

Université de Montréal

**La performance diagnostique des marqueurs
tumoraux messagers dans le diagnostic et le suivi
du cancer du sein**

Par

Karama El Manaa

Département de biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences

en Biochimie

Option Génétique moléculaire

Décembre 2013

© Karama El Manaa, 2013

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :
**La performance diagnostique des marqueurs tumoraux messagers dans
le diagnostic et le suivi du cancer du sein**

Présenté par :
Karama El Manaa

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Sylvie Mader, président-rapporteur
Dr. Lyne Labrecque, directrice de recherche
Dr. Isabelle Royal, co-directrice
Dr. Tony Antakly, membre du jury

Résumé

Selon plusieurs évidences, la présence de cellules tumorales occultes dans la circulation sanguine aux premières étapes du cancer du sein pourrait être à l'origine des lésions métastatiques. Plusieurs études de recherche ont montré que l'utilisation de la RT-PCR en temps réel pour la détection des cellules tumorales circulantes CTC offre la meilleure sensibilité dans la quantification des marqueurs tumoraux. Présentement de routine, le suivi du cancer du sein est réalisé par le dosage immunologique des marqueurs sériques CA15-3 et CEA. Cependant, la faible sensibilité de ces marqueurs aux stades précoces de la maladie et leur manque de spécificité tissulaire ne permet pas leur utilisation pour le diagnostic et le pronostic du cancer du sein. Le diagnostic de la maladie est plutôt basé sur l'analyse d'une biopsie de la tumeur ou des ganglions lymphatiques, des méthodes invasives, coûteuses et peu adaptées pour un suivi de routine dans l'évaluation du risque de rechute et de la réponse au traitement. Malgré les études, la détection de ces cellules dans les laboratoires hospitaliers est rare.

Nous avons envisagé de mettre en place un nouveau test RT-PCR pour la détection de cellules malignes du cancer du sein dans la circulation. La spécificité et la sensibilité de plusieurs marqueurs potentiels ont été comparées. Le but ultime de ce projet est d'offrir la détection d'un ou d'une combinaison de ces marqueurs de routine aux patientes.

Nos résultats montrent une corrélation positive entre l'expression des ARNm des marqueurs CK19 et de HER2 avec les données cliniques des patientes. De plus, la sensibilité et la spécificité des tests RT-PCR sont comparables à la littérature récente. Finalement, la comparaison de notre test avec le dosage immunologique des marqueurs tumoraux sériques CA15.3 et CEA a montré que la détection de la CK19 et de HER2 par RT-PCR est plus sensible chez les patientes de cancer du sein métastatique.

Mots-clés : RT-PCR, ARNm, marqueurs tumoraux, cancer du sein, suivi de routine.

Abstract

According to several evidences, the presence of occult tumor cells in blood circulation in the early stages of breast cancer could be the origin of metastatic lesions. Recent research studies have shown that the use of qRT-PCR for the detection of circulating tumor cells CTC offers the best sensitivity in the quantification of tumor markers. Currently routine monitoring of breast cancer is performed by immunoassay of serum markers CA15.3 and CEA. However, the low sensitivity of these markers in the early stages of the disease and the lack of tissue specificity does not allow their use in diagnosis and prognosis of breast cancer. The diagnosis of the disease is rather based on the analysis of biopsies of the tumor or lymph nodes. This is an invasive procedure, expensive and not suitable for routine monitoring of the risk of relapse and response to treatment. Despite these studies, detection of these cells in hospital laboratories is rare.

Our objective is to set up a new RT-PCR assay for the detection of malignant breast cancer cells in the circulation. The specificity and sensitivity of some potential markers will be compared. The ultimate goal of this project is to routinely offer the detection of one or of a combination of these markers routinely to patients with breast cancer.

Our results show a positive correlation between the expression of CK19 and HER2 mRNA with clinical data of patients. Furthermore, the sensitivity and specificity of our RT-PCR tests are similar to the recent literature. Finally, the comparison of our test with the immunoassay of serum tumor markers CEA and CA15.3 showed that the detection of HER2 and CK19 by RT-PCR is more sensitive in patients with metastatic breast cancer.

