).

L'analyse de la littérature confirme l'intérêt porté par la biologie moléculaire en cancérologie. Comme dans d'autres cancers, les cancers des VADS ont fait l'objet de nombreuses études, comme celle de Ferris par exemple qui a testé plus de 40 marqueurs.

Ses résultats avec le squamous cell carcinoma antigen (SCCA) et le pemphigus vulgaris antigen (PVA) expliquent le choix de ces deux marqueurs moléculaires.

L'epidermal growth factor receptor (EGFR) et l'Ephrin type B4 recepto ont également été retrouvés comme des marqueurs moléculaires potentiels pour le diagnostic de l'envahissement ganglionnaire.

Enfin, les cytokératines appartiennent au cytosquelette des cellules et ont été particulièrement étudiées dans les cancers des VADS. Plusieurs études ont mis en avant la possibilité de détecter un envahissement ganglionnaire dans les carcinomes épidermoïdes des VADS grâce à cette technique. Les cytokératines 5, 14, 17 et 19 ont été plus particulièrement étudiées (Hamakawa, Fukuzumi et al. 2000; Becker, Shores et al. 2004; Hamakawa, Onishi et al. 2004; Shores, Yin et al. 2004).

2.3 Hypothèses et objectifs de l'étude

La technique du GS permet, en déterminant de façon précise le statut ganglionnaire, de traiter les patients atteints d'une tumeur limitée des VADS classée N0 de manière rationnelle en ne proposant un curage cervical que si le GS est positif.

Pour optimiser la technique et améliorer la prise en charge de ces patients, l'idéal serait de connaître en per-opératoire le statut tumoral du GS, permettant ainsi en cas de positivité, de compléter l'évidement dans le même temps opératoire.

La méthodologie OSNA® développée dans le cadre du cancer du sein permet au chirurgien d'avoir connaissance du statut du GS en extemporané, et donc d'orienter son geste chirurgical.

A l'heure actuelle cette méthodologie n'est utilisée que dans cette indication mais, on peut aisément imaginer qu'elle pourrait être appliquée dans d'autres cancers d'origine épithéliale dans lesquels la cytokératine 19 est surexprimée. Cette étude est une étude préliminaire de faisabilité de la méthode OSNA® dans les cancers des VADS. Les différentes recherches bibliographiques ont mis en évidence d'autres marqueurs moléculaires potentiellement efficaces pour le diagnostic de métastases ganglionnaires cervicales. Au total, 6 marqueurs ont été retenus ; le SCCA, le PVA, l'EpBH4, l'EGFR, la CK17, et la CK 19.

Les objectifs étaient :

- ✓ De définir parmi les marqueurs sélectionnés le(s) plus pertinent(s) pour diagnostiquer un envahissement ganglionnaire.
- ✓ De vérifier, d'une part la concordance des résultats en OSNA® avec l'histologie standard, et d'autre part avec l'analyse en q RT-PCR pour la CK19.

Pour répondre à ces objectifs, le niveau d'expression des différents gènes a été étudié en qRT-PCR dans la tumeur primitive, le ganglion métastatique correspondant, et comparé à un témoin. Tous les ganglions ont fait l'objet d'une analyse en OSNA®.

Cette étude a été réalisée en accord avec les bonnes pratiques de laboratoires, dans le cadre des soins courants. L'indication d'une chirurgie première ayant été validée en réunion de concertation pluridisciplinaire.

2.4 Matériels et méthodes

2.4.1 Type d'étude

La décision de mener une étude prospective s'est imposée comme étant la solution en réponse à deux contraintes essentielles.

La première, d'ordre technique, fait référence au mode de conservation des échantillons qui a une influence directe sur leur qualité. Les ARNm étant fragiles, l'intervalle de temps entre le prélèvement de l'échantillon et sa conservation doit être très court pour éviter leur dégradation (< 15 min). Ce paramètre essentiel n'était pas contrôlable en cas d'utilisation de prélèvements issus de la tumorotheque.

La seconde contrainte, est d'ordre réglementaire. Les fragments contenus dans la tumorotheque ne peuvent être utilisés pour la recherche que si les patients ont exprimé leur non opposition à leur utilisation.

2.4.2 Pré requis à l'étude

La première phase de cette étude a consisté à la mise en œuvre et la diffusion du formulaire de non opposition. Une procédure détaillée a été rédigée et validée par les différents services impliqués (le laboratoire de bio-pathologie, les unités de chirurgie cervico-faciale et de recherche clinique, le service qualité).

La non opposition du patient au prélèvement de tissu à visée scientifique était recueillie par le médecin lors de la première consultation sous la forme d'un formulaire daté et signé. (Annexe 4).

Cette procédure méthodologique mise en place avant le début de l'étude a été validée par un juriste et a servi de phase test pour la diffusion de ces formulaires à l'ensemble des spécialités de l'établissement où a eu lieu la recherche.

2.4.3 Les marqueurs moléculaires

6 marqueurs reconnus pour leur capacité à détecter des métastases ganglionnaires dans les carcinomes épidermoïdes des VADS ont été retenus :

- Le Pemphigus vulgaris antigen (PVA)
- Le Squamous cell carcinoma antigen (SCCA)
- L'Ephrin-type B receptor 4 (EphB4)
- L'Epidermal growth factor receptor (EGFR)
- Les Cytokeratines (CK) 17 et 19

2.4.4 Population

Au total 7 patients ont été inclus sur la période de janvier à mai 2012 au Centre Alexis Vautrin.

Parmi eux, 5 patients répondaient aux critères de sélection suivants :

- Présence d'un carcinome épidermoïde des VADS confirmé histologiquement (quelle que soit la taille de la tumeur primitive et sa localisation).
- Présence d'au moins une adénopathie clinique et/ou radiologique (critères morphologiques au scanner, hypermétabolisme au morphoTEP)
- Indication d'une chirurgie première, validée en réunion de concertation disciplinaire (RCP)
- Absence d'antécédent de cancer des VADS

Un bilan d'extension complet préopératoire associant une panendoscopie sous anesthésie générale et une imagerie (scanner cervico-thoracique, Morpho-TEP) a été réalisé.

Les caractéristiques histopathologiques pT et pN des patients sont répertoriées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques anatomopathologiques de la population

<i>Patient</i>	<i>Localisation tumorale</i>	<i>pT</i>	<i>pN</i>	<i>Rupture capsulaire</i>
1	Oropharynx	T1	N1	-
2	Oropharynx	T2	N2c	+
3	Cavité buccale	T3	N2c	+
4	Oropharynx	T2	N1	+
5	Cavité buccale	T3	N1	+

Une glande salivaire sous maxillaire a été prélevée sur un 6^{ème} patient lors d'une chirurgie reconstructrice à visée fonctionnelle avec reconstruction par lambeau infra-hyoïdien. Pour des raisons techniques, l'ablation de la glande salivaire est nécessaire pour la levée de ce lambeau.

Enfin, un ganglion bénin a été prélevé chez un 7^{ème} patient opéré d'une pathologie bénigne de la thyroïde. Ce ganglion a servi de référence pour toutes nos analyses.

2.4.5 Traitement des échantillons

2.4.5.1 Méthode de prélèvement

Les ganglions d'intérêt ont été repérés la veille de l'intervention par un nouvel examen clinique et relecture radiologique.

Afin d'éviter toute contamination du prélèvement par des cellules épithéliales d'origine épidermique, les instruments qui avaient servis lors de l'incision cutanée ont été changés, ainsi que les gants du chirurgien.

Une dissection chirurgicale soigneuse a été réalisée pour débarrasser au maximum les ganglions de la graisse et du tissu environnant. Les ganglions et la glande salivaire sous maxillaire ont été prélevés dans leur totalité. Un fragment de la tumeur d'origine a été systématiquement prélevé *ex vivo* à la pince à biopsie au centre de la tumeur, afin de ne pas gêner l'analyse des berges d'exérèse. Tous les prélèvements ont été rapidement adressés à l'état frais au laboratoire d'anatomopathologie (< 15 min).

2.4.5.2 Méthode de préparation et de conservation des échantillons

Après analyse morphologique des ganglions métastatiques, le médecin anatomopathologiste a prélevé un fragment de chaque (environ 0.5 cm) dans une zone macroscopiquement envahie et non nécrosée. Un fragment du ganglion sain et de la glande salivaire a également été prélevé. Les fragments tumoraux n'ont fait l'objet d'aucune manipulation spécifique. Tous ces prélèvements ont été congelés à -80°C. Tous ces prélèvements ont fait l'objet d'une analyse en histologie standard.

2.5 Méthodes d'analyse des échantillons

Après décongélation, une partie du matériel (ganglions métastatiques et ganglion sain) a été réservée pour l'analyse en OSNA®.

2.5.1 Analyse en qRT-PCR

L'analyse quantitative de l'expression des 6 gènes par RT-PCR en temps réel a été effectuée au niveau de la tumeur primitive, des ganglions métastatiques correspondants, du ganglion sain et de la glande salivaire.

- Récupération d'un lysat cellulaire à partir des prélèvements tissulaires

Un tampon de lyse a été préparé en mélangeant 45 ml d'une solution tampon RTL Plus et du β -Mercaptoéthanol (10 μ l pour 1 ml de RTL Plus). Chaque échantillon a été placé dans 500 μ l de cette solution tampon. L'extraction tissulaire a été réalisée au moyen d'un lyseur (Tissuelyser QIAGEN®) pendant 3 minutes à 30 cycles/secondes.

- Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN a été réalisée sur colonnes grâce aux kits AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN®, Allemagne). Une fois les ARN récupérés, ceux-ci ont été précipités grâce à 500 μ l d'une solution d'éthanol à 70%, puis centrifugés à 8000g pendant 1 minute.

Trois lavages successifs ont été réalisés grâce aux solutions tampon fournies avec le kit. Un premier lavage avec 700 μ l de la solution RW1, puis les deux suivants avec 500 μ l de la solution RPE.

Une centrifugation à 8000g pendant une minute a été réalisée après les deux premiers rinçages et la dernière à 20 000g pendant 1 minute. Deux éluions successives, chacune avec 30 μ l d'eau RNase-free, ont été réalisées avant une nouvelle centrifugation à 8000g pendant 1 minute.

Les ARN totaux dans chaque échantillons ont été quantifiés (Nanodrop 2000c™ spectrophotometer Thermoscientific®)

- Réaction de transcription inverse (RT)

Les tubes réactionnels ont été préparés en mélangeant une solution d'ARN diluée (1 μ g d'ARN pour 11 μ l d'eau nuclease free) avec une solution contenant 4 μ l de solution 5x iScript

Mix, 4µl d'eau et 1µl d'iScript réalisée à partir de kits fournis par la société BIO-RAD (iScript™ cDNA Synthesis BIO-RAD. Un tube blanc contenant 11µl d'eau nuclease free a servi de référence. Les tubes ont été placés dans le thermocycleur Mastercycler gradient Eppendorf® pendant 5mn à 25°C, 30mn à 42°C, 5mn à 85°C selon le protocole. Après la réaction de transcription inverse, les ADNc de chaque échantillons ont été répartis dans une plaque 96 puits (5µl d'ADNc/puits).

- PCR quantitative en temps réel

Tous les échantillons ont été testés en duplicata. Les kits de PCR ont été fournis par la société BIO-RAD, Californie iQ™ SYBR® Green Supermix. Chaque kit est constitué selon les indications du fabricant ; d'une solution tampon contenant un mélange de nucléotides (dNTPs), une DNA polymerase (iTaQ DNA polymerase), 6mM de MgC₂, l'agent SYBR Green I, la fluorescéine et des agents stabilisants.

Les amorces ont été fournies par la société Eurogentec, Belgique (Annexe 5). 1.5µl d'amorce sens et antisens ont été déposées dans chacun des puits avec 12.5µl de la solution précédente.

La lignée cellulaire FaDu issue de carcinome buccopharyngé a servi de référence pour l'analyse des résultats avec les différentes amorces testées.

De même, une analyse quantitative par RT-PCR d'un gène de ménage (la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase GAPDH) a été réalisée dans chacun des échantillons de l'étude. L'objectif, était de confirmer la présence d'ADNc au sein de l'échantillon et de sélectionner parmi les échantillons dupliqués le plus riche en ADNc.

Les plaques après centrifugation ont été déposées dans le thermocycleur iCycleriQ® BIO-RAD.

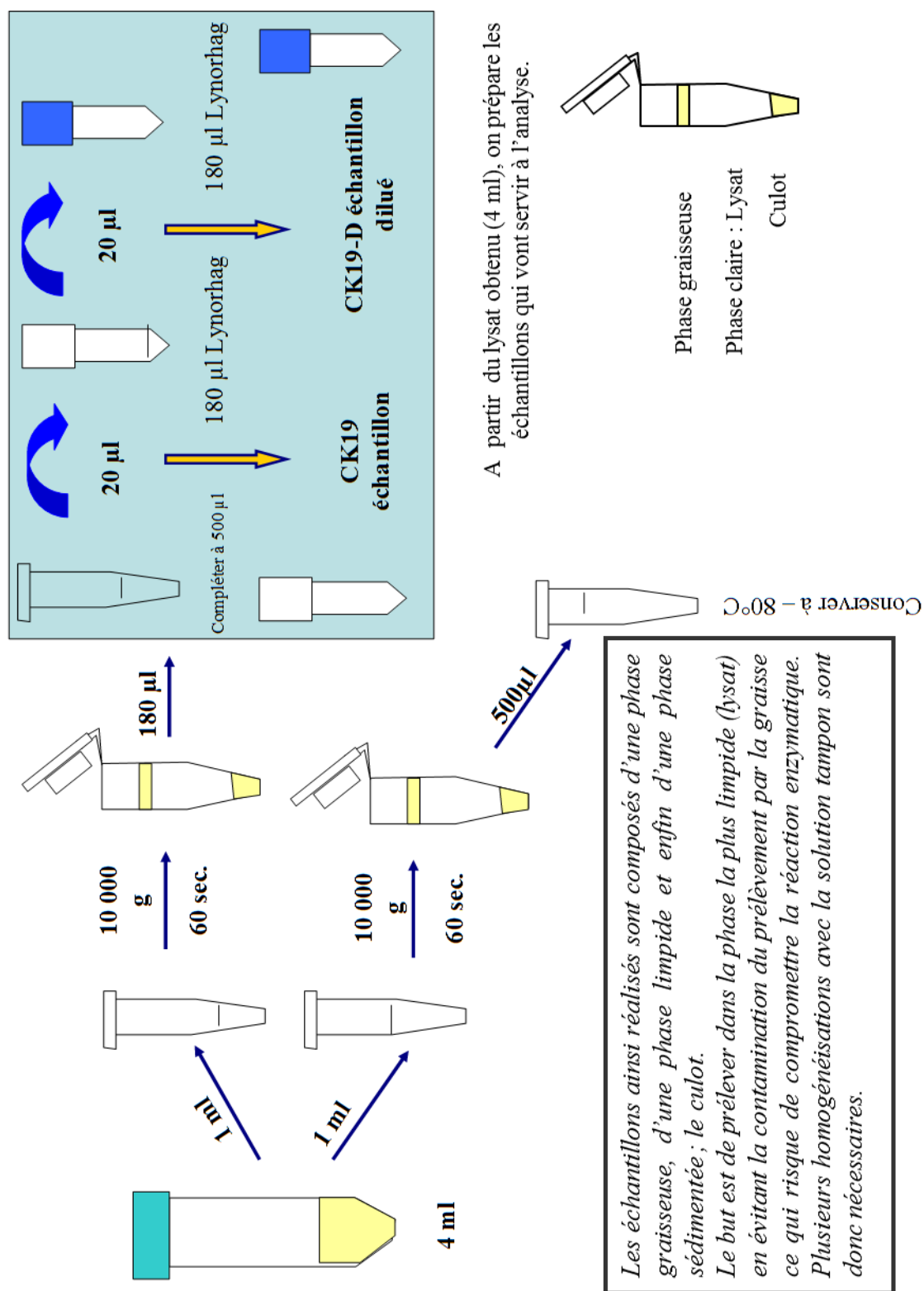


Figure 6 : Schéma de préparation des échantillons OSNA

La PCR a été programmée selon le protocole suivant :

Dénaturation : 95°C / 15 secondes

Hybridation : 60°C / 30 secondes

Elongation : 72°C / 30 secondes

Au total 40 cycles d'amplification ont été réalisés.

A la fin du programme de PCR, chaque couple d'amorce a été testé en analysant une courbe de fusion afin de vérifier la spécificité de la PCR.

2.5.2 Analyse en OSNA®

Le RD-100i® (Sysmex, Japon) est un système automatisé de détection en temps réel destiné au diagnostic des métastases ganglionnaires reposant sur la technologie OSNA®.

Avant utilisation, une calibration de la machine a été réalisée à l'aide des tubes fournis avec le kit : les tubes contrôle positif / CK-19PC (5.10^3 copies/ μ l de CK19mRNA), contrôle négatif / CK-19NC et les tubes de 3 solutions à différentes concentrations en ARNm de CK19 : C1 / (2.5×10^3 copies/ μ l de CK19mRNA) C2 / (2.5×10^5 copies/ μ l de CK19mRNA) C3 / (2.5×10^7 copies/ μ l de CK19mRNA). Une analyse en temps réel a permis de vérifier la concordance des courbes obtenues avec les paramètres d'étalonnage.

- Préparation des échantillons (Figure 6)

Après décongélation, les fragments de ganglions métastatiques ainsi que du ganglion sain ont été déposés chacun dans 4 ml d'un réactif spécial (Lynorhag, Sysmex®) puis homogénéisés au mixeur pendant 90 secondes sur un bac de glace pilée afin de stabiliser les molécules d'ARNm et de les protéger de l'activité ribonucléase. 1 ml de ce mélange a été prélevé et centrifugé afin d'éliminer au maximum la graisse riche en inhibiteurs de la PCR susceptibles de gêner la réaction.

Après centrifugation, 200 μ l de chaque solution ont été prélevés dans la phase la plus claire. Une dilution en cascade à partir d'une première dilution au $10^{\text{ème}}$ avec le réactif Lynorhag® a été réalisée.

Les réactifs (le contrôle positif, le contrôle négatif, le tube mix contenant les primers du gène de la CK19, le tube contenant la solution enzymatique : reverse transcriptase 500U/ml,

DNApolymerase 6 100U/ml), les échantillons ainsi que les cuves de mesure nécessaires au mélange ont été ensuite déposés dans l'unité de réaction du système RD-100i® selon les recommandations du fabricant.

L'amplification a duré en moyenne 15 à 20 minutes.

2.6 Résultats

2.6.1 Validation des amorces étudiées

L'analyse des courbes de fusion pour chacune des amorces testées met en évidence la présence d'un seul pic à une température déterminée confirmant ainsi la spécificité de la PCR (Annexe 6).

2.6.2 Résultats de l'analyse en qRT-PCR (Annexe 7)

2.6.2.1 Analyse globale de l'expression des différents marqueurs dans la population étudiée.

La comparaison du niveau d'expression des différents marqueurs dans la tumeur primitive, le ganglion métastatique et le tissu sain péri tumoral a été effectuée à partir de la moyenne des résultats des 5 patients. En raison d'une gamme étendue de valeurs, les résultats ont été représentés sous forme d'histogramme à échelle logarithmique (Figure 7).

Au niveau de la tumeur primitive, on observe une nette surexpression du SCCA ($7.3 \cdot 10^5$ pg/ μ l) et du PVA ($4.4 \cdot 10^4$ pg/ μ l) comparé à l'EphB4 (984 pg/ μ l), l'EGFR (242 pg/ μ l), la CK17 (775 pg/ μ l), et la CK19 (290 pg/ μ l).

Au niveau du ganglion métastatique on retrouve le même profil d'expression des marqueurs avec le SCCA ($1.1 \cdot 10^5$ pg/ μ l), le PVA ($2.5 \cdot 10^4$ pg/ μ l). Le taux d'EphB4 ($3.2 \cdot 10^3$ pg/ μ l) est 8 fois supérieur à celui de la CK19 (444 pg/ μ l) et 10 fois supérieur à celui de la CK17 (336 pg/ μ l). Le taux d'EGFR mesuré à $1.1 \cdot 10^3$ pg/ μ l est pratiquement le triple de celui des cytokératines 17 et 19.

Le niveau d'expression du SCCA et du PVA dans la tumeur primitive est supérieur à celui observé dans le ganglion métastatique Cette constatation est également vraie, pour la CK17.

L'inverse est observé pour l'EphB4, l'EGFR et la CK19. En effet, leur niveau d'expression dans le ganglion métastatique est plus élevé. Le taux d'ADNc d'EphB4 dans le ganglion

métastatique est 3 fois supérieur à celui de la tumeur d'origine. Cette tendance est encore plus marquée pour l'EGFR.

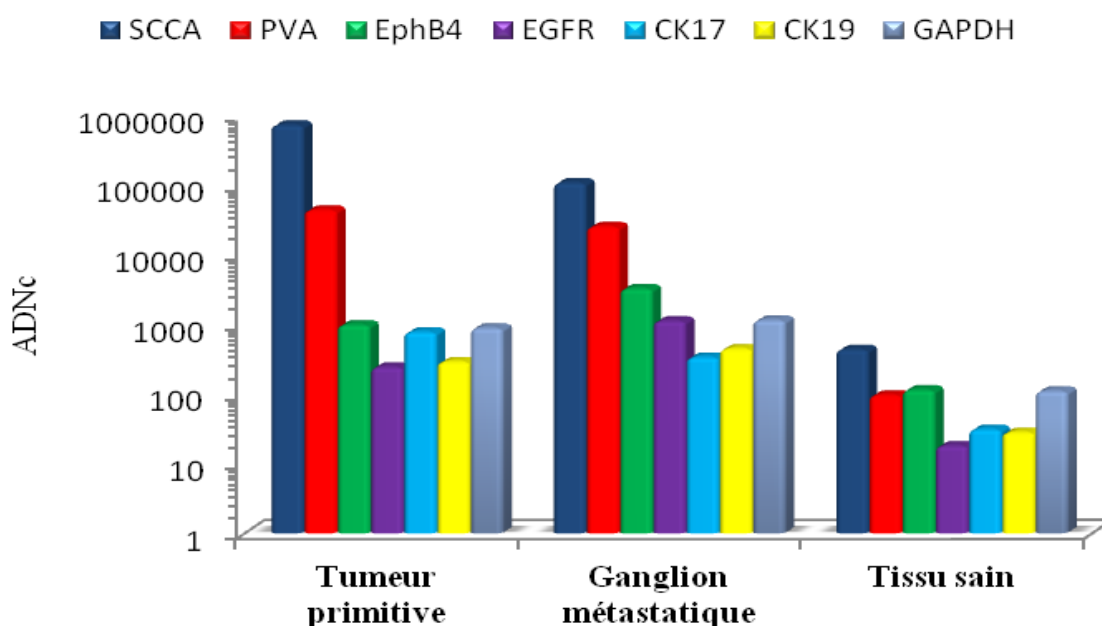


Figure 7 : Niveau d'expression moyen des marqueurs dans la tumeur primitive, le ganglion métastatique et le tissu sain péri-tumoral.

2.6.2.2 Niveau d'expression des marqueurs dans le ganglion bénin et la glande salivaire (Figure 8)

Les résultats montrent au niveau du ganglion sain, une expression quasi nulle du SCCA, du PVA et de la CK19 (respectivement 1.1 pg/μl, 0.09 pg/μl et 0.65 pg/μl). Cette expression est faible pour l'EGFR (306.6 pg/μl) et la CK17 (90 pg/μl). L'EphB4 est le marqueur le plus représenté (994 pg/μl).

Au niveau de la glande salivaire, le constat est le même avec une expression insignifiante de tous les marqueurs et nulle pour le SCCA. Ici encore, l'EphB4 est le biomarqueur le plus représenté (194.4 pg/μl versus 0.64 pg/μl pour le PVA, 22.4 pg/μl pour la CK19, 25 pg/μl pour l'EGFR, 2.4 pg/μl pour la CK17).

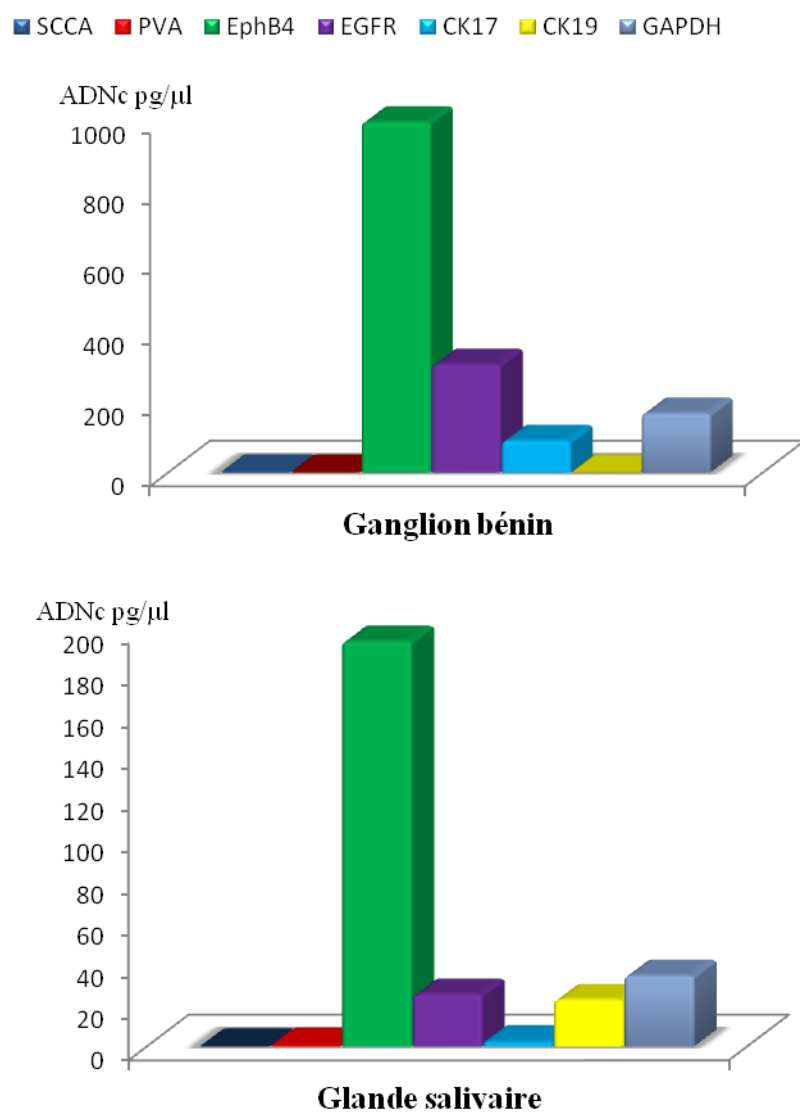


Figure 8 : Niveau d'expression des marqueurs dans le ganglion bénin et la glande salivaire

Au niveau de tissu sain péri tumoral on note une expression relativement faible de tous ces marqueurs avec le SCCA à 436 pg/μl, le PVA à 96 pg/μl, l'EphB4 à 114 pg/μl, l'EGFR à 18 pg/μl, la CK19 à 28 pg/μl, la CK17 à 31 pg/μl.

Cette première analyse fondée sur la moyenne des résultats de la population étudiée met en évidence un niveau d'expression disproportionné des marqueurs SCCA et PVA par rapport aux autres marqueurs largement moins représentés.

2.6.2.3 Profil d'expression individuel des marqueurs

Une analyse individuelle a été réalisée pour vérifier la conformité des résultats précédents.

Les résultats sont présentés sous la forme 3 histogrammes à échelle logarithmique (Figure 9).

Au niveau de la tumeur primitive, les conclusions émanant de l'analyse moyenne des résultats des 5 patients se confirment pour le SCCA et le PVA au niveau individuel.

L'EphB4 est le marqueur le plus exprimé après les deux précédents, sauf pour les patients 1 et 3 pour lesquels, le taux de CK17 est légèrement supérieur (respectivement $2.4 \cdot 10^3$ pg/ μ l versus $1.6 \cdot 10^3$ pg/ μ l et 722 pg/ μ l et 780 pg/ μ l).

Au niveau du ganglion métastatique, pour tous les patients de l'étude, le SCCA est le marqueur le plus représenté dans les ganglions métastatiques. Le PVA est le marqueur le plus exprimé après le SCCA, excepté pour les patients 2 (EphB4 : $7.3 \cdot 10^3$ pg/ μ l versus $1.6 \cdot 10^3$ pg/ μ l) et 4 (EphB4 : $2.4 \cdot 10^3$ pg/ μ l versus 452 pg/ μ l).

Pour le patient 5, le taux d'EGFR est identique à celui de l'EphB4 ($2.3 \cdot 10^3$ pg/ μ l).

Le profil d'expression des marqueurs dans la tumeur primitive et dans le ganglion métastatique apparaît relativement superposable pour tous les patients. Par exemple, le taux de CK 19 dans le cas du patient 5 est très faible dans la tumeur primitive (2.1 pg/ μ l) et dans le ganglion métastatique correspondant (0.4 pg/ μ l).