Keywords: RT-PCR, mRNA, tumor markers, breast cancer, routine monitoring

Table des matières

| | |
|---|------------|
| <i>Résumé</i> | <i>i</i> |
| <i>Abstract</i> | <i>ii</i> |
| <i>Table des matières</i> | <i>iii</i> |
| <i>Liste des tableaux</i> | <i>vi</i> |
| <i>Liste des figures</i> | <i>vii</i> |
| <i>Remerciements</i> | <i>ix</i> |
| <i>Introduction</i> | |
| 1 Le cancer du sein | 1 |
| 1.1 Épidémiologie | 1 |
| 1.2 Mécanisme de cancérogénèse mammaire | 3 |
| 1.3 La cascade métastatique | 6 |
| 1.4 Les outils de diagnostic du cancer du sein | 8 |
| •La mammographie | 8 |
| •L'échographie | 9 |
| •La biopsie | 9 |
| •Le dosage sérique des marqueurs tumoraux CA15.3 et CEA | 9 |
| 1.5 Recommandations canadiennes pour le suivi du cancer du sein | 11 |
| •Cancer du sein en stade précoce : | 11 |
| •Cancer du sein métastatique : | 12 |
| 2 Les cellules tumorales circulantes | 13 |
| 2.1 Description | 13 |
| 2.2 Utilité clinique | 16 |
| 2.3 Techniques de détection des CTC dans le cancer du sein | 18 |
| 2.4 Études de comparaison des différentes méthodes de détection des CTC | 24 |

| | | |
|-----|---|----|
| 2.5 | Les marqueurs tumoraux des CTC | 26 |
| 2.6 | Approche moléculaire dans la détection des CTC | 32 |
| 3 | <i>Projet de recherche</i> | 37 |
| 3.1 | Problématique | 37 |
| 3.2 | Hypothèse | 37 |
| 3.3 | Objectifs | 38 |
| | •Mise au point d'un test RT-PCR en temps réel pour le dosage des marqueurs tumoraux | 38 |
| | •Détermination de la sensibilité et la spécificité diagnostiques du test | 38 |
| | •Comparaison du test RT-PCR avec le dosage immunologique actuel des marqueurs CA15.3 et CEA et les caractéristiques cliniques | 38 |
| | <i>Méthodologie</i> | 39 |
| 1. | Consentement d'éthique | 40 |
| 2. | Classification des sujets | 40 |
| 3. | Recrutement des sujets de référence | 40 |
| 4. | Recrutement des patientes avec cancer du sein | 41 |
| 5. | Lignée cellulaire cancéreuse | 42 |
| 6. | Extraction d'ARN | 42 |
| 7. | La transcription inverse | 43 |
| 8. | La PCR en temps réel | 44 |
| 9. | Électrophorèse sur gel | 44 |
| 10. | Les valeurs de référence | 45 |
| 11. | La spécificité diagnostique | 45 |
| 12. | La sensibilité diagnostique | 45 |
| | <i>Résultats</i> | 46 |
| 1. | Mise au point d'un test RT-PCR en temps réel pour le dosage des marqueurs tumoraux | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 2. Caractéristiques des sujets de référence et des patientes recrutés | 54 |
| 3. Détermination de la sensibilité et la spécificité diagnostique | 56 |
| 4. Comparaison des résultats du test RT-PCR avec le dosage immunologique actuel des marqueurs CA15.3 et CEA | 60 |
| 5. Comparaison des résultats du test RT-PCR de l'ARNm avec le statut pathologique de HER2 | 64 |
| <i>Discussion</i> | 65 |
| Conclusion et perspectives | 75 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| <i>Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées pour chacun des marqueurs étudiés</i> | 49 |
| <i>Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour la mammaglobine</i> | 50 |
| <i>Tableau 3 : Conditions expérimentales des marqueurs après optimisation de la PCR</i> | 53 |
| <i>Tableau 4 : Caractéristiques des sujets de référence</i> | 54 |
| <i>Tableau 5 : Caractéristiques cliniques des patientes</i> | 55 |
| <i>Tableau 6 : Pourcentage de présence de la CK19 dans la cohorte</i> | 57 |
| <i>Tableau 7 : La sensibilité et la spécificité de la quantification de la CK19 chez les sujets de l'étude</i> | 58 |
| <i>Tableau 8 : Pourcentage de présence de HER2</i> | 59 |
| <i>Tableau 9 : La sensibilité et la spécificité de la quantification du HER2</i> | 60 |
| <i>Tableau 10 : Taux sériques des marqueurs CA15.3 et CEA chez les patientes du cancer du sein</i> | 61 |
| <i>Tableau 11: Corrélations de l'ARNm de la CK19 avec CA15.3 et CEA sériques pour les patientes du groupe I</i> | 62 |
| <i>Tableau 12: Corrélations de l'ARNm de la CK19 avec CA15.3 et CEA sériques pour les patientes du groupe II</i> | 63 |
| <i>Tableau 13: Corrélations de l'ARNm de HER2 avec CA15.3 et CEA sériques pour les patientes du groupe I</i> | 63 |
| <i>Tableau 14: Corrélations de l'ARNm de HER2 avec CA15.3 et CEA sériques pour les patientes du groupe II</i> | 64 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| <i>Figure 1 : L'anatomie du sein</i> | 4 |
| <i>Figure 2 : La cascade métastatique</i> | 7 |
| <i>Figure 3 : Théorie du «seed and soil»</i> | 14 |
| <i>Figure 4 : Image de Cell Search vidéo, courtoisie de Veridex, LLC aux laboratoires Mayo</i> | 15 |
| <i>Figure 5 : Illustration des technologies des applications courantes aux CTC</i> | 20 |
| <i>Figure 6 : Les techniques de détection des CTC</i> | 21 |
| <i>Figure 7 : Le système de PCR en temps réel Light Cycler de Roche Canada</i> | 34 |
| <i>Figure 8 : Courbe d'amplification par PCR en temps réel</i> | 35 |
| <i>Figure 9 : Courbe de dénaturation et courbe de fusion</i> | 36 |
| <i>Figure 10 : Courbe d'amplification A) et de fusion B) pour un couple d'amorces de la mammaglobine en titrant les concentrations de MgCl₂</i> | 52 |
| <i>Figure 11 : Gel d'agarose 3% des marqueurs après optimisation de la PCR</i> | 53 |
| <i>Figure 12 : Répartition des sujets références, GrI et GrII pour la CK19</i> | 56 |
| <i>Figure 13: Répartition des sujets références, GrI et GrII pour le HER2</i> | 59 |

À ma grande mère

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche Dr Lyne Labrecque d'avoir partagé avec moi ses connaissances et son expertise, de m'avoir accepté au sein de son laboratoire et de m'encadrer tout au long de ce travail.

Mes vifs remerciements à Claudette De Montigny pour ses précieux conseils et pour son assistance dans le laboratoire.

Je désire à remercier tout les membres du département de biochimie. Ma belle Chantalou pour tous les bons moments au labo ensemble. Yves, merci de partager avec moi ta bonne humeur et ton sourire. Dr Julie Amyot, merci pour tous les mots d'encouragement et pour ton aide dans la correction de ce mémoire. Je remercie toutes les technologistes, j'aime tellement vos blagues et vos histoires dans la salle à café. Je remercie également Dr Luce boulanger et Dr Caroline Albert de m'avoir accueillie au sein de leur équipe pour satisfaire ma soif des nouvelles découvertes. À toutes les techniciennes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, à tout les résidents en biochimie clinique et médicale que j'ai eu le plaisir de discuter et de renouveler mon souffle je tiens à vous remercier du fond de mon cœur. À Dr François Lessard, Dr Martin Beaulieu et Dr Marie-Claire Bélanger, un grand merci de m'avoir permis de partager les pauses et les lunchs sympathiques avec vous.

À mes parents qui m'ont toujours soutenue.....

À Haïfa et Nizar que mon amour pour vous ne se décrira jamais en mots....

À toute ma belle famille qui m'a donnée la chance d'être parmi elle pour toujours

À mon fils ADAM qui me donne la joie de vivre chaque jour avec ses sourires

À Sami, toi mon homme, mon âme et mon amour, pour ton soutien, ton amour, ton sourire et ta folie.....je t'aime

Introduction

1 Le cancer du sein

1.1 Épidémiologie

Au Canada, le cancer du sein représente la deuxième cause de mortalité par cancer chez les femmes après celui des poumons. Il demeure le cancer le plus fréquemment diagnostiqué. Au cours de sa vie, une femme sur neuf développera un cancer du sein et 1 femme sur 29 sera emportée par cette maladie. La survie relative au cancer du sein est plus faible chez les femmes qui avaient 19 à 39 ans ou 80 à 99 ans au moment du diagnostic que chez celles des autres groupes d'âge.¹

Le cancer du sein représente 28 % des cas de cancer chez les femmes de plus de 69 ans et se classe au deuxième rang sur le plan de mortalité et 19 % chez les femmes de moins de 50 ans.¹ Malgré le fait que la moitié des cas diagnostiqués surviennent chez les femmes entre 50 et 69 ans, le nombre de décès par cancer du sein est plus élevé dans le groupe de femmes ayant plus de 80 ans. Cette constatation suggère que les programmes de dépistage par mammographie et les traitements pour la prolongation de la vie chez les femmes entre 50 et 69 ans sont avantageux.¹

Il est difficile de définir la cause exacte du cancer du sein mais plusieurs facteurs sont attribués au risque de développement de cette maladie.