Le patient 3 est un autre exemple : les taux de PVA et de SCCA dans la tumeur primitive sont quasi-identiques, la même observation peut être faite au niveau du ganglion métastatique correspondant.

La tendance observée précédemment concernant un niveau d'expression plus élevé de l'EphB4 et de l'EGFR dans le ganglion métastatique se confirme pour tous les patients, à

l'exception du patient 1 (EphB4 : 722 pg/ μ l/tumeur versus 276 pg/ μ l/ganglion – EGFR : 230 pg/ μ l/tumeur versus 111 pg/ μ l/ganglion).

D'une manière générale, l'expression des marqueurs dans la tumeur et dans le ganglion métastatique du 4^{ème} patient est plus faible. La comparaison avec le gène de la GAPDH suggère une moindre quantité en ADNc de cet échantillon au départ.

Pour tous les patients, l'expression des marqueurs au niveau du tissu péri tumoral est insignifiante par rapport aux tissus tumoraux.

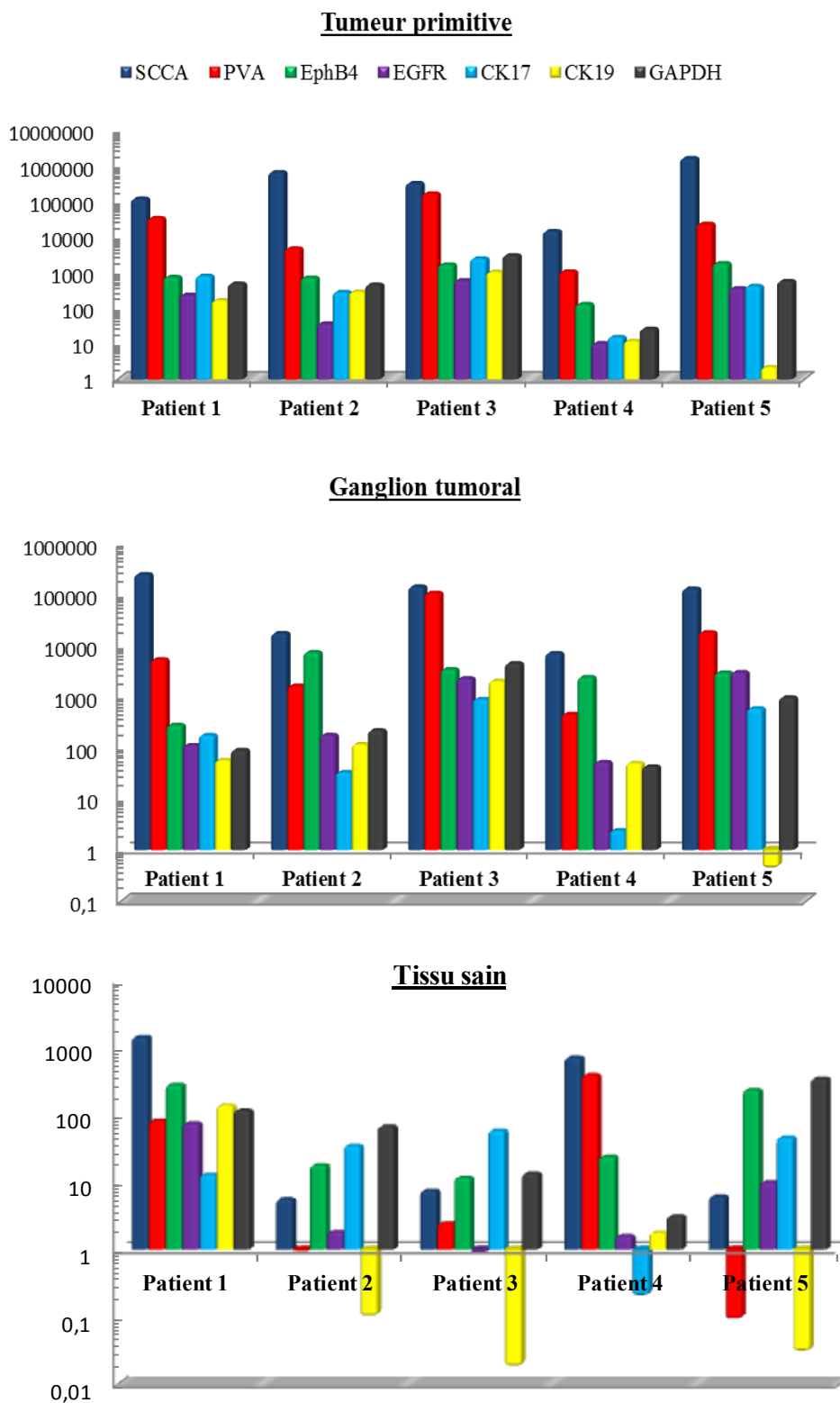


Figure 9: Profil d'expression individuel des marqueurs au niveau de la tumeur primitive , du ganglion métastatique et du tissu sain péri tumoral .

2.7 Résultats obtenus en OSNA

Les résultats sont exprimés en nombre de copies de CK19 ARNm / μ l.

Conformément à nos attentes, le seuil de détection de la CK19 n'a pas été atteint dans le ganglion sain ($< 2.5 \cdot 10^2$).

Dans deux des ganglions métastatiques étudiés, paradoxalement le test s'est révélé négatif, le nombre de copies étant inférieur à $2.5 \cdot 10^2$. Il s'agissait des prélèvements ganglionnaires réalisés chez les patients 4 et 5.

Pour les patients 1,2 et 3 le test s'est révélé positif avec respectivement $6 \cdot 10^5$ copies/ μ l, $1.1 \cdot 10^6$ copies/ μ l et $3.5 \cdot 10^6$ copies/ μ l.

2.8 Discussion

Les différents travaux de recherche, effectués sur les marqueurs tumoraux et leurs techniques de détection, ont rendu possible le repérage des cellules tumorales à distance de la tumeur primitive et notamment dans les adénopathies loco régionales. Le prérequis indispensable à une analyse biomoléculaire des métastases ganglionnaires est la détermination du (des) marqueur(s) tumoraux, qui peuvent être définis comme des molécules modifiées qualitativement ou quantitativement dans les cellules cancéreuses.

L'un des objectifs de cette étude était de mesurer, et comparer, par une méthode de RT-PCR quantitative en temps réel, le niveau d'expression dans les ganglions métastatiques de 6 gènes reconnus comme des marqueurs potentiels des carcinomes épidermoïdes des VADS : le SCCA, le PVA, l'EphB4, l'EGFR, les CK 17 et 19.

La technique de q RT-PCR utilisée dans cette étude apparaît fiable puisque ces marqueurs ont pu être révélés, et quantifiés dans la tumeur, le ganglion métastatique, et à un degré moindre dans le tissu péri tumoral, le ganglion sain, et la glande salivaire. Cette différence d'expression entre les tissus envahis et les tissus sains semble confirmer la surexpression de ces marqueurs dans les carcinomes épidermoïdes des VADS (Ferris, Xi et al. 2005; Masood, Kumar et al. 2006).

Une première analyse portant sur la moyenne des résultats obtenus, met en évidence une certaine disparité d'expression entre les différents marqueurs étudiés. En effet, le SCCA et le PVA présentent un niveau d'expression dans les tumeurs primitives et les ganglions métastatiques largement supérieur à celui des autres marqueurs. Même si l'EphB4, l'EGFR et les CK17 et 19, ont été retrouvés amplifiés dans la tumeur primitive et le ganglion métastatique par rapport aux tissus sains, le contraste est moins évident. Il est plus que probable que les cellules cancéreuses expriment effectivement de manière plus intense certains marqueurs que d'autres, cependant, la difficulté de détection de certains marqueurs peut être une explication plausible. Par ailleurs, le niveau d'expression insignifiant du SCCA et du PVA dans le ganglion sain par comparaison au ganglion métastatique, suggère un risque mineur d'obtenir un résultat faussement négatif. Ces deux marqueurs apparaissent dans cette étude les plus discriminants.

Le SCCA est un groupe de glycoprotéines de la famille des inhibiteurs de la sérine/cystéine-protéinase. Cette protéine à l'origine a été isolée à partir de métastases de carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus pour être ensuite utilisé comme marqueur sérologique des carcinomes à cellules squameuses des tumeurs du col de l'utérus, de la vulve, du poumon, de l'œsophage et des VADS (Kano, Shimada et al. 2000).

Le PVA (ou desmogleine 3) est un composant des desmosomes. Une surexpression de ces deux marqueurs dans les carcinomes épidermoïdes des VADS a été établie (Solassol, Burcia et al. 2010). L'expression constante de ces deux marqueurs, à un niveau élevé, dans le tissu tumoral et faible dans le tissu sain souligne la fiabilité et la sensibilité de ces marqueurs dans notre étude. Il est évident que pour confirmer ces résultats préliminaires, d'autres investigations sont nécessaires, notamment pour tester leur capacité à détecter des micrométastases et pour définir la valeur seuil à partir de laquelle le résultat est considéré positif.

Néanmoins, nos conclusions sont en adéquation avec celles publiées par Ferris. (Ferris, Xi et al. 2005). Dans cette étude, 40 marqueurs moléculaires ont été testés sur une série de 26 tumeurs primitives et 24 ganglions histologiquement envahis. Le PVA et le SCCA était considérés comme les marqueurs les plus discriminants pour détecter un envahissement ganglionnaire avec une excellente sensibilité (SCCA : 97%, PVA : 100%).

L'analyse individuelle des résultats est intéressante car elle apporte des renseignements sur le comportement des cellules tumorales lors de leur migration. En effet, il apparait que le profil d'expression des marqueurs dans la tumeur primitive est superposable à celui observé dans le ganglion métastatique. Cette observation est valable pour tous les patients inclus dans l'étude et suggère que lors de leur migration, les cellules tumorales ont conservé leur caractéristiques. Or, il a été démontré que leur phénotype varie en fonction du lieu où elles se trouvent. (Hanahan and Weinberg 2000). Il serait intéressant de pouvoir évaluer l'expression de tous ces marqueurs par les cellules tumorales circulantes. Plusieurs études ont montrées la possibilité de détecter ces CTC par RT-PCR quantitative (Ghossein and Bhattacharya 2000).

Paradoxalement, le niveau d'expression des marqueurs EphB4 et EGFR est plus élevé dans le ganglion métastatique que dans la tumeur primitive (excepté pour un patient). Ce profil d'expression a d'ailleurs déjà été décrit (Sinha, Kundra et al. 2003; Sinha, Mazhar et al.

2006). L'EphB4 appartient à la famille des récepteurs à tyrosine kinase ErbB/HER. Son influence dans la maturation et le remodelage des vaisseaux a été démontrée. L'EphB4 jouerait un rôle important dans la croissance et la migration des cellules tumorales, et son expression dans les carcinomes épidermoïdes des VADS serait généralement associée à un mauvais pronostic.

L'EGFR est une glycoprotéine transmembranaire possédant un domaine de liaison extracellulaire avec l'EGF et intracellulaire d'action contenant une tyrosine kinase. L'activation de l'EGFR induit divers phénomènes comme la prolifération et la différenciation cellulaire, une diminution de l'apoptose, de la mobilité cellulaire et enfin de la stimulation de l'angiogénèse (Cojocariu, Huguet et al. 2009). Pour sinah, il existe d'une relation directe entre l'EGFR et l'EphB4 dont l'expression serait induite par l'activation de l'EGFR. Le lien qui existe entre ces deux marqueurs explique probablement la singularité et la similarité de leur profil d'expression. La surexpression de l'EGFR dans les carcinomes épidermoïdes des VADS (80 à 90%) est une donnée bien établie puisqu'il est même utilisée comme cible moléculaire utilisée en thérapie cellulaire (anticorps monoclonal anti-EGFR cetuximab et anti HER1®) (Kalyankrishna and Grandis 2006). l'EGFR dans notre étude, ne faisait pas partie des marqueurs les plus exprimés.

Une amplification des CK 17 et 19 a pu être mise en évidence dans les tissus tumoraux, avec cependant, des taux moins élevés que pour les marqueurs précédents. Les CK appartiennent au groupe des filaments intermédiaires du cytosquelette des cellules épithéliales et sont de ce fait normalement absentes du tissu lymphoïde. L'utilité des CK dans le diagnostic histopathologique des carcinomes épidermoïdes des VADS est bien documentée. Plusieurs auteurs ont montré qu'il était possible d'établir un diagnostic d'envahissement ganglionnaire par qRT-PCR en dosant les copies mRNA des cytokératines (Hamakawa, Fukuzumi et al. 2000; Becker, Shores et al. 2004; Shores, Yin et al. 2004).

La CK17 a été choisie car elle est exprimée de manière forte dans les épithéliums kératinisants hyperprolifératifs. Il a été démontré que la CK17 pouvait être un excellent outil pour la détection des métastases ganglionnaires (Garrel, Dromard et al. 2006). La CK19 quant à elle fait partie des cytokératines les plus abondantes du tissu épithélial, elle est principalement exprimées dans la couche basale de l'épithélium stratifié orale. Même si une surexpression de la CK19 dans les ganglions cervicaux envahis a été démontrée (Garrel, Dromard et al. 2006; Toyoshima, Vairaktaris et al. 2008; Toyoshima, Koch et al. 2009) son

intérêt serait pour certains auteurs limité. En effet, il semblerait que le principal inconvénient de cette molécule soit son manque de sensibilité, notamment pour la détection des micrométastases. (Ferris, Xi et al. 2005). Ces conclusions conduisent naturellement à réfléchir quant à une éventuelle application la méthodologie OSNA® dans les carcinomes épidermoïdes des VADS.

L'un des objectifs de notre étude était de vérifier à partir des échantillons de ganglions métastatiques et du ganglion sain, la concordance des résultats avec l'histologie standard. Deux patients sur 5, ont eu résultat faussement négatif avec un nombre de copies d'ARNm de la CK19 inférieur au seuil de détection. L'interprétation de ces résultats peut être une faible expression de la CK19 dans la tumeur primitive de ces patients. L'analyse en qRT-PCR de la CK19 pour ces 2 patients semble confirmer ces données. De façon prévisible, l'analyse en OSNA® du ganglion sain s'est révélée négative.

Une très récente publication rapporte des résultats tout à fait encourageants de la méthode OSNA® pour la détection des métastases ganglionnaires dans les carcinomes épidermoïdes des VADS (Goda, Nakashiro et al. 2012). Le principal objectif de cette étude était de démontrer la fiabilité de la technique dans ces indications. Dans cette étude, 312 ganglions provenant de 65 patients différents ont été analysés en OSNA® et comparé à une étude histologique standard et en immunohistochimie.

La valeur seuil retenue dans cette étude était de 300 copies/ μ l d'ARNm de la CK19. Le taux de concordance avec l'examen standard de référence (IHC-CS) était de 94.2%.

L'un des principaux écueils lié à l'utilisation de la CK19 comme marqueur moléculaire dans les carcinomes épidermoïdes des VADS tient à la présence possible de reliquats épithéliaux dans les ganglions cervicaux pouvant donner à tort un résultat positif. Ce risque est cependant faible car moins de 1.6% des ganglions cervicaux seraient concernés et exclusivement ceux du groupe sous mental (groupe 1A) (Hamakawa, Fukuzumi et al. 2000). Le tissu salivaire exprime de manière naturelle les cytokératines. La présence de tissu ectopique salivaire au sein d'un ganglion ou la contamination d'un ganglion par du tissu salivaire (proximité des glandes salivaires des premiers relais ganglionnaires sous mental et sous digastrique) lors de l'analyse sont des éventualités. Dans ce dernier cas, une dissection chirurgicale soigneuse peut réduire ce risque. Par ailleurs, la quantité de tissu salivaire en cas de contamination est très certainement infime, inférieure au seuil de détection et ne serait

probablement pas à l'origine de faux positifs (Ogawa, Tsurusako et al. 1999). Ceci semble se confirmer dans notre étude par un très faible niveau d'expression des CK17 et 19 dans la glande salivaire. Il est à noter que la présence de SCCA au sein de la glande salivaire n'a pu être établie, ce qui constituerait une qualité supplémentaire de ce marqueur.

Les principales limites de notre étude sont d'ordre méthodologique, avec des analyses réalisées sur des petits fragments de ganglions et non sur la totalité. Ce biais peut expliquer la présence de faux négatifs en OSNA®. En raison du faible échantillonnage, cette étude ne permet pas d'aboutir à des conclusions. Malgré tout, les résultats préliminaires apparaissent cohérents et d'autres investigations à plus grande échelle sont prévues et permettront certainement de les confirmer.

2.9 Conclusion

Cette étude montre la faisabilité de l'analyse des GS par une technique de biologie moléculaire. Parmi les marqueurs étudiés, nous confirmons l'intérêt du SCCA et PVA.

La CK19 dans notre étude n'apparaît pas être le marqueur le plus performant cependant, la technique OSNA représente une avancée technique importante avec un temps d'analyse réduit par rapport à la q RT-PCR ce qui justifie à nos yeux une évaluation plus approfondie de la technique. L'idéal serait très certainement de pouvoir envisager la technologie OSNA en utilisant d'autres marqueurs que la CK19 comme le SCCA ou encore le PVA.

On constate une expression augmentée du marqueur EphB4 entre les ganglions et la tumeur primitive.

Chapitre III

Recherche des cellules tumorales disséminées dans les drains de Redon après curage cervical

3.1 Recherche des cellules tumorales disséminées dans les drains de Redon après curage cervical

Le chapitre III vous est détaillé dans l'article suivant portant sur la recherche des cellules tumorales disséminées dans les drains de Redon après curage cervical. Article accepté et publié dans la revue European Archives of Oto-Rhino-Laryngology jan 2015.

La dissémination des cellules tumorales est un phénomène commun aux cancers solides. On a retrouvé dans les cancers de la moelle osseuse des cellules tumorales disséminées (DTCs), et dans la circulation sanguine des cellules tumorales circulantes (CTCs), dans des situations non métastatiques.

Des études sur les cancers du colon, de la prostate, et du sein ont retrouvé soit des DTCs, soit des CTCs. Mais aucune étude n'a été réalisée pour la recherche de ces cellules dans les cancers des VADS.

Dans notre étude, nous avons recherché la présence de DTCs dans les drains de Redon après curage cervical avec la méthode cellsearch.

3.2 Introduction

La cause de décès chez les patients atteints de cancers est la dissémination métastatique.

Une métastase est la formation de foyers tumoraux secondaires en lien avec la capacité des cellules tumorales à se détacher de la tumeur primitive, à s'implanter dans un organe et à proliférer.

Les CTCs sont des cellules tumorales issues de la tumeur primitive, se retrouvant dans la circulation sanguine spontanément ou après chirurgie.

Les DTCs sont des cellules issues de la tumeur primitive, se retrouvant au niveau du site opératoire.

Le but de cette étude est de rechercher la présence de DTCs dans les drains de Redon après curage cervical pour cancer de la tête et du cou.

3.3 Patients et méthodes

14 patients ont été inclus dans notre étude, 12 présentant un CE des VADS, 2 un adénocarcinome.

Ils ont bénéficiés d'un curage cervical (uni ou bilatéral) et pose de drains de Redon.

La recherche de DTCs a été réalisée sur les drains entre un et 3 jours après la chirurgie.

Le contenu du drain a été analysé par la méthode cellsearch, approuvée par la « Food and Drug Administration ».

3.4 Résultats

On a retrouvé des DTCs chez 9 des 13 patients (3 - 2094DTC/7.5mL).

On a observé 2 types d'images morphologiques différentes, distinguant l'adénocarcinome du CE, les 2 confirmant le caractère tumoral de ces cellules de par leur caractéristiques : un noyau coloré en violet (DAPI), marqueur CD45 négatif (éliminant l'hypothèse d'une cellule leucocytaire), CK8 CK18 et CK19 positifs.

3.5 Conclusion

Notre étude a effectivement montré la possibilité de détecter les DTCs dans les drains de Redon jusqu'à 3 jours après la chirurgie.

On peut se poser la question de l'origine des DTCs : proviennent-ils du site de la tumeur primitive ? Du site ganglionnaire ?

Dans notre série, un patient qui dénombrait 2094 DTCs, présentait un cancer T4N0M0 avec embolies vasculo-lymphatiques après analyse anatomopathologique.

Les DTCs proviennent donc probablement de la tumeur primitive par l'intermédiaire des vaisseaux lymphatiques.

Des études futures pourront démontrer l'impact des DTCs et leur valeur pronostique sur la formation de métastases.

Detection of disseminated tumor cells in aspirative drains after neck dissection

HEAD AND NECK

R. Mastronicola · C. Berteau · Q. Tu · S. Cortese · J. Guillet ·
B. Phulpin · P. Gangloff · L. Bezdetnaya · J-L. Merlin ·
G. Faure · G. Dolivet

Received: 24 November 2014 / Accepted: 20 January 2015

◆ Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract The dissemination of individual tumor cells is a common phenomenon in solid cancers. Detection of tumor cells in bone marrow disseminated tumor cells (DTC) and in peripheral blood circulating tumor cells (CTC) in non-metastatic situation is of high prognostic significance. Compared to breast, colon and prostate cancers, the studies on CTC and DTC in head and neck cancers are sparse. The objective of our study was to detect DTC in drains after neck dissection. Fourteen patients undergoing surgery for stages III and IV head and neck cancers were enrolled in this study—twelve presenting with squamous cell carcinoma and two with adenocarcinoma. Redon drain analysis was performed by the Cellsearch method using immunomagnetic and fluorescence approaches. A positivity

threshold value was set at 2DTC/7.5 ml of the sample. Tumor cells were detected in drains of 69 % of patients a few days after surgery. The range of quantification was 3–2,094 DTC/5 ml and we showed morphological differences between the two types of carcinoma cells. DTC were detected after neck dissection both in squamous cell carcinoma and in adenocarcinoma. Potential clinical significance of tumor cells needs to be further investigated as their presence could affect pre-surgical and post-operative treatments.

Keywords : Head and neck cancer; Disseminated tumor cells; Redon drains; Cellsearch method .

France e-mail: r.mastronicola@nancy.unicancer.fr

Introduction

Despite significant progress in cancer therapies, metastasis is still one of the major causes of cancer deaths. After downregulation of cell adhesion molecules inducing loss of cell–cell and cell–matrix adhesion, cancer cells turn into invasive phenotype with increased motility [1]. Various de-and-di-differentiation processes allow tumor cells to spread and to disseminate by hematogenous and lymphatic ways [2]. These cells, termed circulating tumor cells (CTC), detach from the primary tumor and can be found in the bloodstream spontaneously or during/after surgical resection [3]. Assuming that the release of CTC into the peripheral blood is the first stage of metastasis dissemination, cancer cells detection may be used as a predictive tool to evaluate the risk of generating metastasis [4]. Therefore, the assessment of CTC into peripheral blood as a “liquid biopsy” represents an attractive noninvasive alternative to tissue biopsies [5, 6]. The thorough characterization of tumor cells in “liquid biopsy” can provide better cancer

management, moving towards more personalized cancer treatments [7, 8]. In clinical settings, the DTC detection could be a useful tool for therapeutic response assessment and for patients follow-up.

Medical management of head and neck cancer includes, in most cases, a surgical treatment as the earliest step. However, surgical effect on tumor cell dissemination is poorly known and only few studies demonstrated the presence of disseminated tumor cells (DTC) into the surgical site [1, 3]. Likewise, the effect of aspirative drains placed into operating field at the end of surgery is still questioned. Many studies have been conducted on CTC and DTC in breast, colorectal and prostate cancer [3, 9] but only few on head and neck cancers [10]. The aim of the present study was to investigate the presence of DTC in the neck dissection drains after head and neck surgery. DTC detection and quantification was assessed by the Cellsearch system, using immunomagnetic and fluorescence approaches.

Materials and methods

Patient's characteristics

A total of fourteen patients (11 males and 3 females) were enrolled in this study. The study was approved by Research Ethics Committee of Institut de Cancérologie de Lorraine (ICL), Nancy, France. All patients signed consent to be enrolled in the study. They underwent head and neck surgery at the ICL between July 2012 and August 2013—twelve of them presenting with HNSCC and two with cervical metastasis of adenocarcinoma. The median age was 64 (37–84). Concerning the cancer stage, three patients were T2N2M0, one patient was T3N3M0 and ten patients T4N0–3M0. We recorded information about risk factors (alcohol and tobacco), history of cancer and prior cancer treatments (surgery, chemotherapy, radiotherapy). The outcome data included surgery type, margins, tumor histology and lymph node invasion (Table 1). The Redon drains samples were taken off 1 day after surgery in all patients except Patient 12, for whom analysis was performed within 3 days after collection.

Disseminated tumor cells detection

We used the Cellsearch system (Veridex) to detect Disseminated Tumor Cells into the surgical site drainage. This method, using image cytometry, provides information for the prognosis and monitoring of patients with breast, prostate or colorectal cancer and this is the only one approved by the Food and Drug Administration for Circulating Tumor Cells detection.

Cellsearch analysis was selected for its accuracy, sensitivity and reproducibility in tumor cells detection and count. This semi-automated method combines CellTracksAutoPrep and CellTracks Analyzer II. In the absence of detection kit for head and neck cancer, we have opted for the CellSearch Epithelial Cell Kit.

Four bottles of Redon drainage (650–700 mmHg) were collected for each patient and filtered before analysis. Afterwards, 5 ml samples were drawn into the CellSave Preservative Tubes (Veridex) and were stored at room temperature up to 96 h. 5 ml of dilution buffer was added and samples were spun at 800× g for 10 min. Then, samples were placed on the CellTracksAutoPrep System. After plasma removal, we performed an immunomagnetic selection using ferrofluid particles coated with EpCAM antibodies. Thanks to this step, unbound cells and plasma were excluded and tumor cells were enriched. Permeabilization buffer (necessary for cytokeratins staining) and fluorescent reagents were added to the remaining EpCAM-positive cells. Fluorescent reagents included acid nucleic staining (DAPI 4', 6'-diamidino-2-phenylindole) for nuclear labeling, anti-cytokeratin (CK 8, 18, 19) to detect epithelial cells and allophycocyanin conjugated anti-CD45 antibodies for leukocyte exclusion. Samples were transferred on a magnetic cartridge called MagNest for 12-hour incubation in the dark.

The filled cartridge was placed on the CellTrack Analyzer II. Thanks to the magnetic field, oriented cells were ready for analysis. CellTrack Analyzer II consists of a semi-automated fluorescence microscope which screens the MagNest surface. Then, the software detects, captures and displays images of the four-color fluorescent cells on the computer screen. The last selection step is made by the operator, he has to confirm and manually count tumor cells. Indeed, a disseminated tumor cell is defined by several criteria: positive nuclear staining (DAPI—purple), cytokeratins positive expression (green) and CD-45 negative staining. According to Allard et al. [11], the test was considered as positive when there were two or more tumor cells per 7.5 ml drain sample.

Results

Fourteen patients were included in our study. All of them underwent surgery for a head and neck cancer. Per-operative analysis confirmed cancer type—twelve of them (86 %) suffered from HNSCC (patients 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14) and the two remaining patients had an adenocarcinoma (14 %).

The Redon drains were collected and analyzed as described above ("Materials and methods" section). The Cellsearch preparation step has failed for Patient 9 that is

Table 1 Showing preoperative data

	Tumor site	TNM	Margins	Lymph node	Histology	Vascular invasion	Perineural invasion	DTC/7.5 ml
1	Soft palate	T3N3M0	Neg	L: N+R+ R: N0	Poorly diff SCC	Yes	Yes	0
2	Floor of mouth	T4N2cM0	Neg	L: N+R+ R: N+R+	Highly/moderately diff SCC	Yes	No	7
3	Tongue base	T4N0M0	Neg	L: N+ R: N+	Highly diff SCC	Yes	Yes	2,094
4	Floor of mouth	T4N3M0	Neg	L: N+R+ R: N+R+	Moderately diff SCC	Yes	Yes	0
5	Oropharynx	T2N2bM0	Neg	L: N+R+ R: N+	Basaloid SCC	NA	NA	242
6	Floor of mouth	T4N2cM0	Neg	L: N+R+ R: N+R+	Highly diff SCC	Yes	Yes	0
7	Soft palate	T4N1M0	Neg	L: N+ R: N+R+	Moderately diff SCC	Yes	No	18
8	Lateral oropharynx	T2N2bM0	CIS	L: N+ R: N+R+	Moderately diff SCC	Yes	Yes	0
9	Floor of mouth	T4N2cM0	Neg	L: N+R+ R: N+R+	Highly diff SCC	No	No	Failed
10	Ethmoid cancer cervical metastasis	T4N2bM0	NA	R: N+R+	Adenocarcinoma	No	Yes	225
11	Breast cancer cervical metastasis	T2N2cM0	NA	L: N+R+	Adenocarcinoma	NA	Yes	3
12	Piriform sinus	T4N2cM0	Neg	L: N+R+ R: N+R+	Highly diff SCC	Yes	Yes	37
13	Hemi-tongue	T4N3M0	Neg	L: N+R+ R: N+R+	Highly diff SCC	Yes	Yes	18
14	Hypopharynx	T4N3M0	Pos	L: N+R+	Highly diff SCC	Yes	Yes	903

neg = negative, *pos* = positive, *CIS* carcinoma in situ, *NA* not applicable, *L* Left, *R* Right, *N*+/- lymph node positive or negative, *R*+/- lymph node with or without capsular invasion, *diff* differentiate

why we used a total of 13 patients for DTCs detection. After performing the Cellsearch analysis, DTC were not detected for 4 patients (31 %). A positive result (≥ 2 DTC/7.5 ml of sample) was obtained for nine other patients (69 %). Among these nine patients, two of them were T2N2b-cM0 (range 3–242 DTC/7.5 ml) and seven were T4N0-3M0 (7–2,094 DTC/7.5 ml). It should be noted that DTC were detected in drain samples from both HNSCC and adenocarcinoma patients. Composite images (Fig. 1) of DTC, found in Patient 5 (SCC) (Fig. 1a) and in Patient 10 (adenocarcinoma) (Fig. 1b), show morphological differences between these two DTC types. DTC from adenocarcinoma are round and homogeneous whereas DTC from squamous cell carcinoma display various shapes. CK fluorescent labeling is deeper in DTC from SCC than that from adenocarcinoma patients. Furthermore, we found Circulating Tumor Microemboli (CTM), also termed micrometastasis, in SCC patient samples only.

Discussion

Metastasis formation is likely to be guided by tumor cells dissemination and thus the detection of disseminated tumor cells could improve cancer medical management and in fine survival [12]. Those cells, disseminated into secondary and distant organs, can be found after completion of primary tumor treatment. This mechanism, termed Minimal Residual Disease, could be one of the main causes of relapse and survival reduction after treatments [13].

The present study clearly demonstrated the feasibility of tumor cells detection in Redon drains near to the surgical site. DTC were found in 69 % patients undergoing surgery for head and neck cancer. The per-operative test was positive in all these patients (≥ 2 DTC/7.5 ml of sample) with a range of 3–2,094 DTC/7.5 ml of sample. Detection of tumor cells into Redon drains samples supports early

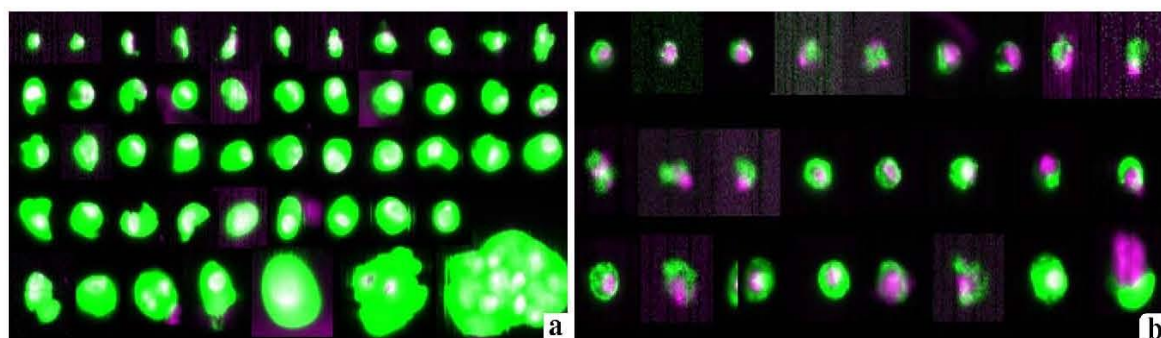


Fig. 1 Composite images of DTC from squamous cell carcinoma patient (a) and DTC from adenocarcinoma patient (b) obtained using Cellsearch system. These images show morphological differences

between Disseminated Tumor Cells from squamous cell carcinoma and adenocarcinoma

cell dissemination. Our results on DTC detection in aspirative drains are consistent with those already demonstrated in pancreas cancer [14]. In accordance with several studies which have shown the DTC presence into the bone marrow and lymph nodes [10, 15], we can deduce that the primary invasive tumor can spread the transformed cells into secondary organs and tissues.

Currently, different methods are used to assess DTC in bone marrow including immunocytochemistry and reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) as the most popular techniques [15]. Nevertheless, due to the very low frequency of DTC in bone marrow, the sensitivity of the detection becomes an issue and only few data on DTC detected at the surgical site are available. Albeit, the Cellsearch method was proposed for the blood samples, we managed to perform reproducible Cellsearch analysis using the drain sample preparation similar to that of blood samples, except for the filtration step. We note that drain samples analysis allowed the detection of DTC in two carcinoma types. Although the Cellsearch system is usually used for the detection of squamous cells, we have also succeeded in finding adenocarcinoma tumor cells. Our results have shown significant morphological differences between the two tumor cell types. It is important to note that drain samples contamination with epithelial cells should be excluded since we never observed a pattern of healthy epithelial cells.

Throughout this study, we also collected for each patient, information about risk factors, history of cancers, tumor stage and histology, surgery type and lymph node invasion (data not shown). However, we failed to correlate any of these factors with DTC detected in aspirative drains. Future clinical studies are warranted to investigate if there is the potential clinical significance of disseminated tumor cells in aspirates from surgical drains after neck dissection.

In conclusion, the present paper demonstrated the possibility to detect DTC in wound aspirates after head and neck surgery.

Conflict of interest None.

References

1. Yilmaz M, Christofori G (2010) Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res* 8:629–642
2. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K (2012) Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev* 31:673–687
3. Sandri MT, Zorzino L, Cassatella MC, Bassi F, Luini A, Casadio C et al (2010) Changes in circulating tumor cell detection in patients with localized breast cancer before and after surgery. *Ann Surg Oncol* 17:1539–1545
4. Liberko M, Kolostova K, Bobek V (2013) Essentials of circulating tumor cells for clinical research and practice. *Crit Rev Oncol/Hematol* 88:338–356
5. Van de Stolpe A, Pantel K, Sleijfer S (2011) Circulating tumor cell isolation and diagnostics: toward routine clinical use. *Cancer Res* 71:5955–5960
6. Pierga JY, Hajage D, Bachelot T, Delaloue S, Brain E, Campone M et al (2012) High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol* 23:618–624
7. Balic M, Williams A, Lin H, Datar R, Cote RJ (2013) Circulating tumor cells: from bench to bedside. *Annu Rev Med* 64:1–17
8. Krebs MG, Hou JM, Ward TH, Blackhall FH, Dive C (2010) Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther Adv Med Oncol* 2(6):351–365
9. Kaifi JT, Kunkel M, Zhu J, Dicker DT, Gusani NJ, Yang Z et al (2013) Circulating tumor cells are associated with diffuse spread in stage IV colorectal cancer patients. *Cancer Biol Ther* 14(12):1–8
10. Stoecklein NH, Hosch SB, Bezler M, Stern F, Hartmann CH, Vay C et al (2008) Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell* 13:441–453
11. Allard WJ, Matera J, Miller MC et al (2004) Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with non malignant diseases. *Clin Cancer Res* 10:6897–6904
12. Joyce JA, Pollard JW (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9:239–252
13. Gath HJ, Brakenhoff RH (1999) Minimal residual disease in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 18:109–126

14. Ishikawa O, Wada H, Ohigashi H, Doki Y, Yokoyama S, Noura S et al (2003) Postoperative cytology for drained fluid from the pancreatic bed after “curative” resection of pancreatic cancers: does It predict both the patient’s prognosis and the site of cancer recurrence? *Ann Surg* 238:103–110
15. Siddappa CM, Watson MA, Pillai SG, Trinkaus K, Fleming T, Aft R (2013) Detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients using multiplex gene expression measurements identifies new therapeutic targets in patients at high risk for the development of metastatic disease. *Breast Cancer Res Treat* 137:45–56

Chapitre IV

**Recherche des cellules tumorales circulantes après
acte chirurgical pour carcinomes epidermoïdes des
VADS stade III et IV**

4 Recherche des cellules tumorales circulantes après acte chirurgical pour carcinomes épidermoïdes des VADS stade III et IV

4.1 Hypothèse de travail et objectifs du travail

La recherche des CTCs a été bien étudiée pour les cancers du sein, de la prostate, du colon, du poumon, mais peu dans les CE des VADS . Ces études ont notamment permis de mettre en évidence des marqueurs ciblés pour ces localisations tumorales mais pas pour CEVADS. Sachant que 90% des cancers des VADS sont d'origine épidermoïde, nous nous sommes particulièrement intéressés à 9 molécules exprimées par ces cancers BphB4, Elf3, CEA, CK18, CK19, Ep-CAM, EGFR, PVA, SCCA, GAPDH (gène de référence).

L'objectif de cette étude est de détecter la présence des CTCs de CEVADS aux stades III et IV, et d'évaluer leur taux de variation dans la circulation sanguine avant, pendant et après un acte chirurgical .

Le deuxième objectif est de comparer les résultats obtenus par l'intermédiaire de deux techniques différentes: la RT-PCR et le CellSearch, un automate qui a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) pour la détection des cellules tumorales circulantes dans le cancer du sein métastatique. De nombreuses études ont été réalisées sur les CTCs du cancer du sein, du colon ou encore de la prostate mais très peu sur les CEVADS. L'analyse des CTCs dans ces pathologies permet d'envisager un diagnostic plus précoce et d'adapter des modalités thérapeutiques.

Nous allons évaluer l'utilisation de la détection des cellules tumorales circulantes au décours de l'acte chirurgical comme marqueur pronostique de la rechute locale, régionale et/ou métastatique des CEVADS de stades III et IV.

Ce protocole nous permettra de valider la recherche des CTCs en situation clinique et de développer par la suite des études prospectives diagnostiques et pronostiques des CTCs.

Pour répondre à ces objectifs nous avons donc écrit un protocole de recherche clinique qui a été validé et accepté par le Comité de protection des personnes (CPP) de Lorraine (annexe CTC VADS pag)

4.2 Patients et méthodes

Quarante patients ayant un cancer des VADS stade III ou IV avant chirurgie ont été inclus dans notre protocole (après autorisation du comité de protection des patients voir annexe 8). Le diagnostic était radiologique. Tous les patients étaient considérés comme opérables et n'avaient aucun antécédent sur le plan carcinologique (chirurgie, radiothérapie et/ou chimiothérapie).

Ils ont signé un consentement pour l'inclusion dans le protocole CTC VADS (voir annexe 9-10).

Tous les patients présentaient un carcinome épidermoïde : 26 un carcinome épidermoïde bien différencié, 9 moyennement différencié, et 5 peu différencié.

3 patients ne présentaient pas d'intoxication tabagique, 4 une intoxication tabagique sevrée depuis 15 ans.

14 patients ne présentaient pas d'intoxication éthylique.

Parmi les localisations tumorales des VADS, 10 patients présentaient un cancer au niveau du larynx, 12 de l'oropharynx, 11 de la cavité buccale, et 7 au niveau du pharyngo-larynx.

Ils ont bénéficié d'un bilan pré-thérapeutique d'extension tumorale classique: un scanner cervico-thoracique avec injection de produit de contraste, un FDG-PET-scanner +/- une IRM environ 30 jours avant la prise en charge thérapeutique; ainsi qu'une panendoscopie des VADS dans les 15 jours avant, afin de conforter la prise en charge

chirurgicale. Tous les patients présentaient un carcinome épidermoïde cliniquement opérable (figure 10).

Une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) validait la prise en charge des patients environ huit jours avant la chirurgie. Lors de l'hospitalisation trois prises de sang étaient effectuées pour chacun d'eux : avant, pendant et après la chirurgie carcinologique.

Les marqueurs utilisés en qRT-PCR avec Sybr®Green, après relecture et analyse de la littérature, étaient CK 18, CK 19, EphB4, Elf3, CEA EGFR, GADH PVA, SCCA , Ep-CAM(voir chapitre marqueurs). Pour le système CellSearch nous utilisons le kit épithelial de Veridex® .

Le CellSearch est une technique semi-automatisée permettant de détecter les cellules tumorales circulantes, grâce à un kit spécial La première prise de sang était effectuée la veille de la chirurgie, la deuxième 2 heures après et la dernière à 7/8 jours de la chirurgie.

Scanner ORL Thorax 18FDG-PET-CT +/-IRM	Panendoscopie	RCP	Première prise de sang	Chirurgie	Deuxième prise de sang	Troisième prise de sang
J-30	J-15	J-8	J-1	J	J+2H	J+8

Figure 10 Protocole utilisé

4.2.1 Le matériel biologique

L'extraction était réalisée avec un Kit QIAGEN (annexes 11)

4.2.2 Mesure de la concentration en ARN totaux extrait

La mesure de la concentration a été réalisée sur NanoVue plus (annexes 13)

4.2.3 RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) en temps réel

La synthèse d'ADNc est obtenue par l'action d'une transcriptase inverse (annexes 12-14). Il s'agit d'une enzyme ADN polymérase ARN dépendante capable de synthétiser de l'ADNc à partir d'un brin ARN comme matrice. S'agissant d'une ADN polymérase, la transcriptase inverse a besoin d'une amorce possédant une extrémité 3'-OH libre car elle ne peut initier seule la synthèse d'un brin d'ADN. Le kit utilisé est le iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD, Marne La Coquette, France voir annexe). Il contient l'enzyme reverse transcriptase ainsi qu'une solution contenant un mélange d'oligo-dT servant d'amorces et de l'eau nuclease-free. Après préparation du mélange réactionnel, les tubes sont placés dans un thermocycleur (Eppendorf, Le Pecq, France) et incubés 5 minutes à 25°C puis 30 minutes à 42°C, 5 minutes à 85°C et enfin refroidis à 4°C. De l'ADNc est obtenu et peut servir à la réalisation de la PCR.

Le principe de la PCR est de réaliser une succession de réactions d'amplification. Les produits d'amplification de chaque étape servent de matrices aux étapes suivantes. Tout d'abord, la Taq polymérase permet de synthétiser le second brin d'ADNc en utilisant le premier brin comme matrice. La PCR sert ensuite à amplifier le fragment d'ADNc. Le mélange réactionnel est composé de l'ADNc à amplifier, des oligodT en excès, des amorces spécifiques du gène à amplifier et de l'ADN polymérase.

La séquence cible est le segment d'ADN qui sera amplifié. Les marqueurs spécifiques des CTCs des CEVADS recherchés dans notre cas sont CK 18, CK19, EGFR, Ep-CAM, Elf3, CEA, EphB4, PVA, SCCA.

Le gène de référence est la GAPDH pour glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogenase. Les amorces proviennent de chez EUROGENTEC (Angers, France) (annexes Protocole CTC VADS).

Chaque cycle de PCR est composé de trois phases à des températures différentes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. L'étape de dénaturation a pour but de rompre les liaisons entre les deux brins d'ADNc pour donner des simples brins. L'hybridation des amorces repose sur le principe de l'appariement des bases complémentaires. La température de la réaction est choisie en fonction des amorces (voir annexe mo). La phase d'élongation ou extension des amorces permet aux amorces hybridées à l'ADN de servir de point de départ pour la polymérisation du brin d'ADNc. La polymérisation se fait par ajout successif de désoxyribonucléotides. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice. L'enzyme utilisée pour cette étape d'extension est une Taq polymérase .

Le témoin eau est utilisé comme témoin négatif, aucun signal ne doit être observé. Les témoins positifs sont les cellules FaDu, avant enrichissement car elles expriment les marqueurs. Si un signal n'est pas observé après PCR, l'essai ne pourra être validé.

Une PCR en temps réel est réalisée en utilisant du SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, BIO-RAD), intercalant de l'ADN devenant fluorescent lorsqu'il se lie à l'ADN double brin .Le SYBR Green est un agent intercalent fluorescent qui se lie à l'ADN double brin A (voir annexes protocole CTC VADS). Quand le SYBER Green est lié à l'ADN il émet un signal de fluorescence qui absorbe à 490nm. La fluorescence émise est d'autant plus intense que l'amplicon est grand. On l'utilise pour mesurer la quantité d'ADN double brin produite durant la réaction de PCR. . Le principe de cette technique est une amplification d'un fragment d'ADN spécifique avec mesure de fluorescence à la fin de chaque cycle. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés.

Un cycle est composé de deux phases : une phase de dénaturation (30 secondes à 95°C) et une phase d'hybridation des amorces (40 secondes à 60°C). Une RT est réalisée sur les ARN extrait de cellules Cal33 à 10^6 cellules/mL exactement puis des dilutions successives allant de 10^6 à 10^0 cellules/mL de l'ADNc obtenu permettent d'établir une gamme étalon afin de pouvoir établir la limite de détection des CTC.

4.2.4 CellSearch

Le CellSearch (Veridex LLC, USA) est une technique semi-automatisée permettant de détecter les cellules tumorales circulantes, grâce à un kit spécial : CellSearch Epithelial Cell Kit.

Plus exactement, il s'agit d'une combinaison de deux méthodes faisant intervenir deux automates différents : une séparation immunomagnétique grâce au CellTracks AutoPrep (figure 11) et une quantification en imagerie photonique via le CellTracks Analyser II (figure 12). Comme n'existe pas le kit spécifique pour la détection des CTCs dans les CEVADS, nous avons utilisé le kit épithelial pour la détection des CTCs .



Figure11 Cell Tracks AutoPrep

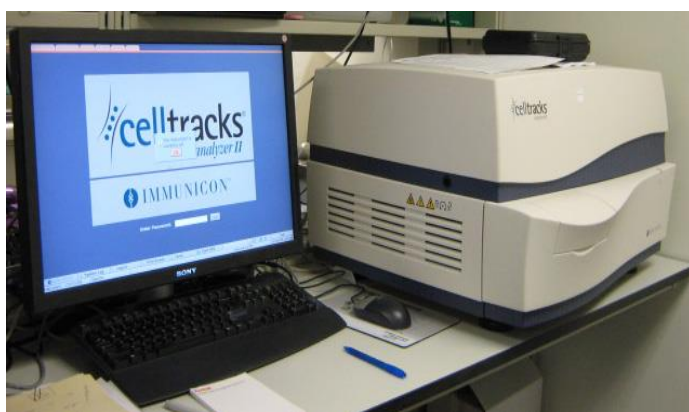


Figure12 CellTracks Analyser II

Un prélèvement de sang sur des tubes spécifiques appelés CellSave Blood Collection Tubes est indispensable. Ces tubes vont permettre de préserver les cellules présentes dans l'échantillon et peuvent être conservés 96h à température ambiante avant de débiter l'analyse (annexe 15).

Le CellTracks AutoPrep est le premier automate utilisé. Il permet à la fois de sélectionner les cellules tumorales circulantes et de les marquer pour pouvoir ensuite les détecter(voir annexes protocole CTC VADS). Dans un premier temps, la sélection se fait grâce à un ferrofluide constitué d'anticorps anti-EpCam puis dans un deuxième temps, différents marquages sont réalisés pour permettre de différencier les cellules d'intérêt des autres cellules (comme les leucocytes) : une coloration au DAPI est effectuée par l'automate pour colorer le noyau des cellules mais également un marquage avec un panel d'anticorps anti-cytokératines (CK 8, 18, 19) couplés à la fluorescéine et avec l'anticorps anti CD 45 couplé à l'allophycocyanine (APC). Un canal supplémentaire peut être utilisé pour révéler le marquage additionnel pour l'anticorps anti-EGFR.

D'un point de vue pratique, le plasma est d'abord éliminé puis le ferrofluide anti-Ep-Cam est additionné. Après incubation de ce premier anticorps avec les cellules, une séparation immunomagnétique et des lavages, les cellules resuspendues dans du tampon sont perméabilisées et mises en présence du panel d'anticorps anti-cytokératines, de l'anticorps anti-CD 45 et la coloration au DAPI est effectuée. L'échantillon marqué est alors transféré dans un MagNest (cartouche sur un aimant).

Après incubation des MagNest une nuit à l'obscurité et à température ambiante pour permettre aux cellules d'être présentes sur le même plan focal (grâce à l'aimant), ces derniers sont mis les uns après les autres dans le CellTracks Analyser II pour être analysés

Le CellTracks Analyser II est un microscope semi-automatisé qui est capable de lire quatre fluorescences différentes. Il est relié à un logiciel ce qui lui permet de retranscrire les images qu'il obtient avec les 4 filtres de fluorescence et ainsi présente à l'expérimentateur une galerie d'images de toutes les cellules qu'il a détecté dans la cartouche. Finalement, c'est ce dernier qui va, en observant les différentes images capturées, confirmer la présence de cellules tumorales circulantes dans le sang testé et pouvoir les dénombrer.

Les cellules considérées comme étant tumorales ont leur noyau coloré au DAPI (violet), le marquage autour du noyau par les cytokératines (vert) et enfin pas le marquage par CD 45 (Van der Auwera I. et al. 2010).

4.2.5 Analyse Statistique

Les paramètres numériques sont décrits par la moyenne, la médiane, le premier et le troisième quartile, la valeur minimale et maximale au moyen de boxplot ou boîte à moustache ; les paramètres qualitatifs sont décrits par la fréquence et le pourcentage. La normalité de la distribution de marqueurs a été étudiée par un test du Shapiro-Wilks. Certains paramètres ont subi une transformation logarithmique afin de rétablir la normalité de la distribution.

L'évolution de chaque marqueur a été étudiée entre les trois temps (pré/per/post opératoire) par un modèle linéaire mixte afin de prendre en compte la répétition des mesures chez une même patiente. L'effet fixe était le temps, l'effet aléatoire était la patiente. Deux analyses post-hoc ont été réalisées afin de comparer les temps deux à deux et une correction de Bonferroni a été utilisée pour corriger l'inflation du risque alpha. Cette analyse a été effectuée soit sur les valeurs brutes, soit sur les valeurs transformées par la fonction logarithmique soit sur les valeurs rangées selon la méthode de Conover.

Une analyse exploratoire a été effectuée pour étudier l'influence de certains paramètres cliniques (localisation, présence d'emboles, statut ganglionnaire et infiltration) sur la valeur des marqueurs. Pour ce faire, chaque marqueur à chaque temps a été comparé entre les modalités des paramètres cliniques. Pour la présence d'emboles, le statut ganglionnaire et l'infiltration, un test de Mann-Whitney a été utilisé alors que pour la localisation, il s'agissait d'un test de Kruskal-Wallis.

Le seuil de significativité a été fixé à 5%. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel version 9.3 (SAS, Cary, NC, USA).

4.3 Résultats

La population de 40 patients était représentée par 7 femmes et 33 hommes .L'âge moyen était 60.6 (30-86 ans)

Parmi les patients, 3 ont changé d'avis après signature du protocole, et ont opté pour un traitement médical.

3 patients présentaient des antécédents d'autres cancers (prostate et pulmonaire) non signalés au médecin au moment de l'inclusion.

Toutes les exérèses chirurgicales étaient en marges saines (< 5 mm minimum) .

11 patients avaient des infiltrations péri-nerveuses et emboles vasculo-lymphatiques.

17 patients présentaient seulement des infiltrations tumorales péri-nerveuses, et 17 autres uniquement des emboles vasculo-lymphatiques.

Ils ont bénéficié d'un curage cervical bilatéral complet (conservateur ou radical selon les indications).

19 patients avaient des adénopathies métastatiques en rupture capsulaire, 9 des adénopathies métastatiques sans rupture capsulaire, et 9 aucune métastase ganglionnaire.

28 patients présentaient un stade IV a ; 5 un stade IV b ; 5 un Stade III ; et 2 un stade II (pour mémoire, le stade était établi après bilan d'extension, avant le traitement chirurgical).

Les 2 patients stade II présentaient un hypermétabolisme ganglionnaire cervical au PET scanner, mais aucune métastase ganglionnaire n'a été retrouvée après analyse histopathologique.

4.3.1 Les résultats pour la technique qRT- PCR par marqueurs

4.3.1.1 CEA

Les paramètres numériques sont décrits par la moyenne, la médiane, le premier et le troisième quartile, la valeur minimale et maximale au moyen de boxplot ou boîte à moustache ; les paramètres qualitatifs sont décrits par la fréquence et le pourcentage (figure 13) Le résultat pour CEA est significatif avec une p value de 0.0006.

L'acte chirurgical montre un impact : deux heures après la chirurgie le taux de variation du marqueur est augmenté, et 7/8 jours après il se régularise dans la circulation sanguine.

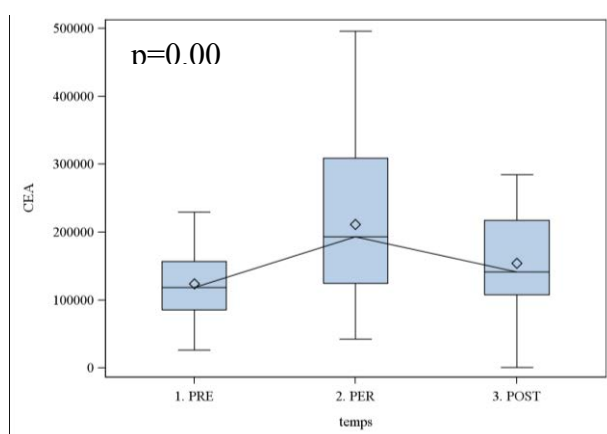


Figure 13 Résultats CEA

4.3.1.2 EphB4

Le résultat pour EphB4 est significatif avec une p value de 0.0003.

Les paramètres numériques sont décrits par la moyenne, la médiane, le premier et le troisième quartile, la valeur minimale et maximale au moyen de boxplot ou boîte à moustache ; les paramètres qualitatifs sont décrits par la fréquence et le pourcentage (figure 14).

Le bloxplot montre un impact de l'acte chirurgical avec une courbe qui monte à j+ 2h (donc augmentation du taux du marqueur) et que se régularise à j 7/8.

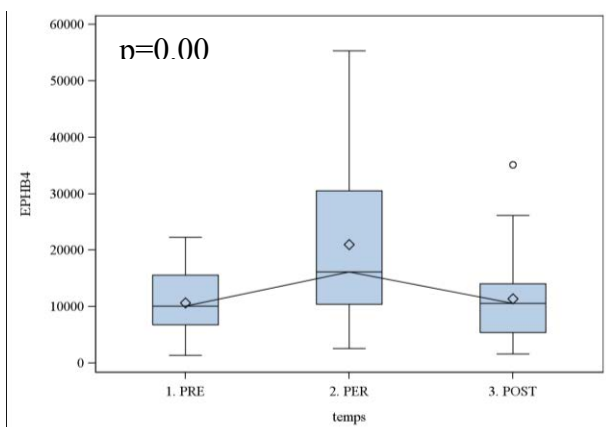


Figure 14 Résultats EphB4

4.3.1.3 CK18

Le résultat pour CK18 est significatif avec une p-value à 0.0011

Les paramètres numériques sont décrits par la moyenne, la médiane, le premier et le troisième quartile, la valeur minimale et maximale au moyen de boxplot ou boîte à moustache ; les paramètres qualitatifs sont décrits par la fréquence et le pourcentage (figure15)

Le bloxplot montre un impact de l'acte chirurgical avec une courbe qui monte à j+ 2h (donc augmentation du taux du marqueur) et que se régularise à j 7/8.

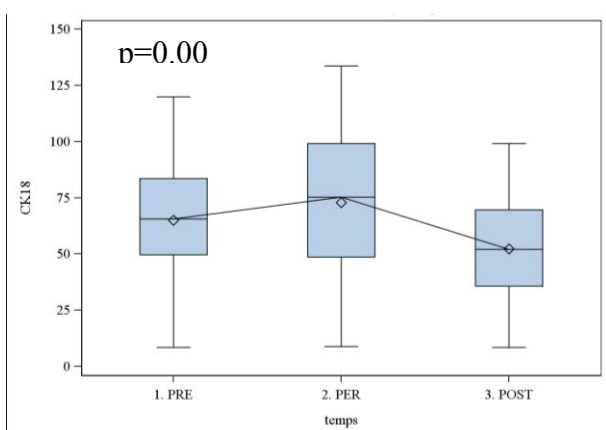


Figure 15 Résultats CK18

4.3.1.4 Ep-CAM

Le résultat pour Ep-CAM est significatif avec une p value 0.0299

La variation des ces résultats montre que l'acte chirurgical a un impact significatif sur les taux des marqueurs.