La mutation de certains gènes comme le BRCA1 et BRCA2 est responsable de 5 à 10 % des cas de cancer du sein chez la femme. Ces gènes jouent un rôle dans le contrôle du développement des cellules cancéreuses et sont appelés des gènes suppresseurs de tumeurs.²

L'exposition aux œstrogènes, les hormones impliquées dans le développement du cancer du sein, semble augmenter chez les femmes le risque d'atteinte de cette maladie.³

Les facteurs environnementaux, tels la consommation d'alcool, l'obésité, une alimentation riche en gras et en sucre, ainsi qu'un manque d'exercice physique semblent aussi augmenter le risque de développer le cancer en général et celui du sein en particulier.³

L'exposition à des rayonnements ionisants peut également induire le cancer du sein, tel que démontré par des études faites sur la population de Nagasaki ou de Hiroshima suite à la forte irradiation subie, en particulier si l'exposition a eu lieu lors de la puberté.³

L'évolution dans les traitements contre le cancer depuis plusieurs décennies, perceptible à travers le développement des instruments de chirurgie, les technologies de radiothérapie et la variété des produits de chimiothérapie, a été le fruit de la compréhension de la biologie du cancer. Le cancer est causé par les mutations affectant l'expression ou la fonction des gènes. En caractérisant le génotype des tumeurs ou le patron d'expression de leurs gènes, il serait possible d'identifier avec précision le type de chaque cancer et de prescrire un traitement « à la carte ». ⁴ Certaines découvertes dans le traitement ciblé du cancer, comme la commercialisation de l'Imatinib pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique et les tumeurs stromales, ou le Trastuzumab pour le cancer du sein, ont été bénéfiques pour le pronostic de milliers de patients atteints de cancer. ⁵

Il est de plus en plus évident d'après les percées en recherche clinique que l'avenir du traitement du cancer sera la thérapie ciblée. ⁶ Caractériser chaque type de tumeur, déceler les mécanismes biochimiques

associés et identifier les biomarqueurs tumoraux impliqués sont des objectifs de recherche actuelle pour mieux cibler les traitements.

1.2 Mécanisme de cancérogénèse mammaire

Le sein est composé d'un tiers de matières grasses et de tissus conjonctifs et de deux tiers de lobules et canaux. Le lait est produit dans les quelques 15 à 20 lobules et acheminé par les canaux galatophoriques vers les orifices mamelonnaires. La glande mammaire est une glande exocrine qui se développe chez la femme du stade fœtal jusqu'à sa ménopause. Tout au long de sa vie, l'évolution de la glande est déterminée par des cycles de croissance et de différenciation de ses cellules épithéliales. Ceci augmente le risque que ces cellules accumulent des erreurs lors de la réplication des chromosomes.⁷