Si on représente graphiquement les taux des marqueurs au moment des 3 prélèvements sanguins, on obtient une courbe débutant, s'élevant en péri-opératoire, puis se régularisant à J+7/8 en revenant à une valeur voisine de J-1 (figure 16)

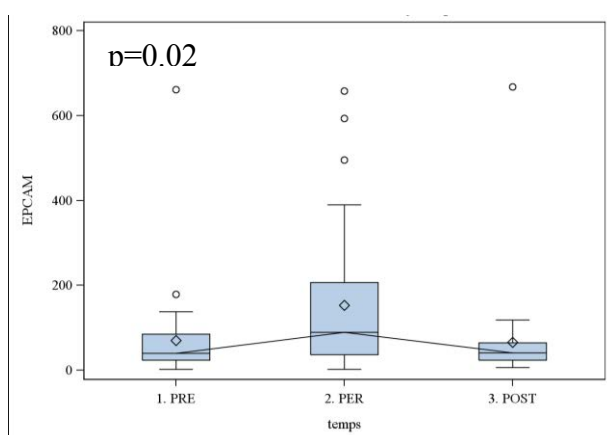


Figure 16 Résultats Ep-CAM

4.3.1.5 PVA

Pour les marqueurs PVA la p value était limite : elle était de l'ordre de 0.0542 et 0.0764. Le bloxplot montre un impact de l'acte chirurgical avec une courbe qui monte à j+ 2h (donc augmentation du taux du marqueur) et que ne se régularise pas à j 7/8 avec une concentration du taux du marqueur qui monte (figure 17)

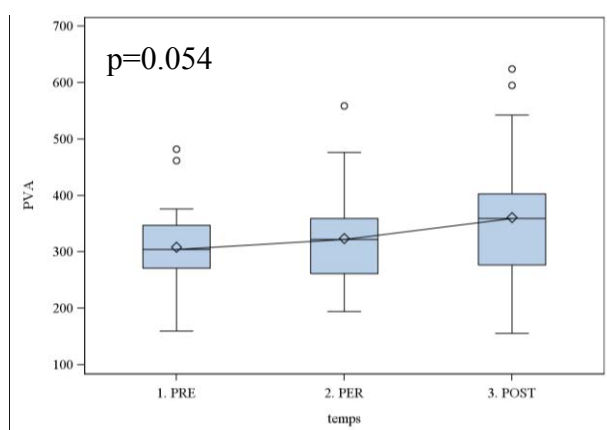


Figure 17 Résultats PVA

4.3.1.6 Elf3

Pour Elf 3 la p value était limite : elle était de l'ordre de 0.0764. Le bloxplot montre un impact de l'acte chirurgical avec une courbe qui reste inchangée à j+ 2h et que baisse à j 7/8 (figure 18)

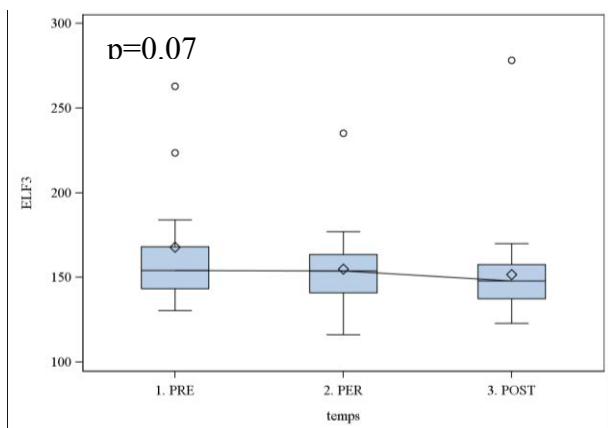


Figure 18 Résultats Elf3

4.3.1.7 CK 19

Pour CK 19 la p-value était de 0.2525, donc pas significative. Le bloxplot montre un impact de l'acte chirurgical avec une courbe qui monte à j+ 2h (donc augmentation du taux du marqueur) et que se régularise à j 7/8 (figure 19)

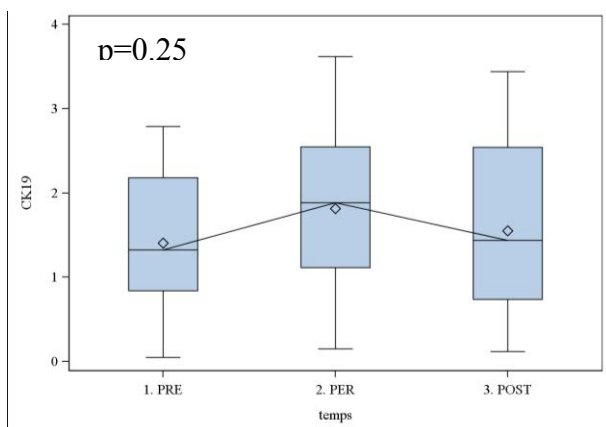


Figure 19 Résultats CK19

4.3.1.8 EGFR

La p value pour le marqueur EGFR n'était pas significative et de l'ordre de 0.2152. Le bloxplot montre un impact de l'acte chirurgical avec une courbe qui augmente à j+ 2h (donc augmentation du taux du marqueur) et que se régularise à j 7/8 (figure20)

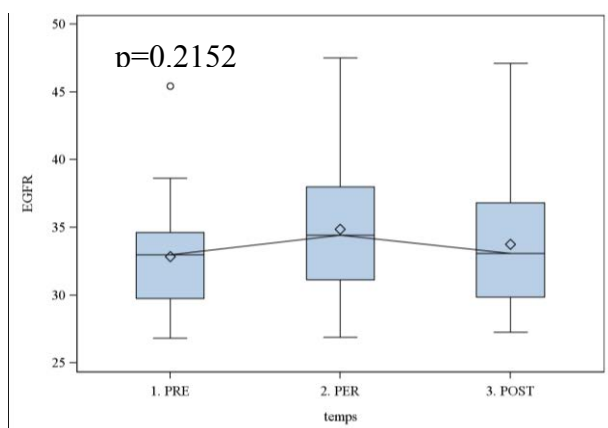


Figure 20 Résultats EGFR

4.3.1.9 SCCA

Pour SCCA la p value n'était pas significative, en effet elle était de 0.6551. Le bloxplot montre un impact de l'acte chirurgical avec une courbe qui reste inchangée à j+ 2h et que descende encore à j 7/8 (figure 21)

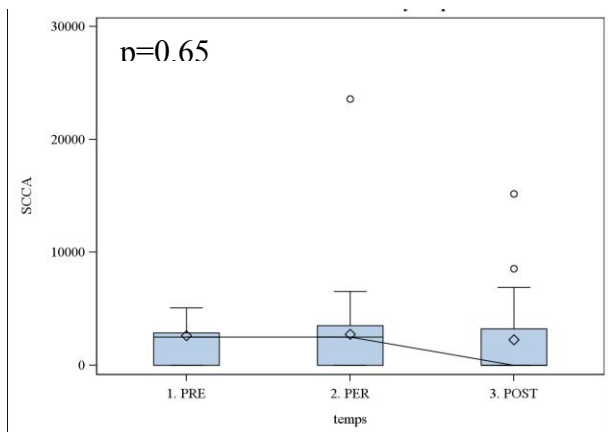


Figure 21 Résultats SCCA

4.3.1.10 GAPDH

Pour GAPDH la p-value n'était pas significative et de l'ordre de 0.08. Le bloxplot montre un impact de l'acte chirurgical avec une courbe qui reste inchangée à j+ 2h et que monte un peu à j 7/8 (figure 22)

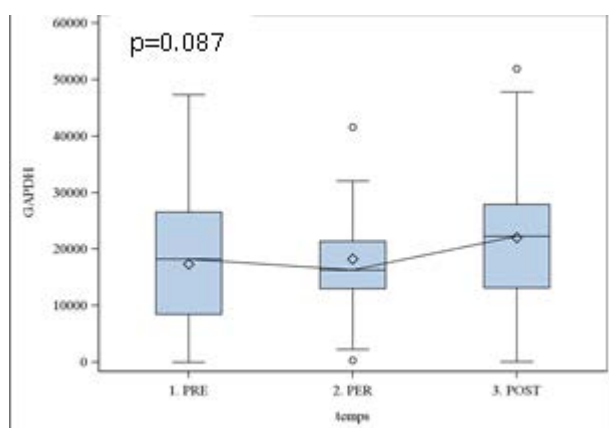


Figure 22 Résultats GAPDH

4.3.2 CTC avec cell search

Le sang est centrifugé puis un enrichissement immunomagnétique est réalisé par expression de Ep-Cam par les cellules tumorales. Les CTC sont détectées en fluorescence après marquage du noyau (DAPI, fluorescence bleue), immunomarquage de CK8, 18, 19 (fluorescence verte) et de l'antigène CD45 (fluorescence rouge). Les cellules sont analysées une par une par un logiciel qui distingue les CTC sur plusieurs critères. Les CTC ont une morphologie ronde, un cytoplasme CK+ et n'expriment pas l'antigène CD45. Les résultats sont exprimés en nombre de CTC/7,5mL de sang.

La figure 23 montre une bonne CTC avec un noyau coloré en rouge, avec EGFR bien exprimé et coloré en vert. Elle est négative pour le CD 45, et ça confirme la nature tumorale, elle est aussi positive aux marqueurs des CK (8-18-19).

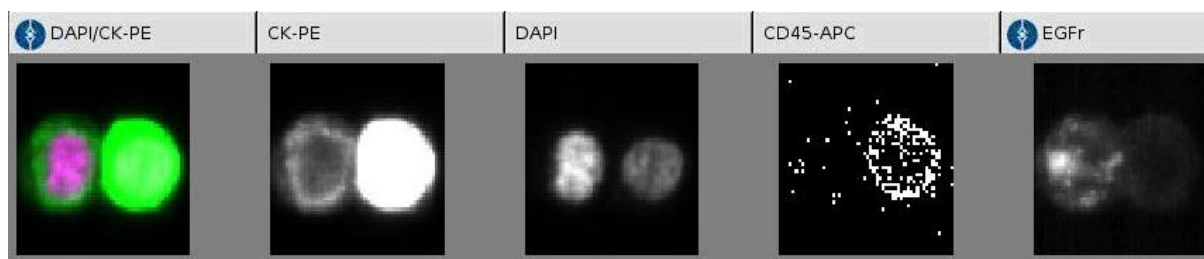


Figure 23 Image de CTC avec la méthode cellsearch

Les résultats avec la technique du cellsearch montraient une p-value non significative de 0.1794 pour les marqueurs du kit épithélial. Le bloxplot montre un impact de l'acte chirurgical avec une courbe qui descend à j+ 2h et que ne remonte pas à j 7/8 (figure 24)

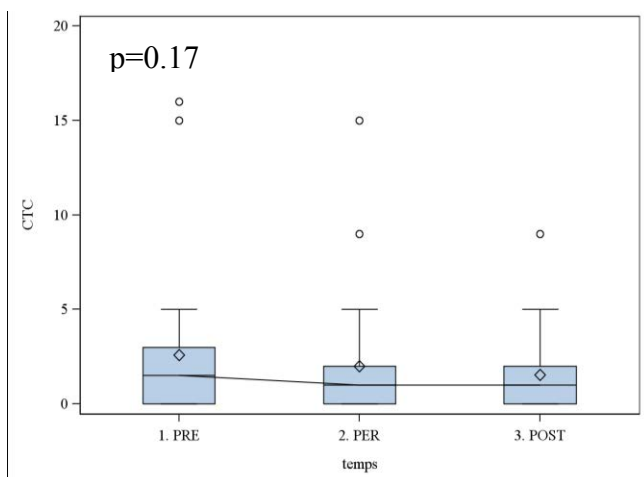


Figure 24 Résultats CTC cellsearch

Par contre pour le EGFR était significative avec une p-value de 0.0195. . Le bloxplot montre un impact de l'acte chirurgical avec une courbe que descend à j+ 2h et que reste inchangée à j 7/8 (figure 25)

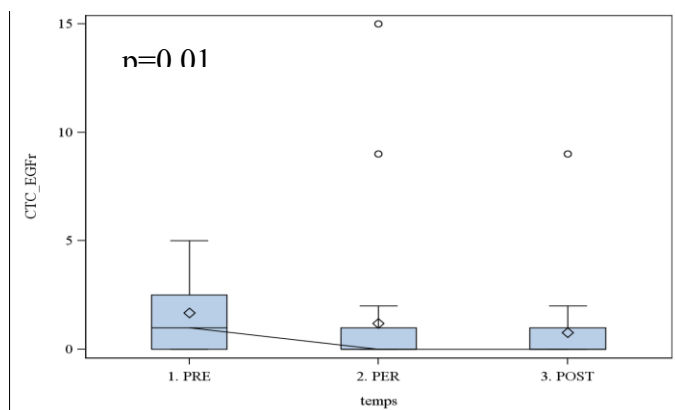


Figure 25 Résultats EGFR cellsearch

Les résultats statistiques sont détaillés dans l'annexe 16

Une analyse exploratoire a été effectuée pour étudier l'influence de certains paramètres cliniques (localisation tumorale, présence d'embolies, statut ganglionnaire et infiltration péri-nerveuse) sur la valeur des marqueurs. Pour ce faire, chaque marqueur à chaque temps a été comparé entre les modalités des paramètres cliniques. Pour la présence d'embolies, le statut ganglionnaire et l'infiltration, un test de Mann-Whitney a été utilisé alors que pour la localisation, il s'agissait d'un test de Kruskal-Wallis.

Mais les résultats pour ces paramètres ne sont pas du tout significatif.

Actuellement 11 patients sur 40 sont décédés, 3 sont vivants mais présentent une évolution métastatique (2 au niveau pulmonaire, 1 au niveau œsophagien).

29 patients sont vivants sans évolutivité tumorale avec concordance entre l'imagerie et examen clinique par endoscopie.

4.4 Discussion et perspectives

4.4.1 Discussion

Cette étude a permis d'identifier que le taux de variation des certains marqueurs était spécifiques pour les CEVADS qui, donc, pourront être utilisés dans la suite du projet. Les résultats obtenus en RT-PCR sont prometteurs, une optimisation des protocoles est nécessaire afin d'obtenir une meilleure sensibilité de détection et l'établissement d'un arbre décisionnel. En effet, des études concernant le cancer des poumons, de l'œsophage ou encore du sein utilisent cette technique et ont publié un arbre décisionnel en fonction du nombre de marqueurs trouvés et de leur positivité. En combinant la présence de transcrits d'ARNm de CEA et de Survivin(membre de la famille de inhibiteur de l'apoptose) extrait puis révélés par RT-PCR dans des prélèvements sanguins chez des patients ayant un cancer de l'œsophage après chirurgie, Liu Z. et al (2008) ont montré que cela pouvait prédire le risque de développement de micrométastases. Dans le cas du cancer des poumons, il a été démontré que la combinaison des trois marqueurs (TSA-9, pre-proGRP et KRT-19) dans la détection des CTC augmentait la positivité à 84,3% (Liu L., 2008). Enfin, la détection simultanée des transcrits d'ARN Survivin, hTERT et hMAM dans les cancers du sein permettait une sensibilité de détection des CTC de 70,2% (ChangXin S., 2009).

Pour ce que concerne la technique CellSearch ,à l'heure actuelle, il n'existe pas de kit spécifique pour CEVADS mais en utilisant l'épithélial kit plus un anticorps anti EGFR, la détection semble envisageable.

Cette technique a déjà été utilisée, notamment dans les cancers du sein et a prouvé son efficacité (Riethdorf S. et al. 2007).Par simple prise de sang et quelle que soit la méthode utilisée, le nombre des CTCs par unité de sang peut être déterminé. Il a été démontré que cette valeur augmente avec le grade de la tumeur. Si le nombre de CTCs est inférieur à 5 par millilitre de sang, le pronostic est considéré comme bon lors du diagnostic de rechute. Si ce nombre est supérieur à 5, le pronostic est mauvais. Les variations quantitatives de cette valeur entre le diagnostic et après le premier cycle de chimiothérapie permettent de prédire la réponse au traitement. Cela de manière plus précoce que l'évaluation radiologique (Bidard F.C., 2009).De plus, l'étude des CTCs après isolement, permet de prédire quel

traitement sera efficace sur les métastases. Ainsi, le traitement pourra être adapté et être plus efficace (Schneider M., 2006). De plus, un seuil de 5 cellules tumorales circulantes/7,5mL de sang a été mis en évidence : si un patient possède plus de 5 cellules tumorales, les probabilités que cette personne développe un cancer métastatique est augmenté (Cristofanilli M et al. 2005).

Le choix des marqueurs pour la détection s'est révélé difficile car les CEVADS ont des nombreux marqueurs communs avec d'autres types cellulaires. Comme on l'a plusieurs fois remarqué, la recherche des CTCs, dans autres cancers (sein, colon, prostate, etc) a été bien ciblés et étudié et la détection des ces cellules fait partie de la prise en charge du diagnostique et du traitement des cancers. Mais dans les CEVADS on n'a pas de marqueurs ciblés et reconnus par tous. Cependant, les premiers résultats obtenus ont démontré que la détection soit par RT-PCR soit par CellSearch était spécifique et sensible pour les CEVADS.

Les différentes techniques utilisées dans ce projet représentent une première approche du sujet sur la sélection et la détection des CTCs des CEVADS. En effet, ce projet avait en partie pour but de choisir des marqueurs spécifiques et des méthodes de détection. La méthode de recherche des CTC avec CellSearch permet une grande reproductibilité mais n'est actuellement réalisable que pour le kit de détection commercialisé c'est-à-dire dans le cas de cancer du sein, du colon et de la prostate. Nous avons adapté notre recherche pour la détection des CTCs avec le CellSearch : en plus nous avons utilisé le marqueur pour l'EGFR, et les résultats sont très prometteurs. L'utilisation de la méthode avec le cellsearch est plus pratique mais c'est une méthode qualitative.

La méthode de la RT-PCR en temps réel, par contre, reste une méthode quantitative. Les résultats obtenus dans le protocole CTC VADS doivent être analysés selon, d'une part un axe global d'analyse bio statistique, d'autre part en fonction de certaines particularités montrées par les résultats individuels des patients.

Préalablement, doivent être considérés les phénomènes attendus liés au geste chirurgical : si lors du geste chirurgical carcinologique est effectuée une ablation totale macroscopique de la masse tant tumorale initiale que ganglionnaire, la conséquence logique attendue est une diminution, voire une disparition du phénomène des cellules tumorales

circulantes libérées au fil de l'eau; le contraire, évidemment, si, lors du geste chirurgical, est libérée dans la circulation une grande quantité de cellules tumorales plus spécifiques à cause du traumatisme mécanique du geste chirurgical et du fait de leurs caractéristiques propres (situées au niveau des lacs sanguins vasculaires et/ou situées en périphérie tumorale).

Si l'on considère donc les résultats dans leur globalité, si quatre marqueurs ont significativement augmenté, l'augmentation de ces marqueurs par rapport au niveau de base des cellules tumorales déjà présentes, représente très probablement le phénotype cellulaire tumoral correspondant aux cellules libérées lors du geste chirurgical. Ces marqueurs permettant de repérer ce type de cellules globalement peuvent masquer la présence de différentes sous-populations tumorales ce qui peut être envisagé en fonction de l'analyse individuelle des courbes. Ces marqueurs peuvent, par ailleurs, du fait de leur significativité, être discutés en tant que signifiant une activité biologique.

A l'analyse par CellSearch, le marqueur correspondant à l'EGFR diminue significativement, il est probable que la diminution de ce marqueur, qui est présent dans la quasi-totalité des cellules tumorales des carcinomes épidermoïdes des VADS, corresponde à une ablation globale et totale de la masse tumorale et donc de la disparition de la libération au fil de l'eau de cellules tumorales circulantes de tout type.

Si l'on considère les aspects individuels des résultats, peut être discutée la notion de patient par patient du phénotype des cellules tumorales libérées, celles qui sortent donc de la norme par rapport au niveau 0. L'aspect spécifique aussi doit être discuté: dans certains cas on a une augmentation de tous les marqueurs, dans d'autres cas, une augmentation uniquement de certains marqueurs qui correspondent là probablement à un petit nombre de sous-population de cellules tumorales.

Quand il y a peu ou pas de variation des cellules tumorales (un certain nombre de patients), on peut considérer que le geste n'a pas eu d'impact sur la libération des cellules tumorales (rapport avec la différenciation, rapport avec les marges, stade tumoral, grosse tumeur versus gros ganglion, petite tumeur versus gros ganglion, grosse tumeur versus petit ganglion).

Quand on observe une diminution des marqueurs, on peut penser qu'il s'agit aussi là d'un cas où on a globalement enlevé la masse tumorale et qu'il n'y a pas de libération ; nous sommes un peu dans le cas de l'EGFR.

Enfin doit être considérée une augmentation de temps de certains marqueurs, on peut se poser la question dans ce cas de :

- la multiplication des cellules tumorales circulantes
- démarginalisation des cellules dormantes depuis leur repère où elles sont accumulées

4.4.2 Perspectives

D'après les résultats obtenus, il serait intéressant d'évaluer une technique par ADN circulant. Ainsi, la méthode la plus adaptée aux CTCs CEVADS pourrait être identifiée.

Deux techniques de détection ont été utilisées afin de caractériser les cellules récupérées, la méthode CellSearch et les RT-PCR en temps réel.

Il a été montré que leur sensibilité respective était de $1,25 \cdot 10^{-5}$ et $1,25 \cdot 10^{-6}$ et que les marqueurs choisis étaient spécifiques. Cependant, le choix des marqueurs est difficile à cause du type épithélial des CTCs de CEVADS.

Pour conclure, cette étude a été réalisée sur un grand nombre d'essais, nous sommes arrivés à optimiser et obtenir une plus grande sensibilité avec la technique de la RT-PCR en temps réel.

De nombreuses études ont été réalisées sur les CTCs du cancer du sein, du colon ou encore de la prostate mais très peu sur les CEVADS.

L'analyse des CTCs dans les CEVADS pourrait permet d'envisager un diagnostic plus précoce et d'adapter des modalités thérapeutiques dans le futur.

Chapitre V

Conclusion générale

5 Conclusion générale

Dans ce travail nous avons mis en évidence, avec les trois axes de recherche menés, l'influence de l'acte chirurgical par rapport au taux de variation des CTCs et DTCs dans la circulation sanguine et dans les vaisseaux lymphatiques.

Le premier protocole, grâce à la technique OSNA pour rechercher les ganglions métastatiques, a permis de mettre en évidence dans les ganglions métastatiques des patients, une population tumorale présentant globalement les mêmes caractéristiques phénotypiques que les cellules de la tumeur primitive.

Le deuxième protocole, grâce à la méthode utilisant le CellSearch, a montré la présence de cellules tumorales disséminées dans les drains de Redon cervicaux chez les patients opérés de tumeur de stade avancé de la face et du cou et a fait supposer un probable mécanisme de dissémination lymphatique des cellules tumorales dans les drains. On a retrouvé des DTCs dans les drains jusqu'à 3 jours après le geste chirurgical.

Le dernier protocole de recherche a consisté en une étude clinique avec analyse de facteurs biologiques visant à identifier la présence de cellules tumorales circulantes sanguines avant, pendant et après chirurgie. Ce protocole a mis en évidence des résultats statistiquement significatifs de variation des populations cellulaires circulantes. Les deux techniques de détection utilisées (RT-PCR et CellSearch) ont par ailleurs pu valider, de façon quantitative la qRT-PCR et qualitative le système CellsCearch, avec de résultats concordantes, notre hypothèse de travail.

Les différentes techniques utilisées dans ce projet représentent une première approche du sujet sur la détection et la sélection des CTCs des CEVADS. En effet, ce projet au début avait pour but de choisir des marqueurs spécifiques et des méthodes de détection. Mais dans l'avenir ce serait intéressant d'employer la recherche avec de ADN circulant

Très intéressants sont les résultats du marqueur EphB4 pour le premier et troisième axe de recherche.

Les connaissances, sur le rôle déroulé par les membres du système des éphrines dans les néoplasies humaines sont encore limitées et caractérisées par une dichotomie marquée, que semble dépendre du système cellulaire impliqué et du stade de la néoplasie étudiée. Différentes stratégies ont été prises en considération, soit pour interférer avec le système des éphrines, dans les cas dans lesquels il facilite le développement de la tumeur, soit pour en augmenter l'efficacité dans les cas dans lesquels il semble par contre jouer contre la croissance de la tumeur.

De plus, puisque beaucoup de néoplasies semblent être marquées par la sur-expression d'un récepteur spécifique Eph ou d'une éphrine, des molécules très sélectives pour ce type de types moléculaires, elles pourraient être exploitées pour une diffusion spécifique de médicaments, toxines ou peptides antigéniques stimulants une réponse immunitaire (annexe 17).

À aujourd'hui il semble clair que le système des éphrines déroule un rôle déterminant dans la promotion de l'angiogenèse tumoral et donc l'inhibition de ce système pourrait être utile dans la thérapie antiangiogénique et dans les néoplasies où le système des éphrines semble promouvoir la croissance tumorale.

Trois sont les stratégies étudiées pour réduire le signal des éphrines: le développement d'inhibiteurs kinasiques des récepteurs Eph, l'utilisation de siRNAs ou oligonucleotides antisens et pour finir la recherche de molécules capables d'interférer avec le lien Eph-éphrine.

Parmi les inhibiteurs du domaine kinasique Eph, peuvent être classés certaines sélectives bloquantes pour le récepteur EphB4 développés par certaines groupes de recherche (Miyazaki Y et al. 2007 ; Bardelle C et al. 2008 -2008), ou certaines inhibiteurs kinasiques utilisés pour d'autres targets moléculaires qu'ont montré être capables d'inhiber aussi l'activité des récepteurs Eph (Karaman M et al. 2008 ; Chang Q et al 2008).

XL647 (ou EXEL-7647) au contraire, l'inhibiteur administrable par voie orale de EGFR et VEGFR, est maintenant en train d'être expérimenté dans le cancer du poumon aussi comme inhibiteur d'EphB4 (Gendreau S et al 2007).

Inspirés par les travaux sur les cancers du poumon, ça pourrait être intéressant donc, d'établir un protocole qu'utilise des médicaments ciblés pour le marqueur EphB4 en péri-opératoire et, pour la suite, de développer des études prospectives diagnostiques et pronostiques des CTCs et DTCs des CEVADS.

Annexes

Annexes des Etude de marqueurs moléculaires pour le diagnostic d'envahissement ganglionnaire des carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures

Analyse par PCR quantitative en temps réel et en OSNA

Annexe 1 : Classification T, N, M des cancers des VADS selon l'UICC

Annexe 2 : Détection de l'ADN avec SYBR Green

Annexe 3 : Exemple de fiche OSNA®

Annexe 4 : Formulaire de non-opposition

Annexe 5 : Amorces utilisées

Annexe 6 : Exemple de courbe de fusion

Annexe 7 : Tableaux de résultats

Annexe 1 : Classification TNM des cancers des VADS selon l'UICC**Cancer des lèvres, de la cavité buccale et du pharynx :**

T1 : Tumeur de moins de 2 cm dans sa plus grande dimension

T2 : Tumeur comprise entre 2 et 4 cm dans sa plus grande dimension

T3 : Tumeur supérieure à 4 cm dans sa plus grande dimension

T4 : Tumeur envahissant les structures adjacentes (os cortical, musculature intrinsèque de la langue, peau cervicale)

Cancer du larynx :

T1, T2 : Cancer limité avec mobilité laryngée préservée

T3 : Cancer avec un blocage de la mobilité laryngée unilatérale

T4 : Cancer étendu avec blocage d'un héli larynx et envahissement des cartilages laryngés

Adénopathies cervicales :

N1 : Métastase dans un seul ganglion lymphatique homolatéral ≤ 3 cm dans sa plus grande dimension

N2 : Métastase ganglionnaire entre 3 et 6 cm

N2a : Adénopathie homolatérale entre 3 et 6 cm

N2b : Adénopathies multiples homolatérales (inférieures à 6 cm)

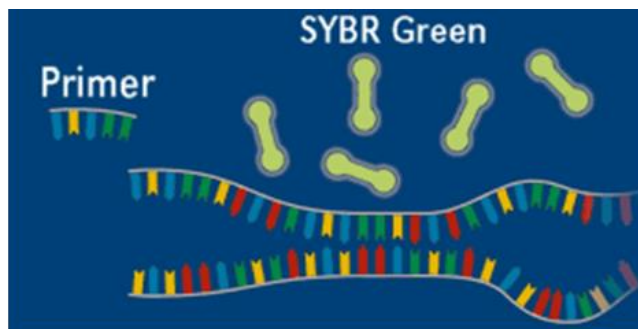
N2c : Adénopathies bilatérales ou controlatérales (inférieures à 6 cm)

N3 : Métastase ganglionnaire de plus de 6 cm.

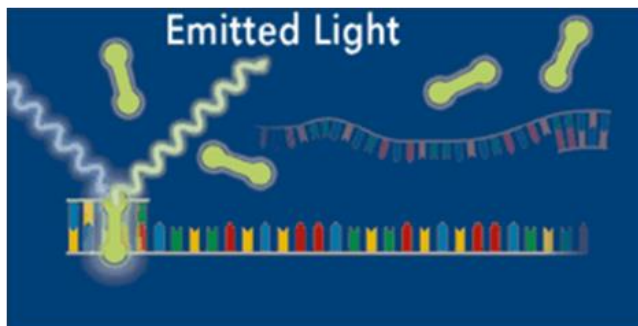
Métastases à distance :

M0 : Absence de métastase

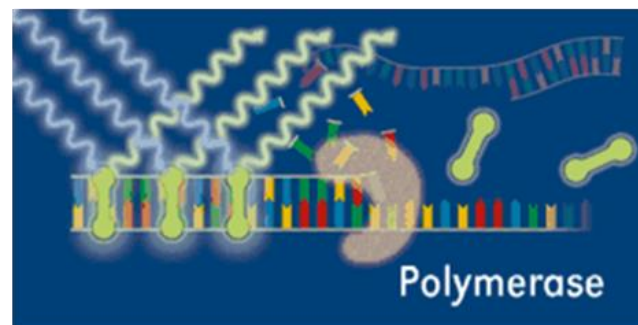
M1 : Présence de métastase(s)

Annexe 2: Détection de l'ADN avec SYBR Green

Dénaturation : Le SYBR Green libre émet peu de fluorescence



Hybridation: L'amorce s'hybride sur la Séquence cible



Elongation: Accroissement de la fluorescence proportionnelle à l'intégration du SYBR Green

Annexe 3 : Exemple de fiche OSNA®

Détection extemporanée des métastases carcinomateuses
ganglionnaires lymphatiques d'origine mammaire par la
Technique OSNA
(Technologie LAMP développée par Eiken)

- FICHE DE SUIVI -

ETIQUETTE PATIENT

Date :
Médecin prescripteur :
Technicienne :
Médecin anatomo-pathologiste :
Numéro d'analyse :
Heure de réception du prélèvement :
Nombre de ganglions :

Ganglion	Poids du ganglion	SAMPLE ID	Commentaires	
	☐ < 0,6 g ☐ > 0,6 g			☐ Histologie ☐ Cytologie
	☐ < 0,6 g ☐ > 0,6 g			☐ Histologie ☐ Cytologie
	☐ < 0,6 g ☐ > 0,6 g			☐ Histologie ☐ Cytologie
	☐ < 0,6 g ☐ > 0,6 g			☐ Histologie ☐ Cytologie

	Ligne	N° de lot	Date de péremption
Lymphog			
Lymphop			

1. Interprétations des résultats :

☐ A1 ☐ A2 ☐ A3 ☐ A4
☐ A1 ☐ A2 ☐ A3 ☐ A4
☐ A1 ☐ A2 ☐ A3 ☐ A4
☐ A1 ☐ A2 ☐ A3 ☐ A4
☐ A1 ☐ A2 ☐ A3 ☐ A4
☐ A1 ☐ A2 ☐ A3 ☐ A4

++ : ≥ 5000 copies de CK19 ARNm/ μ L
 + : de 250 à 5000 copies de CK19 ARNm/ μ L
 +(I) : positif par inhibition (< 100 copies de CK19 ARNm/ μ L)
 - : - de 250 copies de CK19 ARNm/ μ L
 -(L) : négatif par manque d'ARNm ($100 \leq \text{copies} < 250$)
 : Interprétable

2. Résultats : Heure de communication du résultat : Interphone N° : ...

Résultat positif ☐ gg1 ☐ gg2 ☐ gg3 ☐ gg4
 Résultat négatif ☐ gg1 ☐ gg2 ☐ gg3 ☐ gg4
 Résultat ininterprétable ☐ gg1 ☐ gg2 ☐ gg3 ☐ gg4
 Motif :

CONCLUSION :

- ☐ Présence de métastases carcinomateuses ganglionnaires lymphatiques
 Nombre de ganglion(s) envahi(s) / Nombre de ganglion(s) examiné(s) : ... / ...
☐ Absence de métastase carcinomateuse ganglionnaire lymphatique

Professeur Jean-Louis MERLIN

Médecin Anatomo-pathologiste



Avenue de Bourgogne F-68111 Vandœuvre-lès-Nancy Tél: 03 23 59 25 25 Fax: 03 23 59 25 69 Email: uba@nancy.univ-lorraine.fr

Annexe 4 : Formulaire de non opposition

Madame, Monsieur,

Au cours de votre séjour, les médecins du Centre Alexis Vautrin peuvent être amenés, pour assurer vos soins, à effectuer des prélèvements (tissus...). Ces prélèvements sont effectués pour établir le diagnostic de votre maladie, la réalisation et le suivi de votre traitement.

Au cas où le prélèvement n'aurait pas été utilisé en totalité pour établir le diagnostic, nous conserverons le prélèvement restant.

Une partie de cet échantillon sera conservée pour une éventuelle utilisation ultérieure dans le cadre de **vos soins**.

Le lieu de conservation est situé à la tumorotheque du Centre Alexis Vautrin 6, Avenue de Bourgogne, 54511 VANDŒUVRE-LES-NANCY dirigée par le Dr Agnès LEROUX.

Une autre partie pourra, sauf opposition de votre part, être utilisée pour des recherches médicales ou scientifiques en cancérologie, dans le respect de la confidentialité, conformément à l'article L1211-2 alinéa 2 du code de la santé publique :

« L'utilisation d'éléments et de produits du corps humain à une fin médicale ou scientifique autre que celle pour laquelle ils ont été prélevés ou collectés est possible, sauf opposition exprimée par la personne sur laquelle a été opéré ce prélèvement ou cette collecte, dûment informée au préalable de cette autre fin. »

Cette mention sera tracée dans votre dossier médical.

Aucun examen de vos caractéristiques génétiques ne sera réalisé sans votre consentement écrit.

Vous êtes libre de revenir sur votre décision à tout moment, sans aucune conséquence quant à votre traitement, **en vous adressant auprès du service concerné**.

« Les données médicales associées au prélèvement seront réunies sur un fichier informatique permettant leur traitement automatisé dans le cadre des recherches. Vous disposez à leur égard d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition, conformément à la loi.

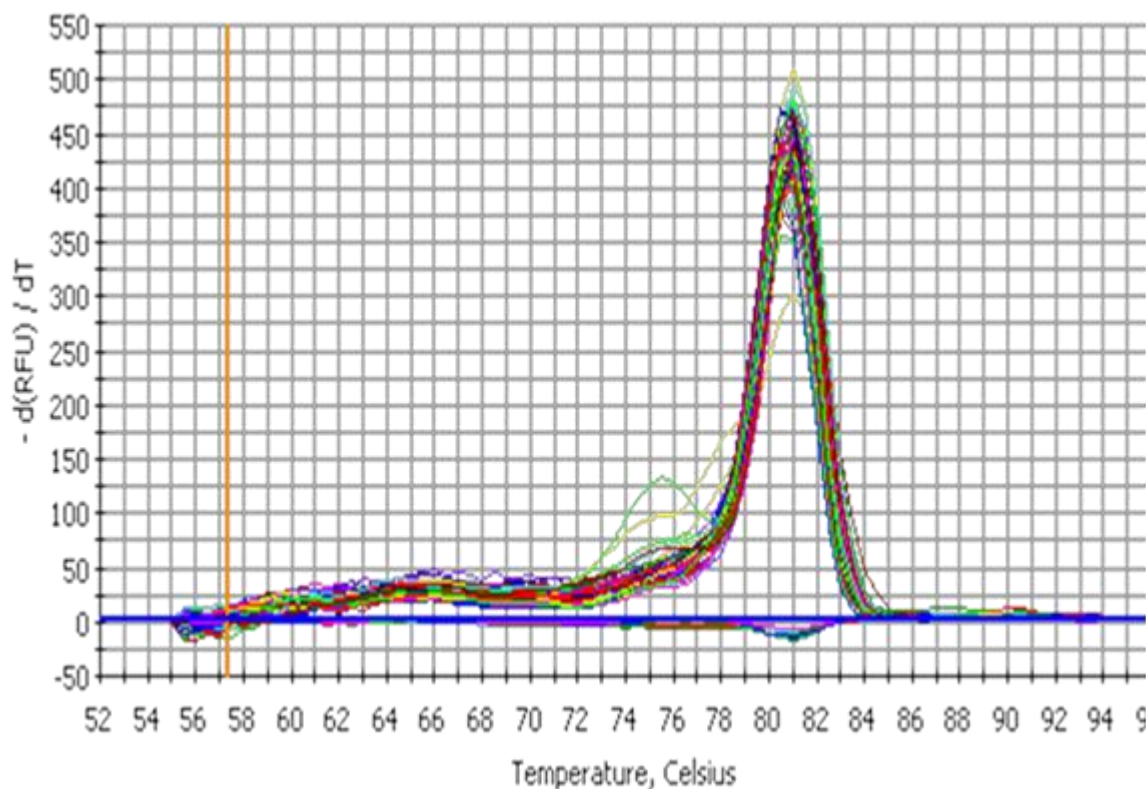
Conformément à la loi (art. 16-1 et 16-6 du code civil), vos prélèvements ne pourront être cédés à titre commercial, ni donner lieu à une rémunération à votre bénéfice. Ils pourront être utilisés pour des recherches effectuées en partenariat avec un ou plusieurs organismes publics ou privés.

Les informations portées sur ce document sont confidentielles et couvertes par le secret médical. A aucun moment, les données personnelles qui y figurent n'apparaîtront lors de la publication des résultats des travaux de recherche. »

Ce document est à établir en trois exemplaires originaux, dont l'un doit être gardé dans le dossier médical du patient, l'un doit être conservé dans le service d'anatomo-pathologie, et l'autre doit être remis au patient

Annexe 5 Amorces utilisées

CK17 sens	GGC CCG CCC GTG ACT ACA
CK17 anti sens	ATC TCC TCC TCG TGG TTC TTC TTC
PVA sens	CAT GAA TTT TCT GGA CTC CTA CTT TTC T
PVA anti sens	TTG CTT CCT GGC CAT CGT
SCCA sens	CTG CCA AAT GAA ATC GAT GGT
SCCA anti sens	GCAAAC TTG TCC ATT CCA TCA A
GAPDH sens	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C
GAPDH anti sens	ATG GGT GGA ATC ATA TTG GAA C
EphB4 sens	CCA GCC AAT AGC CAC TCT AAC AC
EphB4 anti sens	CAG GGA GGA GCC GTT CAG G
CK19 sens	GAG GGA CAG GAA GAT CAC
CK19 anti sens	TGG CAG GTC AGG AGA AGA
EGFR sens	CGT GCC CTG ATG GAT GAA GAA G
EGFR anti sens	GGT GGA ATT GTT GCT GGT TGC

Annexe 6: Exemple de courbe de fusion**Exemple de courbe de fusion obtenue avec le SCCA**

La température de fusion des amplicons (T_m) est représentée par un pic unique sur la dérivée primaire de cette courbe. Dans l'exemple ci-dessus, tous les échantillons ont un T_m d'environ 80,5 °C.

Si l'on obtient plusieurs pics à des températures différentes ou des pics décalés par rapport au T_m attendu, c'est que l'on est en présence d'un mélange d'amplicons ou d'amplicons ayant une séquence différente.

Annexe 7 : Résultats

<i>Tumeur</i>					
	<i>Patient 1</i>	<i>Patient 2</i>	<i>Patient 3</i>	<i>Patient 4</i>	<i>Patient 5</i>
<i>SCCA</i>	113000	630000	308000	13920	1554000
<i>PVA</i>	32200	4540	158600	1032	22400
<i>CK19</i>	159,6	278	1002	11,6	2,14
<i>EGFR</i>	230	36	586	10	350
<i>CK17</i>	780	274	2400	15	404
<i>EphB4</i>	722	696	1616	125,2	1760
<i>GAPDH</i>	470	440	2940	25,4	552

<i>Ganglion tumoral</i>					
	<i>Patient 1</i>	<i>Patient 2</i>	<i>Patient 3</i>	<i>Patient 4</i>	<i>Patient 5</i>
<i>SCCA</i>	246000	17280	140600	7020	128400
<i>PVA</i>	5280	1622	106200	452	17920
<i>CK19</i>	56,6	115,6	2000	49,4	0,43
<i>EGFR</i>	111	176	2260	51,6	2980
<i>CK17</i>	174,4	33	888	2,4	582
<i>EphB4</i>	276	7300	3400	2380	2920
<i>GAPDH</i>	89,6	216	4440	42,4	954

<i>Tissu sain</i>					
	<i>Patient 1</i>	<i>Patient 2</i>	<i>Patient 3</i>	<i>Patient 4</i>	<i>Patient 5</i>
<i>SCCA</i>	1448	5,6	7,5	714	6,14
<i>PVA</i>	82,6	0,94	2,46	394	0,09
<i>CK19</i>	139,4	0,1	0,018	1,77	0,03
<i>EGFR</i>	75	1,84	0,9	1,6	10
<i>CK17</i>	13	35	59	0,2	46,4
<i>EphB4</i>	282	18	11,7	24	236
<i>GAPDH</i>	117	68	13,5	3,1	348

	<i>Ganglion sain</i>	<i>Glande salivaire</i>
<i>SCCA</i>	0,4	0
<i>PVA</i>	0,18	0,64
<i>CK19</i>	0,65	22,4
<i>EGFR</i>	306,6	25
<i>CK17</i>	90	2,44
<i>EphB4</i>	994	194,5
<i>GAPDH</i>	168	34

Annexes Recherche des cellules tumorales circulantes après acte chirurgical pour carcinomes épidermoïdes des VADS stade III et IV

8 Comité de protection des patients CPP

9 Extrait du protocole CTC VADS

10 Fiche d'inclusion

11 Mode Opératoire d'extraction des arn à partir de sang total prélevé sur tubes paxgene

12 Mode opératoireExtraction et quantification des ADNc contenu dans les CTC/VADS

13Mode opératoire ARN NanoVue

14 Mode opératoire La réaction de transcription inverse permet de synthétiser un ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir d'un ARN

15 Protocole de CellSearch

16Résultats statistiques

17 Extrait article soumis BioMedCentral Cancer

Annexe8**COMITÉ de PROTECTION des PERSONNES EST-III**

Hôpital de Brabois. Rue du Morvan - 54511 VANDŒUVRE-LES-NANCY Cedex
Téléphone : 03 83 15 43 24 - Télécopie : 03.59.62.06.02 - Courriel : cppest.3@chu-nancy.fr

Projet de recherche enregistré
Sous les références
N° : 2010-A00586-33
N° CPP : 10.07.03

Le Comité a été saisi le 14 février 2014 par Madame Laurinda Fernandes, Chef de Projet de l'Institut de Cancérologie de Lorraine, promoteur, pour l'examen d'une modification substantielle n°2 apportée au protocole intitulé :

Recherche des cellules tumorales circulantes liées à l'acte chirurgical dans les cancers épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures (VADS).

dont l'investigateur est Mme le Docteur Romina Mastronicola (Service de Chirurgie ORL – C. A.V.).

Le Comité a examiné cette modification substantielle n°2 lors de sa séance du 4 mars 2014. Ont participé aux délibérations :

- les membres du Collège n° 1 :

Catégorie 1 : Mr Peton (Titulaire), Mr Beau (Titulaire), Mme Luporsi (Titulaire, qualifié en raison de sa compétence en matière d'épidémiologie), Mr Perrin (Titulaire), Mr Beck (Suppléant),

Catégorie 3 : Mr Bureau (Titulaire),

Catégorie 4 : Mr Pfeiffer (Titulaire), Mme Gaudron (Suppléante),

- les membres du Collège n° 2 :

Catégorie 5 : Mme le Dr Contet Audonneau (Titulaire),

Catégorie 7 : Mme Batt (Titulaire), Mr Lanfroy (Suppléant),

Catégorie 8 : Mme Toussaint (Titulaire),

Catégorie 9 : Mr Petit (Titulaire), Mr Vidal (Titulaire), Mme Boutet (Suppléante).

Le Comité a adopté la délibération suivante : **AVIS FAVORABLE** pour la modification substantielle n° 2 à savoir :

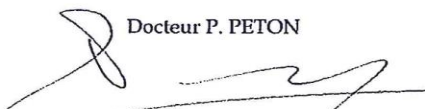
- le courrier de demande de modification substantielle n°2
- Le tableau comparatif concernant la modification substantielle n°2 du 06.02.2014
- le protocole : version n°4 du 06.02.2014
- le synopsis : version n°4 du 06.02.2014
- la note d'information et le formulaire de consentement : version n°2 du 06.02.2014

Le comité attire l'attention sur le risque d'un délai de prolongation insuffisant au regard de la faible inclusion (6 inclusions en 4 ans).

Nancy, le lundi 10 mars 2014

Le Président

Docteur P. PETON



Annexe 9**Protocole CTC VADS**

N° ID RCB : 2010-A00586-33

Recherche des cellules tumorales circulantes liées à l'acte chirurgical dans les cancers épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures (VADS) de stades III et IV

Version n° 4 du 06/02/14

INVESTIGATEUR COORDONNATEUR	Dr Romina MASTRONICOLA Médecin chirurgien ORL Institut de Cancérologie de Lorraine 6 avenue de bourgogne - CS 30519 54519 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex Tél : 03 83 59 85 83 - Fax : 03 83 59 85 72 Email : r.mastronicola@nancy.unicancer.fr
INVESTIGATEUR COORDONNATEUR	Dr Gilles DOLIVET Médecin Chirurgien ORL, Responsable du département de chirurgie ORL Institut de Cancérologie de Lorraine 6 avenue de bourgogne - CS 30519 54519 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex Email

	g.dolivet@nancy.unicancer.fr
PROMOTEUR	Institut de Cancérologie de Lorraine - ICL 6 avenue de bourgogne - CS 30519 54519 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex Tél : 03 83 59 84 00 - Fax : 03 83 44 60 71 Directeur général : Pr Thierry CONROY Email : t.conroy@nancy.unicancer.fr

APPROVATION ET SIGNATAIRES DU PROTOCOLE CTC VADS

Recherche des cellules tumorales circulantes liées à l'acte chirurgical dans les cancers épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures (VADS) de stades III et IV

AUTORITE COMPETENTE	AFSSAPS	Date d'enregistrement : 01/06/2010 N° IDRCB : 2010-A00586-33.	
COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES	Nom du CPP : CPP III-Est	Date d'avis : 07.09.10 Réf CPP : 10.07.03	
Méthodologiste-statisticien	Dr Emmanuel DESANDES, Médecin - Responsable de l'Unité Activité et de Statistiques Médicales -	06/02/14	

	Département de l'Information Hospitalière – ICL Email : e.desandes@nancy.unicancer.fr		
Unité de Recherche Clinique (ICL)	Dr Véronique GILLON Responsable unité de Recherche Clinique Institut de Cancérologie de Lorraine 6 avenue de bourgogne - CS 30519 54519 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex Tél : 03 83 59 86 08 Fax : 03 8 359 83 59 Email : v.gillon@nancy.unicancer.fr	06/02/14	

AUTRES INTERVENANTS :

Unité de Biologie des tumeurs **Pr Jean-Louis MERLIN – Responsable de l'unité de
Biologie des tumeurs - ICL**

Laboratoire d'Immunologie **Pr Gilbert Faure – Responsable du laboratoire
d'Immunologie - CHU Nancy**

RESUME

Titre de l'étude	PROJET CTC-VADS : Recherche des cellules tumorales circulantes liées à l'acte chirurgical dans les cancers épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures (VADS) de stades III et IV.
Promoteur	Institut de Cancérologie de Lorraine 6 avenue de bourgogne - CS 30519 54519 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex Représenté par son directeur général, le Pr T. CONROY
Médecin Investigateur	Dr Romina MASTRONICOLA, Médecin chirurgien ORL, département de chirurgie ORL, Institut de Cancérologie de Lorraine 6 avenue de bourgogne - CS 30519 54519 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex

Type d'étude	Il s'agit d'une étude <i>de soins courants</i> monocentrique française, destinée à quantifier les cellules tumorales circulantes sanguines liées à l'acte chirurgical résection des tumeurs de type épidermoïde des voies aérodigestives supérieures (VADS) de stades III et IV.
Objectifs de l'étude	Objectif principal : Etablir un système de mesure quantitatif standardisé avec lequel le nombre de cellules tumorales circulantes peut être détecté de façon exacte et immédiate dans le sang périphérique en pré, per et post chirurgie de tumeurs épidermoïdes des VADS de stades III et IV. Objectifs secondaires : - Comparer deux techniques de recherche de cellules tumorales circulantes dans le sang périphérique: la méthode d'analyse par RT-PCR et la méthode utilisant le système de détection cellsearch (Veridex®). - Evaluer l'utilisation de la détection de cellules tumorales circulantes au décours de l'acte chirurgical comme marqueur pronostique de la rechute locale, régionale et/ou métastatique des cancers épidermoïdes des VADS de stades III et IV.
Méthodologie	40 patients vont être recrutés lors d'une consultation spécialisée dans le département de chirurgie ORL à l'Institut de Cancérologie de Lorraine en vue de la résection de leur tumeur, puis inclus par le médecin investigateur selon les critères d'éligibilité. Cent vingt échantillons de sang périphérique seront prélevés juste avant la chirurgie (B-1), après la chirurgie (B0) et 7 jours après la chirurgie (B+7). La période d'inclusion est fixée à 54 mois. La période de suivi du patient à partir de la fin de sa chirurgie est de 2 ans. Avant l'inclusion, le médecin : Explique au patient l'étude, Remet au patient la note d'information comportant la non opposition du patient à son inclusion, Doit obtenir l'accord de la participation du patient Au moment de la visite d'inclusion: L'investigateur fait signer le document de non opposition procède à

	un examen clinique et au recueil individuel des données du patient
--	--

40 patients vont être recrutés lors d'une consultation spécialisée dans le département de chirurgie ORL à l'Institut de Cancérologie de Lorraine en vue de la résection de leur tumeur, puis inclus par le médecin investigateur selon les critères d'éligibilité. Cent vingt échantillons de sang périphérique seront prélevés juste avant la chirurgie (B-1), après la chirurgie (B0) et 7 jours après la chirurgie (B+7). La période d'inclusion est fixée à 54 mois. La période de suivi du patient à partir de la fin de sa chirurgie est de 2 ans. Avant l'inclusion, le médecin : Explique au patient l'étude, Remet au patient la note d'information comportant la non opposition du patient à son inclusion, Doit obtenir l'accord de la participation du patient Au moment de la visite d'inclusion: L'investigateur fait signer le document de non opposition procède à un examen clinique et au recueil individuel des données du patient
40 Patients. L'étude est monocentrique, elle se déroulera à l'Institut de Cancérologie de Lorraine.
Critères d'inclusion : 1. Carcinome épidermoïde des VADS de stade III et IV prouvé histologiquement et naïf de tout traitement antérieur. 2. Agé de 18 ans ou plus. 3. Tumeur résécable et patient opérable 4. Hémoglobine ≥ 10 g/dL. 5. Indice de performance status de l'OMS ≤ 2 6. Signature du consentement éclairé avant le début de toute procédure spécifique à l'étude. Critères de non inclusion : 1. Tumeurs d'autre nature histologique antérieure. 2. Affections médicales ou psychiatriques sévères aiguës ou chroniques susceptibles selon l'investigateur de rendre inapproprié l'inclusion du patient dans l'étude. 3. Personnes privées de liberté ou sous tutelle

Un cahier contenant les données démographiques et médicales sera constitué pour chaque patient et doit être rempli.

Ce cahier ne pourra être dévoilé à d'autres personnes ou à un tiers sans l'accord de l'Institut de Cancérologie de Lorraine

Un cahier contenant les données démographiques et médicales sera constitué pour chaque patient et doit être rempli.

Ce cahier ne pourra être dévoilé à d'autres personnes ou à un tiers sans l'accord de l'Institut de Cancérologie de Lorraine

Pour l'objectif principal : le nombre de cellules détectées par millilitre de sang périphérique sera évalué à B-1, B0 et B+7. On utilisera la somme minimale de cellules détectables comme cutoff de positivité aux trois temps de mesure (B-1, B0 et B+7). Le test U de Mann-Whitney sera utilisé pour effectuer la comparaison entre B-1 et B0 et entre B0 et B+7.

Pour les objectifs secondaires:

- les différences de taux de positivité des échantillons entre les deux techniques de mesures (RT-PCR et CellSearch) seront effectuées avec le test de McNemar.
- la date d'origine (T0) sera la date de chirurgie. Pour la survie sans récurrence locale, régionale et métastatique, l'évènement sera respectivement la présence d'une récurrence locale, régionale ou métastatique du cancer des VADS. Les patients non en rémission complète à la fin de la chirurgie seront considérée en échec au temps T0. Le temps de suivi médian sera calculé en utilisant la méthode inverse de Kaplan-Meier (Shuster, J Clin Oncol, 1991). Les survies sans récurrence seront calculées en utilisant la méthode de Kaplan-Meier (Kaplan, J Am Stat Assoc, 1958). Les courbes de survie seront comparées en utilisant le test du Log-Rank (Mantel, Cancer Chemother Rep, 1966). Les risques de rechute en fonction du taux de positivité des échantillons aux trois temps de mesure (B-1, B0 et B+7) seront estimés par le calcul de risques relatifs (RR) et leurs intervalles de confiance à 95% (IC95%) en utilisant les modèles de régression de Cox (Cox, J R Stat Soc B, 1972).

Début des inclusions : Octobre 2010

Fin des inclusions : avril 2015

Fin de l'étude : avril 2017

Annexe 10 Fiche d'inclusion

 CTCVADS	N° centre	N° inclusion	Nom-Prénom -

FICHE DE DEMANDE D'INCLUSION

A faxer au Centre de Recherche Clinique de l'ICL Alexis Vautrin**Fax : 03 83 59 83 59 (Tél : 03 83 59 85 74)****1. IDENTIFICATION**Initiales de la patiente : Nom Prénom Date de naissance : 19 N° de centre: Nom du centre : ICL Alexis VAUTRIN

Médecin investigateur :

2. CRITERES D'INCLUSION

	OUI	NON
1. Age: ≥ 18 ans.	☐	☐
2. Carcinome épidermoïde des VADS de stade III et IV prouvé histologiquement et naïf de tout traitement antérieur.	☐	☐
3. Tumeur résécable et patient opérable.	☐	☐
4. Hémoglobine ≥ 10 g/dL.	☐	☐
5. Indice de performance statut de l'OMS ≤ 2 .	☐	☐
6. Signature du consentement éclairé avant le début de toute procédure spécifique de l'étude.	☐	☐

Date :

Toute réponse « NON » ne permet pas l'inclusion de la patiente dans l'étude

 CTCVADS	N° centre		N° inclusion		Nom-Prénom	

3. CRITERES DE NON INCLUSION

	OUI	NON
1. Tumeurs d'autre nature histologique antérieur.	☐	☐
2. Affections médicales ou psychiatriques sévères aiguës ou chroniques susceptibles selon l'investigateur de rendre inapproprié l'inclusion du patient dans l'étude.	☐	☐
3. Personnes privées de liberté ou sous tutelle.	☐	☐

Toute réponse « OUI » ne permet pas l'inclusion de la patiente dans l'étude

Date de demande d'inclusion :
Nom et Signature du médecin investigateur :

CADRE RESERVE AU CENTRE D'INCLUSION

Votre patient(e), est inclus(e) dans le protocole CTC VADS

à la date du

sous le numéro d'inclusion

Nom :

Signature :

Annexe 11 Système Paxgene

1. Objet et domaine d'application

Le système PAXgene Blood RNA est composé d'un tube à prélèvement sanguin (PAXgene Blood RNA tube) et d'une trousse de purification d'acides nucléiques (PAX BLOOD RNA Kit). Le système a été développé pour le prélèvement, la conservation et le transport d'échantillons sanguins, la stabilisation de l'ARN intracellulaire dans un tube d'échantillon fermé ainsi que l'isolation et la purification de l'ARN intracellulaire à partir de sang total pour la RT-PCR utilisée dans les tests de diagnostic moléculaire.

Mots clés : sang, extraction, ARN

2. Responsabilités

Les techniciennes de l'UBT sont responsables d'assurer la mise à jour à jour de ce mode opératoire.

Le responsable d'Unité de Biologie des Tumeurs est responsable de le faire respecter.

3. Documents de référence

Externe :

PAXgene Blood RNA Kit Handbook – version 2 (IVD) – avril 2008

4. Mode Opératoire

PAXgene Blood RNA tubes (100) – réf. 762165 – BECTON DIKINSON

PAXgene Blood RNA kit - réf.762174 - QIAGEN

Conditions de conservation

Les tubes PAXgene sont conservés à température ambiante

Les colonnes PAXgene RNA (PRC), les colonnes PAXgene Shredder (PSC), la protéinase K (PK) et les tampons (BR1, BR2, BR3, BR4 et BR5) doivent être conservés entre 15 et 25°C.

Le kit RNase-Free DNase, qui contient la DNase I (RNFD), le tampon de digestion d'ADN (RDD) et le tampon de resuspension d'ADN (DRB), est livré à température ambiante dans le même carton que le kit PAXgene Blood RNA.

Il doit être immédiatement placé entre 4 et 8°C.

Contenu du kit

BR 1	Tampon de resuspension	RES BUF	20 ml
BR 2	Tampon de fixation*	BIND BUF	18 ml
BR 3	Tampon de lavage 1*	WASH BUF 1	45 ml
BR 4	Tampon de lavage 2 [†] (concentré)	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Tampon d'élution	ELU BUF	6 ml
RNFW	Eau exempte de RNase (flacon)	PEL WASH	2 x 125 ml
PK	Protéinase K (couvercle vert)	PROTK	2 x 1,4 ml
PRC	Colonnes PAXgene RNA Spin (rouge)	PAXgene RNA COL	5 x 10
PT	Tubes de traitement (2 ml)	PROC TUBE	6 x 50
Hemogard	Bouchons secondaires BD Hemogard™	SEC CLOS	50
MCT	Tubes de microcentrifugation (1,5 ml)	MIC TUBE	3 x 50 1 x 10
RNFD	DNase I, exempte de RNase (lyophilisée)	DNA REM	1500 unités Kunitz [‡]

* N'est pas compatible avec des produits désinfectants contenant de l'eau de javel (hypochlorite de sodium, NaOCl). Contient un sel de guanidine. Veuillez vous référer à la page 7 pour les informations de sécurité.

† Le tampon de lavage 2 (BR4) est fourni comme concentré. Avant de l'utiliser pour la première fois, ajouter 4 volumes d'éthanol (96 à 100%, pureté p.a.) dans le flacon comme indiqué sur l'étiquette pour obtenir une solution prête à l'emploi.

‡ Les unités Kunitz sont généralement utilisées pour mesurer l'activité enzymatique de la DNase I, voir à la page 43 ou 49 pour leur définition.

RDD	Tampon de digestion de l'ADN (couvercle blanc)	DNA DIG BUF	2 x 2 ml
DRB	Tampon de resuspension de la DNase (tube, couvercle lilas)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	Colonnes PAXgene Shredder (lilas)	PAXgene SHRED COL	5 x 10

Matériel supplémentaire

Centrifugeuse capable de centrifuger des tubes de 10ml à 3000g - GR4i JOUAN

Centrifugeuse capable de centrifuger jusqu'à 20000g - MR23i JOUAN

Agitateur chauffant à 55 et 65 °C

Protocole

Vérifier que les échantillons ont été incubés au moins 2 heures à température ambiante (15-25°C) dans le tube PAXgene Blood RNA (BRT) afin d'assurer une lyse complète des cellules sanguines.

Centrifuger le tube PAXgene Blood RNA (BRT) 10 min entre 3000 et 5000 x g dans un rotor à angle variable.

Éliminer le surnageant en le versant ou en l'aspirant à l'aide d'une pipette.

Ajouter 4 ml d'eau exempte de RNase (RNFW) sur le culot et fermer le tube avec un nouveau bouchon de sécurité Hemogard (fourni avec le kit)

Si le surnageant est décanté, prendre garde à ne pas décoller le culot de la paroi du tube et sécher le bord du tube avec un papier absorbant.

Resuspendre le culot en vortexant et centrifuger 10 minutes entre 3000 et 5000 x g dans un rotor à angle variable.

Éliminer le surnageant aussi complètement que possible.

La présence de petits débris cellulaires dans le surnageant avant centrifugation n'affectera pas la procédure. Par contre une élimination incomplète du surnageant peut inhiber la lyse et diluer le lysat, affectant ainsi les conditions de fixation de l'ARN sur la membrane PAXgene.

Ajouter 350 µl de tampon de resuspension (BR1) et mélanger au vortex jusqu'à resuspension totale du culot.

Transférer l'échantillon dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml (MCT).

Ajouter 300 µl de tampon de fixation (BR2) et 40 µl de protéinase K (PK).

Mélanger 5 secondes au vortex et incuber 10 minutes à 55°C dans l'agitateur chauffant, entre 400 et 1400 tr/min.

Après incubation, régler la température de l'incubateur agitateur à 65°C pour la dénaturation des ARN en dernière étape.

Ne pas mélanger le tampon de fixation (BR2) et la protéinase K (PK) avant de les ajouter à l'échantillon.

Transférer en pipetant le lysat directement sur une colonne PAXgene Shredder (PSC, lilas) placée dans un tube de réaction de 2 ml (PT) et centrifuger 3 minutes à vitesse maximale (20 000 x g).

Certains échantillons risquent de s'écouler par la colonne PAXgene Shredder (PSC) sans centrifugation. Cela est dû à la faible viscosité de certains échantillons.

Transférer avec précaution la totalité du liquide passé dans le tube PT dans un nouveau tube de 1,5 ml (MCT) sans décoller le culot du tube PT.

Ajouter 350 µl d'éthanol (96 à 100%).

Mélanger en vortexant et centrifuger brièvement afin d'éviter toute contamination croisée lors de l'ouverture du tube, suite à un éclaboussement des gouttelettes d'échantillon accumulées dans le bouchon.

La centrifugation ne doit pas dépasser 1 à 2 s, car les acides nucléiques risquent d'être culottés et de réduire le rendement en ARN.

A l'aide d'une pipette, déposer 700 µl d'échantillon sur la colonne PAXgene (PRC, rouge) placée dans un tube de réaction de 2 ml (PT) et centrifuger 1 min entre 8000 et 20 000 x g.

Mettre ensuite la colonne PAXgene (PRC) dans un nouveau tube de réaction de 2 ml (PT) et jeter l'ancien tube (PT) contenant l'effluent dans un container DASRI.

A l'aide d'une pipette, déposer le reste de l'échantillon sur la colonne PAXgene RNA (PRC) et centrifuger 1 min entre 8000 et 20 000 x g.

Mettre ensuite la colonne PAXgene (PRC) dans un nouveau tube de réaction de 2 ml (PT) et jeter l'ancien tube (PT) contenant l'effluent dans un container DASRI.

Déposer 350 µl de tampon de lavage 1 (BR3) sur la colonne PAXgene RNA (PRC).

Centrifuger 1 min entre 8000 et 20 000 x g. Mettre ensuite la colonne PAXgene (PRC) dans un nouveau tube de réaction de 2 ml (PT) et jeter l'ancien tube (PT) contenant l'effluent dans un container DASRI.

Dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml (MCT), ajouter 10 µl de solution stock de DNase I (RNFD) à 70 µl de tampon de digestion d'ADN (RDD). Mélanger en tapotant légèrement avec le doigt sur le tube et centrifuger brièvement pour récupérer les gouttelettes sur les parois du tube.

La DNase I est particulièrement sensible à toute dénaturation physique. La mélanger en tapotant légèrement avec le doigt sur le tube. Ne pas vortexer.

Déposer le mélange d'incubation de DNase I (80 µl) directement sur la membrane de la colonne PAXgene RNA (PRC) et laisser incuber 15 min entre 20 et 30°C.

Vérifier que le mélange d'incubation de DNase I (RNFD) déposé se trouve directement sur la membrane. La digestion de la DNase risque d'être incomplète si une partie du mélange reste sur les parois ou sur l'anneau de sertissage du tube (PRC).

Déposer 350 µl de tampon de lavage 1 (BR3) sur la colonne PAXgene RNA (PRC) et centrifuger 1 min entre 8000 et 20 000 x g.

Mettre ensuite la colonne PAXgene (PRC) dans un nouveau tube de réaction de 2 ml (PT) et jeter l'ancien tube (PT) contenant l'effluent dans un container DASRI.

Déposer 500 µl de tampon de lavage 2 (BR4) sur la colonne PAXgene RNA (PRC) et centrifuger 1 min entre 8000 et 20 000 x g.

Mettre ensuite la colonne PAXgene (PRC) dans un nouveau tube de réaction de 2 ml (PT) et jeter l'ancien tube (PT) contenant l'effluent dans un container DASRI.

Le tampon de lavage 2 (BR4) est fourni concentré. Vérifier que l'éthanol a bien été ajouté au tampon (BR4) avant la première utilisation

Ajouter une nouvelle fois 500 µl de tampon de lavage 2 (BR4) à la colonne PAXgene RNA. Centrifuger 3 min entre 8000 et 20 000 x g.

Jeter le tube de traitement (PT) contenant l'effluent dans un container DASRI et placer la colonne PAXgene RNA (PRC) dans un nouveau tube de traitement (PT) de 2 ml. Centrifuger 1 min entre 8000 et 20 000 x g.

Jeter le tube de réaction (PT) contenant l'effluent dans un container DASRI.

Placer la colonne PAXgene RNA (PRC) dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml (MCT) et déposer 40 µl de tampon d'élution (BR5) directement sur la membrane de la colonne PAXgene RNA (PRC).

Centrifuger 1 min entre 8000 et 20 000 x g afin d'éluer l'ARN.

Il est très important d'humidifier complètement la membrane avec le tampon d'élution (BR5) afin d'assurer une meilleure efficacité de l'élution.

Répéter l'étape d'élution avec 40 µl de tampon d'élution (BR5) et le même tube de microcentrifugation (MCT).

Incuber l'éluat 5 min à 65°C dans l'incubateur agitateur sans agitation. Après incubation, le mettre directement dans la glace.

Cette incubation à 65°C dénature les ARN pour les applications ultérieures. Ne pas prolonger le temps d'incubation ni augmenter la température.

Si les échantillons d'ARN ne sont pas utilisés immédiatement, les conserver à -20°C ou -70°C.

L'ARN reste dénaturé après plusieurs cycles de congélation/décongélation, il n'est pas nécessaire de répéter l'incubation à 65°C.

Afin d'obtenir une quantification d'ARN précise et fiable en mesurant l'absorbance à 260 nm, il est recommandé de diluer l'échantillon avec du Tris-Cl 10 mM (pH 7,5).* Les valeurs risquent d'être imprécises ou diminuées si l'échantillon est dilué avec de l'eau exempt de RNase.

Utiliser lors de la mise à zéro du spectrophotomètre le même tampon que pour la dilution de l'ARN et ajouter un volume de tampon d'élution (BR5) équivalent au volume d'ARN élué. Le tampon d'élution (BR5) présente une forte absorbance à 220 nm, pouvant induire un bruit de fond trop élevé des valeurs d'absorbance si le zéro du spectrophotomètre n'est pas convenablement calibré.

Eléments de protection :

Individuels : gants, blouse manche longue

Collectifs : sorbonne se trouvant dans la pièce « Réactifs » de l'UBT.

5. Définitions - Glossaire

/

6. Annexes

/

7. Historique des modifications

Date	Version	Description	Rédacteur(s)
	00.00	Mise en application du document validé	C. Ramacci

Annexe 12**Mode opératoire****Extraction et quantification des ADNc contenu dans les CTC/VADS**

- ✓ Prélèvement sang sur tubes PAXgene : 2.5 ml de sang par tube
- ✓ Conservation des tubes de 2h 12h à température ambiante pour favoriser la lyse des hématies.
- ✓ Conservation des tubes de sang à -20°C jusqu'à l'extraction
- ✓ Extraction des ARN (Mode Opératoire d'extraction des ARN à partir de sang total prélevé sur tubes PAXgene)
- ✓ Dosage et Quantification des ARN sur NanoVue Plus (Mode Opératoire d'utilisation du NanoVue Plus pour le dosage de l'ADN)
- ✓ Transformation des ARN obtenus en ADNc par « Reverse Transcriptase » (voir Mode Opératoire de Reverse Transcriptase)
 - méthode RT – BIORAD
- ✓ Dilution de tous les ADNc au 1/10 pour les manips de PCR
- ✓ PCR : kit iQ SYBR Green Supermix BIORAD réf. 1708880
 - Amorces : GAPDH, PVA, SCCA, EGFR, CK19, EPCAM, CK18, ELF3, CEA, EPHB4
 - Gamme lignée cellulaire Fadu : dilution de 25pg à 100000pg par puits
 - Mix :
 - 10 µl iQ™ SYBR Green supermix
 - + 1µl amorces sens et anti-sens 0.5mM
 - + 6µl eau

Sur plaque 384 puits : 18 µl de mix par puits (*en duplicat*)
+ 2 µl ADNc

- PCR : programme sur Light Cycler 480 – ROCHE

	Nb. Cycles	température	temps
dénaturation	1	95°C	5 mn
amplification	45	95°C	10 sec
		58 à 62°C *	20 sec
courbe de fusion		72°C	15 sec

**température d'appariement en fonction des amorces (voir tableau amorces)*

- Résultats :

Quantification absolue : détermination d'une quantité en picogrammes d'ADNc cible en fonction de la gamme étalon de calibrage. (Logiciel Light Cycler 480 SW version 1.5)

amorces	séquences		température appariement
EPHB4sens	CCA-GCC-AAT-AGC-CAC-TCT-AAC-AC	(23 b)	60°C
EPHB4anti-sens	CAG-GGA-GGA-GCC-GTT-CAG-G	(19 b)	
CEAsens	CTC-ACA-GCC-TCA-CTT-CTA-ACC-TTC	(24 b)	60°C
CEAanti-sens	TGC-CAT-CCA-CTC-TTT-CAC-CTT-TG	(23 b)	
ELF3sens	GCT-CCC-ACT-CCT-CAG-ACT-CC	(20 b)	60°C
ELF3anti-sens	GCG-TGC-TTG-CTC-TTC-TTG-CC	(20 b)	
CK18sens	GCC-CGT-CTT-GCT-GCT-GAT-G	(19 b)	58°C
CK18anti-sens	ACT-TCC-TCT-TCG-TGG-TTC-TTC-TTC	(24 b)	
EPCAMsens	TGT-GGT-TGT-GGT-GAT-AGC-AGT-TG	(23 b)	60°C
EPCAManti-sens	CCC-ATC-TCC-TTT-ATC-TCA-GCC-TTC	(24 b)	
CK19sens	GAG-GGA-CAG-GAA-GAT-CAC-TAC-AAC	(24 b)	58°C
CK19anti-sens	TGG-CAG-GTC-AGG-AGA-AGA-GC	(20 b)	
EGFRsens	CGT-GCC-CTG-ATG-GAT-GAA-GAA-G	(22 b)	60°C
EGFRanti-sens	GGT-GGA-ATT-GTT-GCT-GGT-TGC	(21 b)	
SCCAsens	CTG-CCA-AAT-GAA-ATC-GAT-GGT	(21 b)	62°C
SCCAanti-sens	GCA-AAC-TTG-TCC-ATT-CCA-TCA-A	(22 b)	
PVAsens	CAT-GAA-TTT-TCT-GGA-CTC-CTA-CTT-TTC-T	(28 b)	62°C
PVAanti-sens	TTG-CTT-CCT-GGC-CAT-CGT	(18 b)	
GAPDHsens	GAA-GGT-GAA-GGT-CGG-AGT-C	(19 b)	60°C
GAPDHanti-sens	ATG-GGT-GGA-ATC-ATA-TTG-GAA-C	(22 b)	

Annexe 13**Mode opératoire ARN NanoVue**

Ce document a été élaboré par l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Il est destiné à un usage interne, et son

utilisation hors de ce contexte n'engage donc pas ses auteurs. © Tous droits réservés

1. Objet et domaine d'application

Ce mode opératoire décrit la marche à suivre pour doser de l'ARN en solution avec le NanoVue à l'UBT en vue d'en obtenir la concentration.

Ce document s'adresse aux techniciennes de l'Unité de Biologie des Tumeurs.

Mots clés : Dosage - ARN - NanoVue

2. Responsabilités

Les techniciennes de l'UBT sont responsables d'assurer la mise à jour de ce document.

Le référent technique de l'UBT est responsable de le faire respecter

3. Documents de référence**Externe :**

NanoVue Plus™ Product User Manual (25-9574-75UM AE 05/2010)

Norme NF EN ISO 15189 : 2012

SH REF 02

Référentiel Qualité Interne :

FO/ANAP/210 Calibration du NanoVue

FO/ANAP/222 Contrôles Internes de Qualité Dosage de l'ADN par Méthode spectrophotométrique (NanoVue)

FO/ANAP/226 Formulaire Pré-analytique

MO/ANAP/1052 Mode opératoire d'évaluation interne et externe de la qualité du dosage de l'ADN

Enregistrement :

Feuille de traçabilité de la calibration affichée au poste de travail

Résultats d'analyse UBT du dosage dans les fichiers Excel « Série d'Analyses ADN N°XX AAAA »

4. Mode Opératoire

Eléments de protection :

Individuels : gants

Collectifs : non applicable

DATE D'APPLICATION : 10/08/2015

VERSION : 02.01

PAGE : 1/4

IDENTIFICATION

MO/ANAP /912

**TITRE MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU NANOVIEW PLUSTM POUR LE
DOSAGE DE L'ADN GENOMIQUE A L'UBT**

Nom (s) Fonction (s) Date

REDACTION Cindy DUBOIS

M. ROUYER

Technicienne

Technicienne

28/07/2015

28/07/2015

VALIDATION Alexandre HARLE AHU (Réfèrent technique UBT) 30/07/2015

APPROBATION QUALITE

ACCORD POUR DIFFUSION

17/08/2015

**SI VOUS UTILISEZ UN EXEMPLAIRE PAPIER DE CE DOCUMENT, VERIFIEZ LA PRESENCE DU LOGO «
ASSURANCE QUALITE » ROUGE.**

SANS CE LOGO, CONSIDEREZ CE DOCUMENT PAPIER COMME NON MAITRISE.

Identification MO /ANAP / 912 Version 02.01

Mode Opérateur d'utilisation du NanoVue Plus™

pour le dosage de l'ADN génomique a l'UBT Page 2 sur 5

*Ce document a été élaboré par l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Il est destiné à un usage interne,
et son*

utilisation hors de ce contexte n'engage donc pas ses auteurs. © Tous droits réservés

a) Calibration du NanoVue Plus™ :

La calibration de l'appareil (n° inventaire : 12022 000) est à réaliser dans les cas suivants :

- à chaque déplacement de celui-ci dans le laboratoire
- en cas d'observation d'une déviation lors des mesures des contrôles qualités internes effectuées avec

chaque série d'analyse (MO/ANAP/1052)

- ou tous les 6 mois

Remplir la feuille de traçabilité de la calibration (FO/ANAP/210) affichée au poste de travail.

Marche à suivre pour la calibration :

- Allumer l'appareil
- Choisir l'option 5 : Utilitaires

- Choisir l'option 7 : Pathlength Calibration
- Entrer le numéro de lot correspondant au réactif
- Entrer le « CAL » indiqué sur le réactif
- Appuyer sur OK
- Réaliser deux mesures de « blancs » (eau RNase DNase free) de la façon suivante :
 - Ouvrir le couvercle
 - Avec la pipette de 2,5 µL, déposer 2 µL d'eau à l'endroit indiqué par la flèche
 - Jeter le cône dans la poubelle sur la pailasse
 - Fermer le couvercle
 - Appuyer sur la touche : A0/100%T
 - Ouvrir le couvercle, essuyer avec un coton absorbant (Tampon d'ouate de cellulose en rouleau, Ref : 143 213, Pur Zellin)
 - Répéter une deuxième fois cette mesure avec l'eau
- Réaliser 10 mesures avec le liquide de calibration de la façon suivante :
 - Ouvrir le couvercle
 - Déposer une goutte de solution de calibration
 - Fermer le couvercle
 - Appuyer sur la touche :
 - Ouvrir le couvercle, essuyer avec un coton absorbant le support hydrophobe et la partie supérieure (sous le couvercle)
 - Répéter cette opération pour les 10 mesures
- Une fois les 10 mesures effectuées, appuyer sur OK
- Un message indiquant que la calibration est réalisée avec succès s'affiche
- Appuyer sur OK
- Un message indiquant que la calibration est correctement réalisée s'affiche sur l'écran
- Appuyer sur OK
- Le « Pathlength Calibration » s'affiche

Si ce message ne s'affiche pas ou si un message d'erreur apparaît à l'écran, recommencer la procédure

de calibration

L'appareil est correctement calibré : NE PAS LE DEPLACER !

Identification MO /ANAP / 912 Version 02.01

Mode Opérateur d'utilisation du NanoVue Plus™

pour le dosage de l'ADN génomique a l'UBT Page 3 sur 5

Ce document a été élaboré par l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Il est destiné à un usage interne, et son

utilisation hors de ce contexte n'engage donc pas ses auteurs. © Tous droits réservés

b) Réalisation du dosage :

S'assurer que le nombre de tubes et la dénomination de ceux-ci correspondent bien aux informations de

la liste de travail PRE-ANALYTIQUE, voir s'il s'agit d'une erreur de saisie.

Pour chaque échantillon de la série, les concentrations sont mesurées deux fois

- Allumer l'appareil
- Choisir l'option 2 : Life Science
- Appuyer sur OK
- Choisir l'option 1 : ADN
- Appuyer sur OK
- Insérer la carte SD fournie avec l'appareil sur le haut de l'appareil
- Appuyer sur le bouton central « XXV »
- Appuyer sur la touche 9 « auto-print » : l'enregistrement sera ainsi réalisé tout au long du dosage sur la carte SD

- Appuyer sur la touche 7 « Sample Number » pour nommer les échantillons :

dans la case préfixe : **S n° de semaine / n° échantillon (ex. S22/1)**

dans la case numéro : **1 (ou le numéro de la mesure)**

Penser à modifier le numéro d'échantillon entre les différents tubes d'ADN

- Appuyer sur OK pour valider
- Réaliser deux mesures de « blancs » (solution d'élution de l'ADN) de la façon suivante :
 - Ouvrir le couvercle
 - Avec la pipette de 2,5 µL, déposer 2 µL de solution d'élution de l'ADN à l'endroit indiqué par la flèche
 - Jeter le cône dans la poubelle sur la paillasse
 - Fermer le couvercle
 - Appuyer sur la touche : A0/100%T

S'assurer que le voyant rouge à droite de la carte SD soit allumé (confirme l'enregistrement des données)

- Ouvrir le couvercle, essuyer avec coton absorbant
- Répéter une deuxième fois cette mesure avec la solution d'élution de l'ADN
- Réaliser les mesures de tous les échantillons de la série de la façon suivante :

- Ouvrir le couvercle
- Avec la pipette de 2,5 µL, déposer 2 µL de solution d'ADN génomique
- Jeter le cône dans la poubelle sur la paillasse
- Fermer le couvercle
- Appuyer sur la touche :
- Ouvrir le couvercle, essuyer avec un coton absorbant et de l'eau distillée
- Répéter cette opération pour toutes les mesures
- Une fois toutes les mesures réalisées, appuyer sur ESC
- Retirer la carte SD de l'appareil et nettoyer la zone de mesure avec de l'eau RNase DNase free puis l'éteindre.

Si un écart de plus de 10% est observé entre les valeurs des deux mesures du même échantillon, refaire une 3ème mesure et s'assurer que l'écart avec la valeur la plus proche est inférieur à 10%. Si l'écart est

toujours supérieur à 10%, noter « écart 10% dosage » dans la colonne « Précisions et conduite à tenir » du

formulaire Pré-analytique FO/ANAP/226. *Ce commentaire sera à prendre en compte lors de l'analyse des résultats.*

Identification MO /ANAP / 912 Version 02.01

Mode Opérateur d'utilisation du NanoVue Plus™

pour le dosage de l'ADN génomique a l'UBT Page 4 sur 5

Ce document a été élaboré par l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Il est destiné à un usage interne, et son

utilisation hors de ce contexte n'engage donc pas ses auteurs. © Tous droits réservés

c) Enregistrement des résultats du dosage :

- Insérer le lecteur de carte SD/USB contenant la carte SD du NanoVue dans l'ordinateur
- Double-cliquer sur le fichier PVC contenu sur le disque amovible (ex : DNA-A001)
- Cliquer sur **Export** et enregistrer le fichier Excel comme suit : **Dosage Sxx AAAA** (xx = n° série et AAAA année en cours) dans le dossier du gp_ubt : **Résultats d'Analyses UBT AAAA / Série d'Analyses ADN N°XX AAAA** correspondant à la série d'analyses en cours
- Ouvrir le fichier Excel pour récupérer les résultats et les copier dans les formulaires FO/ANAP/234 et 233
- Protéger les résultats en allant dans l'onglet **Révision** du fichier Excel et en cliquant sur **Protéger la feuille**.

Vérifier que les échantillons sont correctement identifiés sinon faire les modifications sur le document

Excel avant de le verrouiller

5. Définitions - Glossaire

UBT : Unité de Biologie des Tumeurs

ACP : Anatomie et Cytologies Pathologiques

MO : Mode Opérateur

Identification MO /ANAP / 912 Version 02.01

Mode Opérateur d'utilisation du NanoVue Plus™

pour le dosage de l'ADN génomique a l'UBT Page 5 sur 5

Ce document a été élaboré par l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Il est destiné à un usage interne, et son

utilisation hors de ce contexte n'engage donc pas ses auteurs. © Tous droits réservés

6. Historique des modifications

Date Version Description Rédacteur(s)

22/10/2012 00.00 Mise en application du document validé S.Machinet

20/12/12 00.01 Modification de la référence matériel pour le nettoyage de l'appareil entre chaque dosage.

Modifications n'entraînant pas validation

C. Dubois

23/05/2014 00.02 Relecture n'entraînant pas modification. Mise à jour de la charte graphique. Modification ne nécessitant pas validation.

C. Ramacci

19/08/2014 01.00 Ajout de **NRAS** dans les mots clés.

Dans le paragraphe 5 :

- suppression de « DNA SD : diluant d'échantillon

ADN présent dans le kit cobas® *KRAS* (ou *BRAF*)

Mutation Test ».

- ajout de « DNA EB : tampon d'élution du kit

Cobas® sample DNA preparation de ROCHE ».

C. Dubois

10/08/2015 02.00 - Modification d'un rédacteur, suppression de Sandra MACHINET

- Remplacement de Jean-Louis MERLIN par

Alexandre HARLE pour la validation et de C.

Ramacci par V. Chambonnière

- Modification des mots clés
- Ajout des références de documents RQI et du formulaire de traçabilité
- Modification de la nomenclature des échantillons dans le NanoVue
- Dépôt d'une goutte de solution de calibration au lieu de 2 μ l
- Modification du DNA EB en solution d'élution de l'ADN pour la solution d'élution d'ADN
- Modification de la conduite à tenir en cas d'écart supérieur à 10% entre deux valeurs :note à placer dans le formulaire pré-analytique
- Modification de l'enregistrement des données et suppression de l'impression
- Ajout de la protection du fichier Excel

M. Rouyer / C. Dubois

17/08/2015 02.01 Ajout de M. Rouyer en tant que co-rédacteur –
Ajout de sa validation. Modification ne nécessitant pas validationV ; Chambonnière

Annexe 14**Mode opératoire La réaction de transcription inverse permet de synthétiser un ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir d'un ARN**

Ce document a été élaboré par l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Il est destiné à un usage interne, et son

utilisation hors de ce contexte n'engage donc pas ses auteurs. © Tous droits réservés

1. Objet et domaine d'application

La réaction de transcription inverse permet de synthétiser un ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir d'un ARN.

Suivant les différentes enzymes utilisées (reverse transcriptase) les modes opératoires peuvent être différents.

Ce mode opératoire s'adresse aux techniciens de l'UBT.

2. Responsabilités

Les techniciens sont responsables d'assurer la mise à jour à jour de ce mode opératoire. Le chef d'Unité est responsable de le faire respecter.

3. Documents de référence

Source : fiche technique iScript cDNA Synthesis Kit Biorad

Source : fiche technique « SuperScript III Reverse Transcriptase » invitrogen

Source : fiche technique « RNase H » invitrogen

4. Mode Opératoire

· RT – Biorad :

Kit réf. : 170-8890

5x iScript Reaction Mix

Nuclease Water free

iScript Reverse Transcriptase

(garder tous les réactifs à -20°C)

- Déposer dans un tube eppendorf à paroi fine 1 µg d'ARN totaux.

- Compléter à 11 µl avec de l'eau « nuclease free »

- Préparer un mix contenant :

4µl de 5x iScript Mix

4µl d'eau

1µl de iScript Reverse Transcriptase

par échantillon à traiter

- Déposer 9 µl de mix par tube

- Fermer le tube

DATE D'APPLICATION : **07/10/2014**

VERSION : **00.01**

PAGE : **1/3**

IDENTIFICATION

MO/ ANAP/591

TITRE MODE OPERATOIRE DE REVERSE TRANSCRIPTASE A L'UBT

Nom (s) Fonction (s) Date

REDACTION Carole RAMACCI technicienne **06/04/2010**

VALIDATION Jean-Louis MERLIN Resp. Unité de Biologie des Tumeurs **28/04/2010**

APPROBATION QUALITE

ACCORD POUR DIFFUSION

07/10/2014

SI VOUS UTILISEZ UN EXEMPLAIRE PAPIER DE CE DOCUMENT, VERIFIEZ LA PRESENCE DU LOGO « ASSURANCE QUALITE » ROUGE.

SANS CE LOGO, CONSIDEREZ CE DOCUMENT PAPIER COMME NON MAITRISE.

Identification MO / ANAP /591 Version 00.01

Mode Opérateur de reverse transcriptase à l'UBT Page 2 sur 3

Ce document a été élaboré par l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Il est destiné à un usage interne, et son

utilisation hors de ce contexte n'engage donc pas ses auteurs. © Tous droits réservés

- Centrifuger (centrifugeuse de paillasse)

- Vortexer

- Centrifuger

- Mettre le tube dans le thermocycleur : programme RT-Bio

5mn – 25°C

30mn – 42°C

5mn – 85°C

4°C (peut rester une nuit)

· RT – invitrogen :

SuperScript III Reverse Transcriptase réf. : 18080-093

SuperScript III RT (200u/µl)

5x First-Strand Buffer

0.1M DTT

(garder tous les réactifs à -20°C)

- Déposer dans un tube eppendorf à paroi fine 1 µg d'ARN totaux
- Compléter à 11 µl avec de l'eau DEPC
- Ajouter 1µl d'amorces aléatoires à 500ng / µl
- Centrifuger, vortex, centrifuger
- Ajouter 1µl de dNTP 10mM
- Incuber dans le thermocycleur : programme RT-invitro

5mn - 65°C

- Centrifuger rapidement
- préparer un mix contenant :

4µl de 5x First-Strand Buffer

1µl 0.1M DTT

1µl SuperScript III RT

par échantillon à traiter

- Distribuer 7µl de mix dans chaque échantillon
- Dentrifuger
- Vortexer
- Centrifuger
- Incuber dans le thermocycleur :

5mn - 25°C

40mn – 50°C

15mn – 70°C

- Ajouter 1µl de RNase H à chaque tube et incuber

Ribonucléase H réf. : 18021-071

20mn – 37°C

Garder l'ADNc à 4°C

- Gants obligatoires
- Matériel "stérile" ARN - ADN free
- Mettre le volume d'eau nécessaire pour avoir en final 11 µl avant l'ARN et rincer le cône dedans.
- Lors de la distribution en série d'une solution déposer la goutte sur le haut du tube sans toucher la paroi, afin de ne pas contaminer les tubes suivants. (Cela évite de changer de pointe à chaque fois)
- La centrifugeuse utilisée est une micro centrifugeuse de paillasse.
- La superscript est gardée à -20°C en solution dans du glycérol (boite bleue "cryobox)

Identification MO / ANAP /591 Version 00.01

Mode Opérateur de reverse transcriptase à l'UBT Page 3 sur 3

Ce document a été élaboré par l'Institut de Cancérologie de Lorraine. Il est destiné à un usage interne, et son

utilisation hors de ce contexte n'engage donc pas ses auteurs. © Tous droits réservés

- Les solutions d'enzyme dans le glycérol ne doivent pas être vortexées
- Lorsqu'on ajoute les solutions de glycérol, faire plusieurs flux et reflux
- Eviter de toucher le fond des tubes d'enzyme avec les doigts pour ne pas les réchauffer

· Préparation solution de dNTP10mM :

100mM dNTP Set, PCR Grade réf.: 10297-018 (M3381K) invitrogen

4x 250µl dATP, dCTP, dGTP et dTTP 100mM

Mélanger dans un tube eppendorf 100µl de chaque dNTP

Compléter à 1000µl avec de l'eau RNase-DNase free.

Garder la solution à cette concentration ou diluer 4x pour obtenir une solution à 2.5mM

· Préparation de la solution d'amorces aléatoires 500 ng/µl:

Random primers 1.5mM réf. : 48190011 (M3570D) invitrogen

Dilution 1/ 6 dans eau DNase, RNase free.

5. Historique des modifications

Date Version Description Rédacteur(s)

30/04/2010 0 Mise en application du document validé C. Ramacci

07/10/2014 00.01 Relecture ne nécessitant pas de modification

excepté la mise à jour de la charte graphique

Annexe 15 Protocole CellSearch

Pour effectuer les manipulations sur le CellSearch :

- prélever 10 mL de sang d'un patient, dans les tubes spéciaux fournis dans le kit appelés CellSave Collection Tube, au pli du coude en éliminant les premières gouttes de sang (cela permet d'éviter la contamination du prélèvement avec des cellules épithéliales qui expriment les marqueurs similaires aux cellules tumorales circulantes). Après prélèvement bien homogénéiser les tubes par retournement (8x)
- Prélever 7.5 mL de chaque tube et les transférer dans des grands tubes coniques (présents dans le kit)
- Ajouter dans chaque tube contenant déjà 7.5 mL de sang, 6.5 mL de tampon (même tampon que précédemment)
- Homogénéiser correctement par retournement (8x) puis centrifuger les tubes 10 min à 800g

Les tubes sont alors prêts à être charger dans le CellTracks AutoPrep.

- Avant de lancer l'automate, changer tout d'abord le bidon d'eau qui sert au lavage de l'appareil et le remplacer par le bidon contenant du tampon. Ici, l'anticorps anti EGFR est rajouté pour permettre une meilleure caractérisation des cellules tumorales donc placer un tube contenant un volume approprié d'anticorps dans le carrousel du kit en position 1 (volume donné par la notice du kit en fonction du nombre de tube de sang à analyser)
- Suivre ensuite les instructions de l'automate

En fonction du nombre de tubes à analyser, le fonctionnement du CellTracks AutoPrep est plus ou moins long, compter environ 4h pour 6 tubes.

- Après ces 4h, sortir les MagNests de l'automate et les placer de 20 min à 24h à température ambiante, à l'obscurité (le mieux est de les laisser tout une nuit)
- Le lendemain, allumer le CellTracks Analyzer II et attendre que les différentes lampes soient allumées. Ensuite placer, un à un les différents MagNests dans l'emplacement prévu à cette effet et attendre que l'image soit retranscrite sur le logiciel
- Après avoir passé les différents MagNests, analyser les résultats : cliquer sur chaque cellule ayant les propriétés d'une cellule tumorale (CK 19 +, DAPI +, CD45- et EGFR+) pour les sélectionner
- Imprimer alors le(s) compte(s) rendu(s)

Annexe 16 Résultats statistiques

Marqueurs	Pré	J+2h	J+7	p value	1vs3	2vs3	1vs2
PVA	305;309(65)	322;324(83)	360;361(105)	0,0542			
CK19	1,325;1,41(0,8)	1,88;1,82(0,93)	1,44;1,55(0,91)	0,2525			
EGFR Log	32,97;32,86(3,82)	34,43;34,86(5,2)	33,1;33,75(4,97)	0,2152			
CK18	65,6;65,03(22,71)	75,28;72,95(30,77)	52,2;52,22(23,63)	0,0011	sig	sig	pas de diffe
EPCAM	40,34;70,15(114,87)	89,76;153,20(170,45)	41,25;66,04(117,50)	0,0299	limite	sig	limite
CEA	118282;123944,91(51178,96)	193255,68;211501,75(113007,63)	141151,41;154495,79(69598,56)	0,0006	sig	sig	sig
EIF3	154,03;167,92(41,23)	153,89;154,89(20,39)	147,9;157,80(26,15)	0,0764			
SCCA	2500;2642,87(5113,03)	2500;2736,22(4356,27)	0;2269,54(3591,02)	0,6551			
EPHB4	10090,18;10703,41(5505,76)	16132,19;20975,23(15219,89)	10618,94;11406,49(7465,12)	0,0003	sig	sig	sig
CTC SELLCEARC	0;2 (3)	0;1(2,5)	0;1(2)	0,1794			
CTS CELLSEARCH EGFR	0;1(2,5)	0;0(1)	0;0(1)	0,0195	sig	sig	sig

A rare case of extremely high counts of circulating tumor cells detected in a patient with an oral squamous cell carcinoma

Xianglei Wu 1, 2, 3, Romina Mastronicola 4, Qian Tu 1, 2, Gilbert Faure 1, 2, Marcelo De Carvalho 1, 2*, Gilles Dolivet 2, 4*

1 : Laboratory of Immunology, Nancytomic platform, CHU of Nancy, France.

2 : SBS Department, CRAN, UMR 7039 CNRS, University of Lorraine, France.

3 : Department of Otolaryngology - Head and Neck surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, China

4: Head and Neck Surgery and Dental Units, Oncologic Surgery Department, Institut de Cancérologie de Lorraine, France.

Email addresses: wxlthibaut@gmail.com (X W); r.mastronicola@nancy.unicancer.fr (R M-P); catherine.tu1986@gmail.com (Q T); gilbert.faure@univ-lorraine.fr (G F); marcelo.decarvalho@univ-lorraine.fr (M DC); g.dolivet@nancy.unicancer.fr (G D).

Abstract

Background: Despite aggressive regimens, the clinical outcome of oral squamous cell carcinoma remains poor. The detection of circulating tumor cells possesses potential to improve the management of patients with cancer, including diagnosis, treatment strategy, and surveillance. In light of current evidences, the CellSearch® is the most widely used and only Food and Drug Administration-cleared system of detection, which normally find low count.

Case presentation: A 56-year-old white male, with no particular medical history, had been diagnosed a squamous cell carcinoma of oral cavity. According to the imaging results (computed tomography and 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography / computed tomography) and panendoscopy, the TNM staging has been classified as T4N2M0. A noninterruptive pelvimandibulectomy has been conducted according to the multidisciplinary meeting advices and the postoperative observations were normal. The patient has been found a recurrence by computed tomography because of a painful cervical edema and a trismus 6 weeks after the surgery and died two weeks later. Since the patient was recruited into a clinical reserach, the detections of circulating tumor cells in 7.5ml peripheral venous blood by using the CellSearch® system have found very high count

compared with known relative reports at all three time points (preoperative, 400; intraoperative, 150; postoperative day-7, 1400). Of note, all detected circulating tumor cells were epidermal growth factor receptor negative.

Conclusion: We firstly reported a rare case of circulating tumor cells with extremely high counts from a patient with oral squamous cell carcinoma by using the CellSearch® system. The absolute number of circulating tumor cells might predict a particular phase of cancer development as well as a poor survival, which eventually contribute to the personalized healthcare.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; circulating tumor cells; head and neck squamous cell carcinoma; survival.

Introduction

Head and neck cancer, the sixth leading cancer by incidence worldwide [1], develops from the mucosal linings of the upper aerodigestive tract. Approximately 95% of head and neck cancers are squamous cell histologies [2], also known as HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma). Despite aggressive regimens, many HNSCC patients (20 - 30%) develop locoregional recurrence (local recurrence / cervical lymph node metastasis) or distant metastases. In addition, even in cases where the resection margins were negative in histopathological examination, there is still a risk of local recurrence in 20% of cases [3, 4]. Due to these circumstances, the five-year survival rate of for all stages combined is 40 - 50%.

The role of circulating tumor cells (CTC), which eventually detach from the primary tumor and disseminate in the blood and even in other body fluid, has been considered as a "liquid biopsy" in clinical assessment of patient with cancer [5]. The diagnostic and prognostic value of CTC detection has been established in some cancers, like breast, colorectal and prostate cancers [6-8], but not yet in HNSCC. Here, we reported extremely high enumerations of CTC detected in a patient with an oral squamous carcinoma, which might also explain his quick relapse and short survival.

Case presentation

A 56-year-old white male, former pipefitter, 68kg /169cm, with little medical-surgical and family history, presented recently a lesion of oral cavity. The risk factors with smoking which is currently unweaned, valued at about 40 pack-years. A period of alcohol was present in his life and currently is weaned for 3 years. A physical examination found an ulcerative lesion on the right anterolateral floor of oral cavity, which was adherent to the gingival fibro mucosa. Several leukoplakias were also noted on the gingival mucosa. The rest of the otolaryngology examination appears unremarkable.

A biopsy has confirmed the lesion as invasive well- / moderately-differentiated squamous cell carcinomas. Simultaneously, a contrasted computer tomography (CT) scan showed a tumoral process involving the muscles of the anterolateral floor of oral cavity, which extended about 3 cm in the long axis and remains lateralized to the right (Figure 1). The lesion was in contact with the mandible and furthermore developed a suspicious bone notch. No cervical lymph nodes of significant size and no other suspicious lesions on the cervical-thoracic level were presented in this CT scan. A 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography / computed tomography (18F-FDG PET/CT) scan found a lesion of intense hypermetabolism next to the right genio-glosse triangular muscles and lips, which seemed to repel the omohyoid muscle without infiltrating it (Figure 2). A lytic aspect of the cortical bones of the mandible body suggested a bone extension. 18F-FDG uptakes were perceptible in lymph nodes of right groups Ib and II. The patient received a panendoscopy under general anesthesia. The upper gastrointestinal endoscopy and the bronchoscopy did not find any abnormalities.

According to advices made by the multidisciplinary meeting, the TNM staging had been classified as T4N2M0 (according to American Joint Committee on Cancer 2009) [9] and noninterruptive pelvimandibulectomy was validated as the primary treatment. The surgery has been performed in a satisfactory manner 2 months after the first consultation. The post-operative care was performed by standard procedures without abnormality. The pathological analysis of excised specimens confirmed the squamous cell carcinoma histology as well as the lymph node metastases (Figure 3), suggesting the definitive TNM stage as pT4aN2cM0. In addition, the margins were negative but multiple tumor nodules were found in the muscle.

At the end of 6 weeks postoperative follow-up, the patient complained a painful cervical edema as well as a trismus. A CT scan has been ordered, which found a regional multiple recurrences (Figure 4). The multidisciplinary meeting has updated the treatment strategy including a surgical retake and following radiochemotherapy. However, the patient died 2 weeks later due to ?.

Detection of CTC

Since the patient has been recruited into a clinical research called VADS (EudraCT N°: 2010-A00586-33, approved by regional ethic committee “Comité de Protection des Personnes Est III”), blood samples have been collected at three time points (preoperative day-1, intraoperative, and postoperative day-7) for detecting the presence of CTC. The manipulations have been performed by using the CellSearch® system (Veridex LLC, Raritan, NJ) according to a standard protocol [10]. The commercially available CellSearch® Tumor Phenotyping Reagent Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) kit (Veridex LLC, Raritan, NJ, USA) was used on the fourth channel of fluorescence of the CellSearch® system following the manufacturer’s instructions. The pre-, intra-, and post-operative enumerations of CTC were shown in Figure 5. The high count of CTC has already been detected at baseline, decreasing by 67.5% at the time point of surgery, after which it increased significantly. In particular, all CTC were EGFR negative. Typical images of CTC were shown in Figure 6.

Discussion

To our knowledge, we reported firstly the extremely high enumerations of CTC in the patient with the squamous cell carcinoma of oral cavity. At present, the CellSearch® System is the most commonly used and the only Food and Drug Administration (FDA)-cleared CTC detection technique, which is EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) based-capture enrichment. Current evidences provided by this test found a range of 0 - 5 CTC in 7.5 ml blood as the quantification, which also associated with the clinical features or survival of patients with HNSCC [11-15]. In this case, the initial CTC had already been counted decuple at the known maximum. Moreover, the absolute number achieved several hundred times at postoperative day-7.

In view of few studies available to provide potential mechanism, we could not rationalize these findings but just propose a supposition: based on the fact that absolute number of EpCAM positive circulating epithelial cells was upregulated as well as the absent expression of EGFR, the CTC were probably in a particular phase associated with mesenchymal–epithelial transition (MET). Since the samples were detected individually according to the standard semi-automated procedure, we have eliminated the possibility of technical confounders, such as contaminations. Besides, the studies by using the same method but researched on other malignancies, like breast [16], prostate [17], colorectal [18], and gastrointestinal cancer [19] have never found such high counts. EGFR is overexpressed in over 90% of HNSCC [20] but with a huge discordance between the primary tumor and CTC. Grisanti et al. [14] found that the EGFR was expressed in 45% of CTC from patients with recurrent or metastatic HNSCC. In this work, no CTC was found to be EGFR positive regardless of time point. Generally, MET is thought as the reverse biological process of epithelial–mesenchymal transition (EMT), but relatively poor evidence has been found about its role plays in cancer when compared to the extensive studies of the latter. Given that MET induce upregulation of epithelial markers (E.g. EpCAM) and that MET facilitates allowing cancerous cells to regain epithelial properties, the deletion of EpCAM+EGFR+CTC vis-a-vis the enormous amount of EpCAM+EGFR-CTC might identify the development of MET. In addition, the higher count of CTC at the postoperative day-7 could be the re-entry of disseminative tumor cells in mesenchymal tissues into the circulation [21].

The very short survival of this patient (disease-free survival, DFS and overall survival, OS) might associate with the presence and especially the high absolute number of CTC. Even the patient was diagnosed at stage IVA, the DFS of 1 month and the OS of 2 months still indicated strongly a rapid progression. The routine evaluation, TNM staging, seemingly could not provide a plausible argument on this clinical outcome. Of note, the presence of CTC has been reported to be an independent prognostic factor for predicting survival of HNSCC patients with higher sensitivity at various disease stages than routine staging procedures [14, 22, 23]. High postoperative levels of CTC have also been reported to accurately predict tumor recurrence [24].

Conclusion

In conclusion, this paper reported for the first time a rare case of CTC with extremely high counts potentially associated with the short survival in terms of oral squamous cell carcinoma. The detection of CTC constantly monitors the changes in tumor biology by means of “liquid biopsy”. Such findings are of great significances in terms of personalized healthcare, although might not be frequent. Our data also suggest with caution a conceivable observation of MET, which deserves confirmation.

Consent

Written informed consent was obtained from the patient for publication of this Case report and any accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editor of this journal.

List of abbreviations

FDA : food and drug administration; TNM : tumor nodes metastasis; CT : computed tomography; 18F-FDG PET/CT: 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography / computed tomography; HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma; CTC: circulating tumor cells; EGFR: epidermal growth factor receptor; EpCAM: epithelial cell adhesion molecule; MET: mesenchymal-epithelial transition; EMT: epithelial-mesenchymal transition; DFS: disease-free survival; OS: overall survival.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

X W and Q T conducted the manipulations and data analysis; R M-P was responsible for the clinical management; X W wrote the manuscript; R M-P, G F, M DC and G D were in charge of the concept and design of the study; M DC and G D reviewed and edited the manuscript extensively. All of the authors were involved in revision of the manuscript and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgement

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(1):5-29.
2. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, Rosenberg PS, Bray F, Gillison ML. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol.* 2013; 31(36):4550-4559.
3. Looser KG, Shah JP, Strong EW. The significance of "positive" margins in surgically resected epidermoid carcinomas. *Head Neck Surg.* 1978; 1(2):107-111.
4. Spiro RH, Guillaumondegui O, Jr., Paulino AF, Huvos AG. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head Neck.* 1999; 21(5):408-413.
5. Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem.* 2013; 59(1):110-118.
6. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26(19):3213-3221.
7. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(7):1420-1430.
8. Danila DC, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E, Lilja H, Schwartz L, Larson S, Fleisher M et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(23):7053-7058.
9. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17(6):1471-1474.
10. Janssen Diagnostics L: CELLSEARCH® Circulating Tumor Cell Kit (Epithelial) Instructions for Use.
11. Nichols AC, Lowes LE, Szeto CC, Basmaji J, Dhaliwal S, Chapeskie C, Todorovic B, Read N, Venkatesan V, Hammond A et al. Detection of circulating tumor cells in advanced head and neck cancer using the CellSearch system. *Head Neck.* 2012; 34(10):1440-1444.
12. Bozec A, Ilie M, Dassonville O, Long E, Poissonnet G, Santini J, Chamorey E, Ettaiche M, Chauviere D, Peyrade F et al. Significance of circulating tumor cell detection using the

- CellSearch system in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013; 270(10):2745-2749.
13. Grobe A, Blessmann M, Hanken H, Friedrich RE, Schon G, Wikner J, Effenberger KE, Kluwe L, Heiland M, Pantel K et al. Prognostic relevance of circulating tumor cells in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(2):425-433.
 14. Grisanti S, Almici C, Consoli F, Buglione M, Verardi R, Bolzoni-Villaret A, Bianchetti A, Ciccarese C, Mangoni M, Ferrari L et al. Circulating tumor cells in patients with recurrent or metastatic head and neck carcinoma: prognostic and predictive significance. *PLoS One*. 2014; 9(8):e103918.
 15. Buglione M, Grisanti S, Almici C, Mangoni M, Polli C, Consoli F, Verardi R, Costa L, Paiar F, Pasinetti N et al. Circulating tumour cells in locally advanced head and neck cancer: preliminary report about their possible role in predicting response to non-surgical treatment and survival. *Eur J Cancer*. 2012; 48(16):3019-3026.
 16. Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T, Yang K, Peng G, Liu J, Pantel K: Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2012; 18(20):5701-5710.
 17. Moreno JG, O'Hara SM, Gross S, Doyle G, Fritsche H, Gomella LG, Terstappen LW. Changes in circulating carcinoma cells in patients with metastatic prostate cancer correlate with disease status. *Urology*. 2001; 58(3):386-392.
 18. Negin BP, Cohen SJ. Circulating tumor cells in colorectal cancer: past, present, and future challenges. *Curr Treat Options Oncol*. 2010; 11(1-2):1-13.
 19. Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, Saikawa Y, Suda K, Ando T, Kumagai K, Irino T, Yoshikawa T, Matsuda S et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol*. 2008; 15(11):3092-3100.
 20. Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, Drenning SD, Tweardy DJ. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90(11):824-832.
 21. van Dalum G, van der Stam GJ, Tibbe AG, Franken B, Mastboom WJ, Vermes I, de Groot MR, Terstappen LW. Circulating tumor cells before and during follow-up after breast cancer surgery. *Int J Oncol*. 2015; 46(1):407-413.
 22. Jatana KR, Balasubramanian P, Lang JC, Yang L, Jatana CA, White E, Agrawal A, Ozer E, Schuller DE, Teknos TN et al. Significance of circulating tumor cells in patients with squamous

cell carcinoma of the head and neck: initial results. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2010; 136(12):1274-1279.

23. Tinhofer I, Konschak R, Stromberger C, Raguse JD, Dreyer JH, Johrens K, Keilholz U, Budach V: Detection of circulating tumor cells for prediction of recurrence after adjuvant chemoradiation in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. Ann Oncol.2014; 25(10):2042-2047.

24. Galizia G, Gemei M, Orditura M, Romano C, Zamboli A, Castellano P, Mabilia A, Auricchio A, De Vita F, Del Vecchio L et al. Postoperative detection of circulating tumor cells predicts tumor recurrence in colorectal cancer patients. J Gastrointest Surg. 2013; 17(10):1809-1818.

Références bibliographiques

Alex J. C., A(2004) The application of sentinel node radiolocalization to solid tumors of the head and neck: a 10-year experience. *Laryngoscope*, 114: 2-19

Andrea F. P. (2012). Résistance de rayonnement intrinsèque des cellules souches mésenchymateuses cancéreuses et conséquences pour la réponse au traitement dans un modèle murin de sarcome. *Dan. Med. J.* 59 B4388

Arnaud R. (2009). EMT: quand les cellules épithéliales décident de devenir des cellules mésenchymateuses. *J. Clin. Investir.* 119 1417-1419

Bao S., Wu Q., Sathornsumetee S., Hao Y., Li z, Hjelmeland A. B., et coll. (2006). Cellules de gliome de cellules souches comme promouvoir l'angiogenèse tumorale par facteur de croissance endothélial vasculaire. *Cancer res.* 66 7843-7848

Bardelle, C., Cross, D., Davenport, S., Kettle, J. G., Ko, E. J., Leach, A. G., Mortlock, A., Read, J., Roberts, N. J., Robins, P., Williams, E. J. (2008). Inhibitors of the tyrosine kinase EphB4. Part 1: structure-based design and optimization of a series of 2,4-bis-anilinopyrimidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 2776-2780

Bardelle, C., Coleman, T., Cross, D., Davenport, S., Kettle, J. G., Ko, E. J., Leach, A. G., Mortlock, A., Read, J., Roberts, N. J., Robins, P., Williams, E. J. (2008). Inhibitors of the tyrosine kinase EphB4. Part 2: structure-based discovery and optimisation of 3,5-bis substituted anilinopyrimidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 5717-5721

Becker, M. T., C. G. Shores, et al. (2004). "Molecular assay to detect metastatic head and neck squamous cell carcinoma." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130(1): 21-7

Benateau, H., E. Babin, et al. (2005). "[Detection of the sentinal node in squamous-cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. Preliminary study]." *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 106(5): 281-6

Bidard F., Saliba A.E., Saias L., Degeorges A., De Cremoux P., Viovy J.L., Vincent-Salomon A., Mathiot C., Pierga J.Y. and De Gramont A. (2009) Cellules tumorales circulantes et

cancer du sein : méthodes de détection et résultats cliniques. *Bulletin du Cancer*, , 96: 73-86.

Brabletz T. (2012). Pour différencier ou non – des routes pour métastase. *Cancer de la NAT. Rev.* 12 425 – 436

Burk U., Schubert, J., Wellner U., O. Schmalhofer, Vincan E., Spaderna S., et coll. (2008). Une répression réciproque entre les ZEB1 et les membres de la famille de miR-200 favorise l'EMT et invasion des cellules cancéreuses. *EMBO Rep.* 9 582-589

Cairns, J. (2002). Les cellules souches somatiques et la cinétique de la mutagenèse et cancérogenèse. *États-Unis d'Amérique de Proc Natl. Acad. Sci.* 99 10567-10570

Cameron M. D., de Schmidt, E. E., de N. Kerkvliet, de V. K. Nadkarni, de Morris V. L., marié A. C., et coll. (2000). Progression temporelle des métastases dans le poumon : cellule de survie, dormance et emplacement dépendance d'inefficacité métastatique. *Cancer res.* 60 2541, 2546

Chaffer Thompson E. w., Williams, Slavin J. L., C. L., T. Blick, Brennan J. P. E. D. (2006). Mesenchymal-à-épithéliales transition facilite les métastases du cancer de la vessie : rôle du facteur de croissance des fibroblastes receptor-2. *Cancer res.* 66 11271-11278

Chaffer C. L., Dopheide B., McCulloch D. R., a. B. Lee, Moseley, J. M., Thompson, W. E., et coll. (2005). Axe surexprimés MT1-MMP/TIMP-2 dans le modèle de TSU-Pr1-B1/B2 de progression métastatique carcinome à cellules transitionnelles de la vessie. *Clin. Exp. métastases* 22 115-125

Chaffer C. L., Thompson, E. w., Williams E. D. (2007). Mesenchymal épithéliales transition en développement et de la maladie. *Cellules tissus organes* 185 7 – 19

Chambers A. F., I. MacDonald C., Schmidt, E. E., Morris V. L., marié A. C. (2000). Des objectifs cliniques pour le traitement des métastase. *Adv. Cancer Res.* De 79 91-121

Chambers A. F., Naumov G. N., Venet H. J. Nadkarni, V. K., I. MacDonald C., marié A. C. (2001). Critique les étapes à la métastase hématogène : un aperçu. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 10 243 – 255

Chang, Q., Jorgensen, C., Pawson, T., Hedley, D. W. (2008). Effects of dasatinib on EphA2 receptor tyrosine kinase activity and downstream signalling in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 99, 1074–1082

Changxin S., Lihua H., Lin X. and Yirong L. The detection of circulating tumor of breast cancer patients by using multimarkers (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR. *Clinical Biochemistry*, 2009, 42: 194-200

Chao Y. L., Shepard R., (2010). Cellules de carcinome du sein ré-expriment E-cadhérine au cours de la transition rétablissement mésenchymateuse à épithéliale. *Cancer de mol* 9 179

Chen I. E. , J. Hewel, Krueger J. S., Tiraby C., Weber M. R., Kralli A., et al (2007). Adaptation du métabolisme énergétique chez les métastases de cancer du sein cancer cerveau. *Cancer res.* 67 1472 † 1486

Conticello C., Pedini F., A. Zeuner, M. Patti, M. Zerilli, Stassi G., et coll. (2004). IL-4 protège les cellules tumorales des anti-CD95 et agents chimiothérapeutiques via une régulation des protéines antiapoptotiques. *J. Immunol.* 172 5467-5477

Cojocariu, O. M., F. Huguet, et al. (2009). "[Prognosis and predictive factors in head-and-neck cancers]." *Bull Cancer* 96(4): 369-78

Croker A. K., Allan A. L. (2012). L'inhibition de l'activité de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) réduit la résistance des cellules souches ressemblant ALDHhiCD44 + maternel du cancer chimiothérapie et la radiothérapie. *Du sein Cancer Res. Treat.* 133 75-87

Damonte P., Gregg J. P., Borowsky A. D., A. de B. Kranz, Cardiff R. D. (2007) Tumorigenèse EMT dans la glande mammaire de la souris. *Lab. investir.* 87 1218-1226

- Dean M., (2009). Transporteurs ABC, la résistance aux médicaments et les cellules souches cancéreuses. *J. Biol. de la glande mammaire néoplasie* 14 3-9
- Deb EB B. G., W. Xu, Woodward W. A. (2009). Résistance aux radiations de cellules de tige de cancer du sein : comprendre le cadre clinique. *J. Biol. de la glande mammaire néoplasie* 14 11 – 17
- Diehn M., Cho R. w., Lobo N. A., T. de Kalisky, Dorie M. J., Kulp A. N., et coll. (2009). Association des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène et radiorésistance dans les cellules souches cancéreuses. *Nature* 458 780 – 783
- Ding X. W., Wu J. H., Jiang C. P. (2010). ABCG2 : un marqueur potentiel de cellules souches et la nouvelle cible dans le traitement du cancer et de cellules souches. *SCI de la vie*. 86 631-637
- Donnenberg V. S., M. E. Meyer, Donnenberg A. D. (2009). Mesurage de l'activité de le transporteur résistance de plusieurs drogues dans des cellules souches/progénitrices cancer putatifs. *Méthodes Mol Biol*. 568 261 – 279
- Dyavanagoudar S., Kale A., Bhat K. And Hallikerimath S. (2008) Reverse transcriptase polymerase chain reaction study to evaluate dissemination of cancer cells into circulation after incision biopsy in oral squamous cell carcinoma. *Indian Journal of Dental Research*, , 19: 315-319.
- Étage S., van Staveren W. C., D. Larsimont, Dumont j. E., C. Maenhaut (2011). Cellules souches de cellules cancéreuses dans la transition épithéliale-mésenchymateuse et tumeur-multiplication-cancer : populations distinctes, qui se chevauchent ou mêmes. *Oncogène* 30 4609-4621
- Ferris, R. L., L. Xi, et al. (2005). "Molecular staging of cervical lymph nodes in squamous cell carcinoma of the head and neck." *Cancer Res* 65(6): 2147-56
- Fodde R, Brabletz T. (2007). Wnt/bêta-caténine signalisation dans stemness du cancer et le comportement malin. *Curr. Opin. Cell Biol*. 19 150 – 158

Gao D., Nolan D. J., S. A. de Mellick, Bambino K., K. McDonnell, Mittal, V. (2008). Cellules endothéliales progénitrices contrôlent l'interrupteur angiogénique dans les métastases pulmonaires souris. *Science* 319 195-198

Garcia A., j. Kandel (2012). Notch : un régulateur clé de l'angiogenèse tumorale et les métastases. *Histol. Histopathol.* 27 151 – 156

Garrel, R., M. Dromard, et al. (2006). "The diagnostic accuracy of reverse transcription-PCR quantification of cytokeratin mRNA in the detection of sentinel lymph node invasion in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a comparison with immunohistochemistry." *Clin Cancer Res* 12(8): 2498-505

Gendreau, S. B., Ventura, R., Keast, P., Laird, A. D., Yakes, F. M., Zhang, W., Bentzien, F., Cancilla, B., Lutman, J., Chu, F., Jackman, L., Shi, Y., Yu, P., Wang, J., Aftab, D. T., Jaeger, C. T., Meyer, S. M., De Costa, A., Engell, K., Chen, J., Martini, J. F., Joly, A. H. (2007). Inhibition of the T790M gatekeeper mutant of the epidermal growth factor receptor by EXEL-7647. *Clin. Cancer Res.* 13, 3713-3723

Ghossein, R. A. and S. Bhattacharya (2000). "Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours." *Eur J Cancer* 36(13 Spec No): 1681-94

Ghossein, R. A., L. Carusone, et al. (2000). "Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in melanoma prostatic and breast carcinomas." *In Vivo* 14(1): 237-50

Goda, H., K. I. Nakashiro, et al. (2012). "One-step nucleic acid amplification for detecting lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma." *Oral Oncol.* 211-214

Gomes L. R., Terra L. F., Sogayar M. C., Labriola L. (2011). Transition épithéliales – mésenchymateuse : implications dans la progression du cancer et des métastases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12 1881-1890

- Gregory P. A., les G. A. Bert, les Paterson E. L., les Barry S. C., les Tsykin A., Farshid G., et coll. (2008). La famille miR-200 et le miR-205 réglementent transition épithéliale à mésenchymateuses en ciblant ZEB1 et SIP1. *NAT. Cell Biol.* 10 593 – 601
- Greenberg, J. S., R. Fowler, et al. (2003). "Extent of extracapsular spread: a critical prognosticator in oral tongue cancer." *Cancer* 97(6): 1464-70
- Guérin S., Doyon F. And Hill C. La fréquence des cancers en France en 2006 et les évolutions de la mortalité depuis 1950 et de l'incidence depuis 1980. *Bulletin du Cancer*, 2009,96: 51-57
- Gupta P. B., Onder T. T., G. Jiang, Tao K., C. Kuperwasser, Weinberg A. r., et coll. (2009). Identification des inhibiteurs sélectifs de cellules souches cancéreuses de criblage à haut débit. *Cellule* 138 645 – 659
- Hamakawa, H., M. Fukuzumi, et al. (2000). "Keratin mRNA for detecting micrometastasis in cervical lymph nodes of oral cancer." *Cancer Lett* 160(1): 115-23
- Hamakawa, H., A. Onishi, et al. (2004). "Intraoperative real-time genetic diagnosis for sentinel node navigation surgery." *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(7): 670-5
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70
- Hashimoto T., Kajiyama Y., Tsutsumi-Ishii Y., Nagaoka I., Tsurumaru M. Circulating micrometastases of esophageal cancer detected by carcinoembryonic antigen mRNA reverse transcriptase-polymerase chain reaction: clinical implications. *Dis. Esophagus*, 2008,21: p.690-696
- Jemal A., R. Siegel, E. Ward, T. Murray, Xu, J., Smigal C., et coll. (2006). Statistiques sur le Cancer 2006. *CA Cancer J. Clin.* 56 106 – 130
- Jordan, V. N., g. L. Johnson, Abell A. N. (2011). Suivi les stades intermédiaires de transition épithéliale-mésenchymateuse dans les cellules souches épithéliales et cancer. *Cycle cellulaire* 10 2865-2873

Kalyankrishna, S. and J. R. Grandis (2006). "Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer." *J Clin Oncol* 24(17): 2666-72

Kang Y., Massague J. (2004). Épithéliales – mésenchymateuses transitions : tournez dans le développement et la métastase. *Cellule* 118 277-279

Kano, M., Y. Shimada, et al. (2000). "Detection of lymph node metastasis of oesophageal cancer by RT-nested PCR for SCC antigen gene mRNA." *Br J Cancer* 82(2): 429-35

Karaman, M. W., Herrgard, S., Treiber, D. K., Gallant, P., Atteridge, C. E., Campbell, B. T., Chan, K. W., Ciceri, P., Davis, M. I., Edeen, P. T., Faraoni, R., Floyd, M., Hunt, J. P., Lockhart, D. J., Milanov, Z. V., Morrison, M. J., Pallares, G., Patel, H. K., Pritchard, S., Wodicka, L. M., Zarrinkar, P. P. (2008). A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnol.* 26, 127-132

Kelly P. N., A. de Dakic, Adams Nutt, S. L., J. M. Strasser A. (2007). La croissance tumorale n'a pas besoin d'être poussée par rare de cancer des cellules souches. *Science* 317 33

Kim N. H., de Kim H. S., de Li X. Y., de Lee I., de Choi H. S., de Kang S. E., et coll. (2011). Un axe de p53/miRNA-34 régit la transition épithéliale-mésenchymateuse de Snail1 dépendant du cancer cell. *J. Cell Biol.* 195 417-433

Kingler S , M. F., Rauch P , Kenouchi, Chretien AS, Genin P, Leroux A, Merlin JL (2012). *J Clin Oncol* 30 suppl

Khair G., John R., Monson J., Greenman J. Epithelial molecular markers in peripheral blood of patients with colorectal cancer. *Diseases of the colon and rectum*, 2007, 50: 1188-1203

- Kobayashi C. I., T. de Suda (2012). Réglementation des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules souches et de cellules souches cancéreuses. *J. Cell. Physiol.* 227 421 – 430
- Koepke T. (2006). Cellules souches cancéreuses lié à la résistance aux radiations. *Cancer Biol Ther.* 5 1428
- Korpai M, Lee E. S., G. Hu, Kang Y. (2008). La famille miR-200 inhibe la migration cellulaire épithéliale-mésenchymateuse transition et le cancer en ciblant directement de E-cadhérine répresseurs transcriptionnels ZEB1 et ZEB2. *J. Biol. Chem.* 283 14910 – 14914
- Kowalski P. J., Rubin M.a., Kleer C. G. (2003). E-cadherin expression primaire carcinomes du sein et de ses métastases à distance. *Breast Cancer Res.* 5 R217-222
- Krantz S. B., boucliers M.a., Dany-Stéphanie S., Munshi H. G., Bentrem D. J. (2012). Contribution de cellules souches épithéliales-à-mésenchymateuses transition et le cancer à la progression du cancer pancréatique. *J. Surg. res.* 173 105-10
- Li F, B. Tiede, J. Massague, Kang Y. (2007). Au-delà de tumorigenèse : cellules souches cancéreuses à la métastase. *Res de cellule.* 17 3-14
- Li Juge G. Hurteau, Carlson J. A., Spivack S. D., Brock G. J. (2007). La surexpression de la micro-ARN a-miR - 200c conduit à une expression réduite de facteur de transcription 8 et augmentation de l'expression de la E-cadhérine. *Cancer res.* 67 7972-7976
- Liu H, Patel M. R., Prescher J. A., A. Patsialou, Qian D., Lin j de type. facultatif, et coll. (2010). Cellules souches cancéreuses des tumeurs du sein humaines sont impliqués dans les métastases spontanées dans des modèles murins orthotopique. *États-Unis d'Amérique de Proc Natl. Acad. Sci.* 107 18115 – 18120
- Liu L., Liao G-Q., He P., Zhu H., Liu P-H., Qu Y-M., Song X-M., Xu Q-W., Gao Q., Chen W-F., Yin Y-H. Detection of circulating cancer cells in lung cancer patients with a panel of markers genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008 372: 756-760.

Liu s, Ginestier C., UO S. Clouthier S. G., le juge Patel S. H., Monville F., et coll. (2011). Les cellules souches cancéreuses du sein sont réglementés par des cellules souches mésenchymateuses à travers des réseaux de cytokine. *Cancer res.* 71 614 – 624

Liu Z., Jiang M., Yan F., Xu L., Zhao J. And Ju H., Multipoint quantification of multimarker genes in peripheral blood and micrometastasis characteristic in peri-operative esophageal cancer patients. *Cancer Letters*, 2008,261: 46-54

Lou H., M. Dean (2007). Traitement ciblé contre les cellules souches du cancer : le cheminement patché et les transporteurs ABC. *Oncogène* 26 1357-1360

Louie E., Nik S., Chen J. S., M. Schmidt, chanson b., Paquin c., et coll. (2010). Identification d'une population de cellules souches en exposant des lignées de cellules cancéreuses du sein métastatique à cycles répétitifs de l'hypoxie et la réoxygénation. *Breast Cancer Res.* 12 R94

Mack, M. G., J. Rieger, et al. (2008). "Cervical lymph nodes." *Eur J Radiol* 66(3): 493-500

Mamelle, G., S. Temam, et al. (2006). "[Role and perspectives of sentinel node biopsy in head and neck tumors]." *Cancer Radiother* 10(6-7): 349-53

Mathieu S. A., Guo, w., Liao M. J., Eaton E. N., Ayyanan A., Zhou a. Y., et coll. (2008). La transition épithéliale-mésenchymateuse génère des cellules avec des propriétés de cellules souches. *Cellule* 133 704 – 715

Marotta L. L., Polyak K. (2009). Cellules souches cancéreuses : un modèle en gestation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19 44 – 50

Masood, R., S. R. Kumar, et al. (2006). "EphB4 provides survival advantage to squamous cell carcinoma of the head and neck." *Int J Cancer* 119(6): 1236-48

McBride W pajonk F., Vlashi E., H. (2010). Résistance de rayonnement des cellules souches cancéreuses : les 4 R de radiobiologie revisité. *Cellules souches* 28 639 – 648

Meltzer A. (1990). La dormance et le cancer. *J. Surg. Oncol.* 43 181-188

- Micalizzi S. d., Farabaugh S. M., Ford H. L. (2010). Transition épithéliales – mésenchymateuses dans le cancer : parallèles entre le développement normal et la progression tumorale. *J. Biol. de la glande mammaire néoplasie* 15 117 – 134
- Miyazaki, Y., Nakano, M., Sato, H., Truesdale, A. T., Stuart, J. D., Narthey, E. N., Hightower, K. E., Kane-Carson, L. (2007) Design and effective synthesis of novel templates, 3,7-diphenyl-4-amino-thieno and furo-[3,2-c]pyridines as protein kinase inhibitors and in vitro evaluation targeting angiogenetic kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 250-254
- Moitra K., Lou H., M. Dean (2011). Pompes d'efflux multirésistante et le cancer des cellules souches : aperçus de résistance multirésistante et développement thérapeutique. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89 491-502
- Molloy T.J., Bosma A.J., Veer L.(2008) Towards an optimized platform for detection, enrichment, and semi-quantitation circulating tumor cells. *Breast Cancer Research Treatment*, 112: 297-307
- Murakami, R., H. Uozumi, et al. (2007). "Impact of FDG-PET/CT imaging on nodal staging for head-and-neck squamous cell carcinoma." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68(2): 377-82
- Nauseef J. T., Henry M. D. (2011). Transition épithéliales-à-mésenchymateuses dans le cancer de la prostate : paradigme ou puzzle? *Urol. nat. Rev.* 8 428 – 439
- Newman B., Liu Y., Lee H. F., Sun, D., Wang Y. (2012). Inhibiteur de HSP90 17-AAG élimine sélectivement les cellules souches lymphome. *Cancer res.* 72 4551-4561
- O ' Brien C. A., A. de Kreso, Dick J. E. (2009). Cellules souches cancéreuses des tumeurs solides : un aperçu. *Semin. Radiat. Oncol.* 19 71 – 77
- Ogawa, T., Y. Tsurusako, et al. (1999). "Comparison of tumor markers in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." *Acta Otolaryngol Suppl* 540: 72-6
- Oka H., Shiozaki H., K. Kobayashi, M. Inoue, Tahara, H., Kobayashi T., et coll. (1993). Expression de molécules d'adhérence cellulaire de E-cadhérine dans les tissus du cancer du sein humain et sa relation avec métastase. *Cancer res.* 53 1696-1701

- Oltean S., Sorg B. S., T. Albrecht, Bonano V. i, Brazas R. M., M. Dewhirst w., et coll. (2006). Alternative inclusion des fibroblastes facteur de croissance récepteurs 2 exon IIIc Dunning tumeurs prostatiques révèle inattendue épithéliale plasticité mésenchymateuse. *États-Unis d'Amérique de Proc Natl. Acad. Sci.* 103 14116 –
- Paleri, V., G. Rees, et al. (2005). "Sentinel node biopsy in squamous cell cancer of the oral cavity and oral pharynx: a diagnostic meta-analysis." *Head Neck* 27(9): 739-47.
- Pardal R, Clarke, M. F., Morrison, S. J. (2003). Application des principes de la biologie des cellules souches pour le cancer. *Cancer de la NAT. Rev.* 3 895 – 902
- Parc Gerard A. B., E. Lengyel, S. M., Peter M. E. (2008). La famille miR-200 détermine le phénotype épithélial des cellules cancéreuses en ciblant les répresseurs de E-cadhérine, ZEB1 et ZEB2. *Gènes dev.* 22 894 – 907
- Parc Y., Gerson S. L. (2005). Réparation de l'ADN tout défaut de fonctionnement des cellules souches et le vieillissement. *Annu. Rev Med* 56 495 – 508
- Patel S. A., Meyer J. R., Greco S. J., Corcoran K. E., Bryan M. Rameshwar P. (2010). Cellules souches mésenchymateuses protéger les cellules cancéreuses du sein par l'intermédiaire des cellules T régulatrices : rôle des dérivés de cellules souches mésenchymateuse TGF- β . *J. Immunol.* 184 5885-5894
- Paterlini-Brechot P., Benali L.N.(2007) Circulating Tumor Cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions.*Cancer Letters*, 253: 180-204
- Potten C.Owen G., stand D. (2002). Cellules souches intestinales protéger leur génome par ségrégation sélective des brins d'ADN modèle. *J. Cell Sci.* 115 2381-2388
- Raza A., Franklin M. J., Dudek A. Z. (2010). Maturation péricytes et navire pendant l'angiogenèse tumorale et les métastases. *Mod. J. Hematol.* 85 593 à 598
- Reya T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., Weissman I. L. (2001). Des cellules souches, le cancer et les cellules souches cancéreuses. *Nature* 414 105-111

- Rich J. N. (2007). Cellules souches cancéreuses dans la résistance aux radiations. *Cancer res.* 67 8980-8984
- Ross, G. L., D. S. Soutar, et al. (2004). "Improved staging of cervical metastases in clinically node-negative patients with head and neck squamous cell carcinoma." *Ann Surg Oncol* 11(2): 213-8
- Ross, G. L., D. S. Soutar, et al. (2004). "Sentinel node biopsy in head and neck cancer: preliminary results of a multicenter trial." *Ann Surg Oncol* 11(7): 690-6
- Saharinen , P. L. Eklund, K. Pulkki, P. Bono, Alitalo K. (2011). VEGF et angiopoietin signalisation dans l'angiogenèse tumorale et les métastases. *Les tendances mol med.* 17 347 – 362
- Schem, C., N. Maass, et al. (2009). "One-step nucleic acid amplification-a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group." *Virchows Arch* 454(2): 203-10
- Schleiermacher, G. and O. Delattre (2001). "[Detection of micrometastases and circulating tumour cells using molecular biology technics in solid tumours]." *Bull Cancer* 88(6): 561-70.
- Schneider M. (2006) Detection et implications cliniques des cellules tumorales circulantes dans le cancer du sein. *Oncologie*, 8: 295-296
- Serge D., le prix J. E., G. M. de Kettlewell, Souter R. G., Vass A. C., Crossley B. (1984). Mécanismes de métastases tumorales humaines étudiées chez les patients avec shunts peritoneovenous. *Cancer res.* 44 3584 – 3592
- Seton-Rogers S. (2011). Cancer des cellules souches. VEGF favorise stemness. *Cancer de la NAT. Rev.* 11 831
- Shi H, Y. Zhang, J. Zheng, Pan J. (2012). Les espèces réactives de l'oxygène dans le cancer des cellules souches. *Antioxid. Signal de redox.* 16 1215 – 1228

- Shores, C. G., X. Yin, et al. (2004). "Clinical evaluation of a new molecular method for detection of micrometastases in head and neck squamous cell carcinoma." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130(8): 937-42
- Six V., Gayraud-Morel B., D. de Gomes, Tajbakhsh S. (2006). Division asymétrique et coségrégation de modèle ADN chapelets en cellules satellites musculaires adultes. *NAT. Cell Biol.* 8 677-687
- Siemens, H., R. Jackstadt, S. Hunten, Kaller M., Menssen A., Gotz U., et coll. (2011). miR-34 et escargot forment une boucle de rétroaction négative-double pour régler les transitions épithéliale-mésenchymateuse. *Cycle cellulaire* 10 4256-4271
- Sinha, U. K., A. Kundra, et al. (2003). "Expression of EphB4 in head and neck squamous cell carcinoma." *Ear Nose Throat J* 82(11): 866, 869-70, 887
- Sinha, U. K., K. Mazhar, et al. (2006). "The association between elevated EphB4 expression, smoking status, and advanced-stage disease in patients with head and neck squamous cell carcinoma." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132(10): 1053-9
- Solassol, J., V. Burcia, et al. (2010). "Pemphigus vulgaris antigen mRNA quantification for the staging of sentinel lymph nodes in head and neck cancer." *Br J Cancer* 102(1): 181-7
- Steeg P. S. (2006). Métastases tumorales : perspectives mécanistes et défis cliniques. *NAT. med.* 12 895-904
- Stoeckli, S. J., L. W. Alkureishi, et al. (2009). "Sentinel node biopsy for early oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma." *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266(6): 787-93
- Stoeckli, S. J., M. Pfaltz, et al. (2002). "Histopathological features of occult metastasis detected by sentinel lymph node biopsy in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma." *Laryngoscope* 112(1): 111-5
- Stoeckli, S. J., M. Pfaltz, et al. (2005). "The second international conference on sentinel node biopsy in mucosal head and neck cancer." *Ann Surg Oncol* 12(11): 919-24

Suzuki M., Mose E. S., V. Montel, Serge D. (2006). Cancéreux dormante provient des organes métastases-gratuit retrouver puissance tumorigène et métastatique. *Mod. J. Pathol.* 169 673 – 681

Takahashi Y., Mai, M. (2005). Anticorps dirigé contre le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) inhibe switch angiogénique et métastases hépatiques dans modèle de xénogreffe orthotopique avec expression liés au site du VEGF. *J. exp. Clin. Cancer Res.* 24 237-243

Tankere, F., A. Camproux, et al. (2000). "Prognostic value of lymph node involvement in oral cancers: a study of 137 cases." *Laryngoscope* 110(12): 2061-5

Todaro M., le P. M. Alea, le Di Stefano A. B., les P. Cammareri, les L. Vermeulen, les Iovino F., et al (2007). Des cellules souches du cancer du côlon dicter la croissance tumorale et résister à la mort cellulaire par la production d'interleukine-4. *Cell Stem Cell* 1 389-402

Toyoshima, T., F. Koch, et al. (2009). "Expression of cytokeratin 17 mRNA in oral squamous cell carcinoma cells obtained by brush biopsy: preliminary results." *J Oral Pathol Med* 38(6): 530-4

Toyoshima, T., E. Vairaktaris, et al. (2008). "Cytokeratin 17 mRNA expression has potential for diagnostic marker of oral squamous cell carcinoma." *J Cancer Res Clin Oncol* 134(4): 515-21

Tong X., Yang L., Campbell Lang J., Zborowski M. And Chalmers J.(2007) Application of immunomagnetic cell enrichment in combination with RT-PCR for the detection of rare circulating head and neck tumor cell in human peripheral blood. *Clinical Cytometry*, 72B:310-3

Tsuji T., S. de Ibaragi, Hu G. F. (2009). Épithéliales – mésenchymateuses coopérativité transition et cellule en métastases. *Cancer res.* 69 7135-7139

Tsuji, S. Ibaragi, K. Shima, Hu M. G., Katsurano M., Sasaki A., et coll. (2008). Transition épithéliales – mésenchymateuses induite par la croissance suppresseur p12CDK2-AP1

favorise l'invasion locale des cellules tumorales, mais supprime la croissance de la colonie lointaine. *Cancer res.* 68 10377-10386

Uhr J. W., E. de Vitetta Scheuermann R. H., rue N. E. S. (1997). La dormance Cancer : possibilités de nouvelles approches thérapeutiques. *NAT. med.* 3 505-509

Vincan E., Brabletz T., Faux M. C., Robert r. G. (2007 a). Un modèle de ligne de cellules en trois dimensions humaines permet l'étude de transition épithéliale-mésenchymateuse et mésenchymateuses – épithéliales dynamique et réversible qui sous-tend la cancérogenèse colorectale. *Cellules tissus organes* 185 20 – 28

Vincan E., Darcy P. K., les Farrelly C. A., les Faux M. C., les Brabletz T., les Ramsay r. G. (2007 b). Frizzled-7 dicte organisation tridimensionnelle de carcinoïdes de cellule de cancer colorectal. *Oncogène* 26 2340-2352

Visvader J. E., lefevre G. J. (2008). Cellules souches cancéreuses des tumeurs solides : accumulant les preuves et les questions non résolues. *Cancer de la NAT. Rev.* 8 755 – 768

Vippman M. Wang S., Yang D., E. (2003). Ciblant Bcl-2 et Bcl-XL avec ces petites molécules antagonistes. *Semin. Oncol.* 30 133-142

Visser, M., M. Jiwa, et al. (2008). "Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer." *Int J Cancer* 122(11): 2562-7

Wang Z., Li Y., Simon F. H. (2010). Des espèces réactives de l'oxygène en transition épithéliale-mésenchymateuse réminiscence des cellules souches du cancer dans la progression tumorale ou les mécanismes de signalisation. *Curr. Cellules souches de référence Ther.* 5 74 – 80

Weigelt, Peterse J. L, van ' t Veer L. J. (2005). Métastases du cancer du sein : modèles et marqueurs. *Cancer de la NAT. Rev.* 5 591 – 602

Weiss L. (1990). Métastatique inefficacité. *Adv. Cancer Res.* 54 159 – 211

- Weiss L. (1992). Commentaires sur les modèles métastatiques hématogène chez l'être humain telle que révélée par l'autopsie. *Clin. Exp. métastases* 10 191 à 199
- Williams N. A., , a déclaré E. D. (2011). Les facteurs de croissance dans l'induction de transition épithéliale-mésenchymateuse et métastase. *Cellules tissus organes* 193 85-97
- Wu J. K. (2011). Activation de Bmi1 par Twist1 direct : implications dans la stemness du cancer, transition épithéliale-mésenchymateuse et signification clinique. *Chang Gung med J.* 34 229-238
- Wu K. J., Yang M. H. (2011). Stemness épithéliales – mésenchymateuses de transition et le cancer : la connexion Twist1-Bmi1. *Biosci. Rép* 31 449-455
- Yang J., Mathieu S. A., Donaher J. L., S. Ramaswamy, R.a. Itzykson, Come C., et coll. (2004). Twist, un organisme de réglementation principal de la morphogénèse, joue un rôle essentiel dans les métastases tumorales. *Cellule* 117 927-939
- Yao D., C. Dai, Peng S. (2011). Mécanisme de la transition mésenchymateuses – épithéliales et sa relation avec la formation de tumeurs métastatiques. *Mol Cancer Res.* 9 1608 – 1620
- Yates C. C., Shepard c. R., D. Stolz B., A. (2007). Co-culture de cellules de carcinome de la prostate humaine avec des hépatocytes conduit à l'augmentation de l'expression de la E-cadhérine. *Br. J. Cancer* 96 1246 – 1252
- Yilmaz M., Christofori G. (2009). Invasion des cellules EMT, le cytosquelette et le cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 28 15 – 33
- Yoo M.h., Hatfield D. L. (2008). La théorie des cellules souches du cancer : est-ce correct? *Mol.Cells* 26 514-516
- Xi L. , Nicastri D. , El-Hefnawy T. , Hugues S. , Luketich J. And Godfrey T. (2007) Optimal markers for real-time quantitative reverse transcription PCR detection of circulating tumor cells from melanoma, breast, colon, esophageal, head and neck, and lung cancers. *Clinical Chemistry*, 53: 1206-1215

Par définition, une métastase est la formation de foyers tumoraux secondaires liée à la capacité des cellules tumorales à se détacher de la tumeur primitive, de s'implanter dans un autre organe et de proliférer. A partir du foyer primitif, il peut y avoir une dissémination micrométastatique c'est-à-dire la libération dans le sang ou le réseau lymphatique de cellules tumorales isolées ou de petits amas cellulaires. Ces micrométastases peuvent proliférer et donner naissance à des métastases. La difficulté est de déceler ces cellules tumorales isolées ou en micro-amas, et également d'évaluer leur valeur pronostique, ainsi que leur potentiel métastatique. Dans cette étude, nous allons nous intéresser plus particulièrement au processus métastatique lié à l'acte chirurgical dans les cancers épidermoïdes des voies aérodigestive supérieures (CEVADS). En effet, dans ce type de cancers, la meilleure méthode pour établir un diagnostic est l'analyse anatomo-pathologique du prélèvement réalisé par biopsie. La principale barrière physique empêchant les cellules tumorales de migrer est la membrane du tissu atteint. Lors de la chirurgie, ces barrières sont détruites, ce qui facilite l'invasion du système vasculaire. Les cellules tumorales peuvent ainsi se loger dans les vaisseaux et proliférer à distance du site primitif pour former des tumeurs secondaires. Généralement, les métastases sont détectées par imagerie ou sérologie à un stade très avancé du cancer.

L'objectif de cette étude est de détecter la présence de cellules isolées ou disséminées (CTCs) de CEDVADS dans la circulation sanguine à travers trois axes de recherche des métastases : 1) Etude des marqueurs moléculaires pour le diagnostic d'envahissement ganglionnaire des carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures réalisée par PCR quantitative en temps réel et en OSNA. 2) Recherche des cellules tumorales disséminées dans les drains de Redon après curage cervical 3) Recherche des cellules tumorales circulantes après acte chirurgical pour carcinomes épidermoïdes des VADS stade III et IV.

Ce protocole nous permettra de valider la recherche des CTCs en situation clinique et par la suite de développer des études prospectives diagnostiques et pronostiques des CTCs des CEVADS

Metastasis is defined as the development of secondary tumor sites related to the ability of tumor cells to detach from primary tumor, to implant in another organ and to proliferate. From the primary site, a micrometastatic dissemination can occur through the release in blood stream or lymph system of isolated tumor cells or of small cell clusters. These micrometastases can proliferate and grow into metastases. The detection of isolated or microclustered tumor cells, the evaluation of the prognosis value, and their metastatic potential encounter difficulties. In this study, we focused mainly on the metastatic process related to surgery in epidermoid cancers of the upper aerodigestive tract (...). Indeed, in this type of cancers, the best method to establish diagnosis is the biopsy assessed by the anatomo-pathological analysis of a sample. The main physical barrier preventing cells from migrating is the membrane of the malignant tissue. During surgery, these barriers are destroyed, facilitating the invasion of the vascular system. Therefore tumor cells can locate in vessels and proliferate at distance from the primitive site, thus forming secondary tumors. Generally, metastases are detected by imaging or serology at a very advanced stage of cancer disease.

The aim of this study was to detect isolated or disseminated cells (CTCs) of CEDVADS in blood stream by three different approaches: 1) the study of molecular markers for the diagnosis of node involvement of epidermoid carcinomas of the upper aerodigestive tract using quantitative PCR in realtime and OSNA. 2) Screening of tumoral cells disseminated in Redon drains after cervical curettage 3) Detection of circulating tumor cells after surgery for epidermoid carcinomas of stage III and IV VADS.

This protocol will allow to validate the detection of CTCs in clinic setting and to develop prospective studies for the diagnosis and prognosis of CTCs of CEVADS