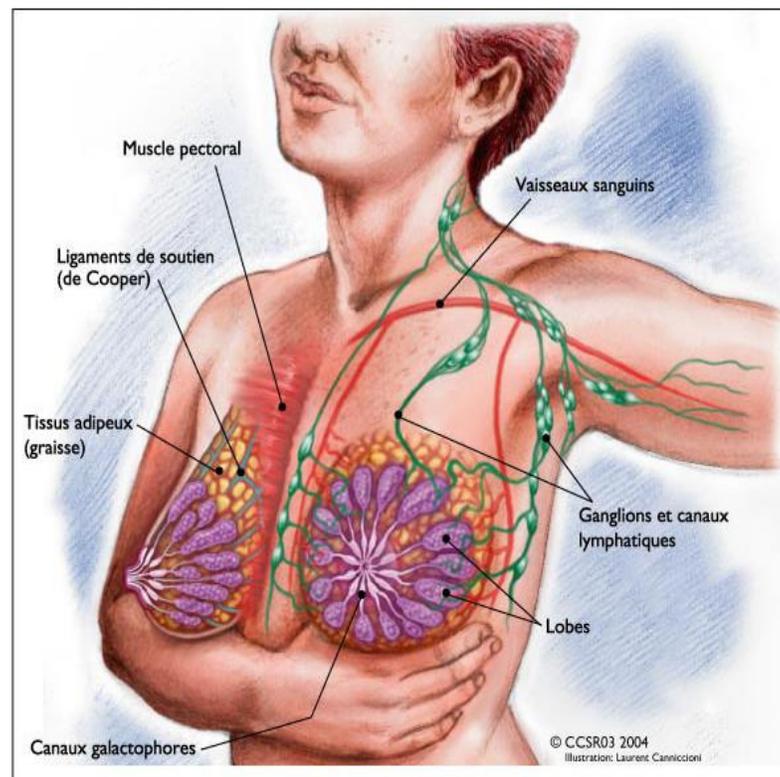


Figure 1 : L'anatomie du sein

Illustration de Laurence Canniccioni CCSR03-2004

Les étapes de la cancérisation sont l'initiation, la promotion et la progression. L'initiation de la cancérisation se définit par l'accumulation de plusieurs mutations géniques dans la cellule, ce qui mène à une surexpression des facteurs pro-oncogènes. À la différence des cellules normales qui sont saines et fonctionnent entre elles de façon synchrone, les cellules cancéreuses en phase de promotion sont indépendantes et ne répondent plus aux signaux de régulation de croissance, échappant ainsi au système d'apoptose. Si le corps est incapable de détruire ces cellules malignes, leur multiplication incontrôlée peut mener à la formation de la tumeur. ⁸ La plupart des cancers du sein sont d'origine épithéliale, appelés adénocarcinomes, et peuvent être de type canaux ou lobulaires.

Il existe deux classes principales de carcinomes, les carcinomes non infiltrants et les carcinomes infiltrants.

Les carcinomes non infiltrant, appelés aussi carcinomes *in situ*, représentent 15 % des cas de cancer du sein. Ces tumeurs n'infiltrant pas les tissus conjonctifs et la membrane basale n'est pas détruite. Il s'agit d'une maladie multicentrique, visible en lésions disséminées dans les différents quadrants du sein mais dont le diagnostic reste difficile. On distingue le carcinome canalaire *in situ* du lobulaire *in situ*. Ce dernier consiste en une prolifération bénigne et présente un excellent pronostic.

Les carcinomes infiltrants représentent 75 % des cas de cancer du sein et la plupart du temps il s'agit d'un carcinome canalaire infiltrant (70%) où la membrane basale a été détruite et les tissus conjonctifs du sein ont été touchés.

La stadification du cancer du sein met en évidence la taille de la tumeur et l'envahissement angiogénique.⁹ Cinq stades sont définis pour le cancer du sein :

Stade 0 : Carcinomes lobulaires ou canauxaires *in situ* où les cellules tumorales sont localisées dans la membrane.

Stade I : La tumeur mesure moins de 2 cm et est localisée uniquement dans le sein. Les ganglions axillaires ne sont pas envahis.

Stade II : La tumeur mesure entre 2 et 5 cm. Les ganglions lymphatiques avoisinants sont touchés.

Stade III : Les tissus voisins sont touchés ainsi que d'autres aires ganglionnaires.

Stade IV : Présence de métastases dans d'autres organes.⁹

Le cancer du sein n'est pas une maladie unique mais un groupe de plusieurs types de tumeurs qui ont chacune une histoire différente et demande un traitement différent.

1.3 La cascade métastatique

Comme le statut métastatique est responsable de 90 % des décès causés par cancer³, il est important de comprendre la formation des métastases qui inclut dans sa première étape l'angiogenèse. Ce phénomène est défini par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants.

Cette cascade de formation de métastases commence par le détachement des cellules du feuillet épithélial et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) de ces cellules permet ensuite leur passage dans la circulation sanguine, ce qu'on appelle l'**intravasation** qui est la voie la plus commune^{10, 11}. Les cellules s'arrêtent ensuite dans un lit vasculaire distant et peuvent quitter les vaisseaux pendant la phase d'**extravasation**. La dernière étape, la **colonisation**, consiste à former des métastases dans les tissus distants.¹² Il est reconnu que certains cancers suivent un modèle organe- spécifique pour le développement des métastases. Dans le cas du cancer du sein, les organes généralement touchés par les métastases sont le foie, le cerveau et les poumons. Il a été suggéré que les patrons de circulation sanguine entre le site de la tumeur principale et celui de l'organe secondaire soient suffisants pour tenir compte des modèles organe-spécifique des métastases.¹⁰

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un mécanisme polyvalent qui facilite le repositionnement des cellules durant le développement embryonnaire, la régénération des tissus après chirurgie, la

carcinogénèse et la formation des métastases.¹³ Il a été démontré qu'il n'y a pas de preuves de changement d'identité ou de conversion des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuse *in vivo* et que seul le répertoire biologique des cellules normales et tumorales est responsable des événements et des processus observés pendant le développement embryonnaire, la cicatrisation pathologique ou la formation des métastases tumorales.¹³

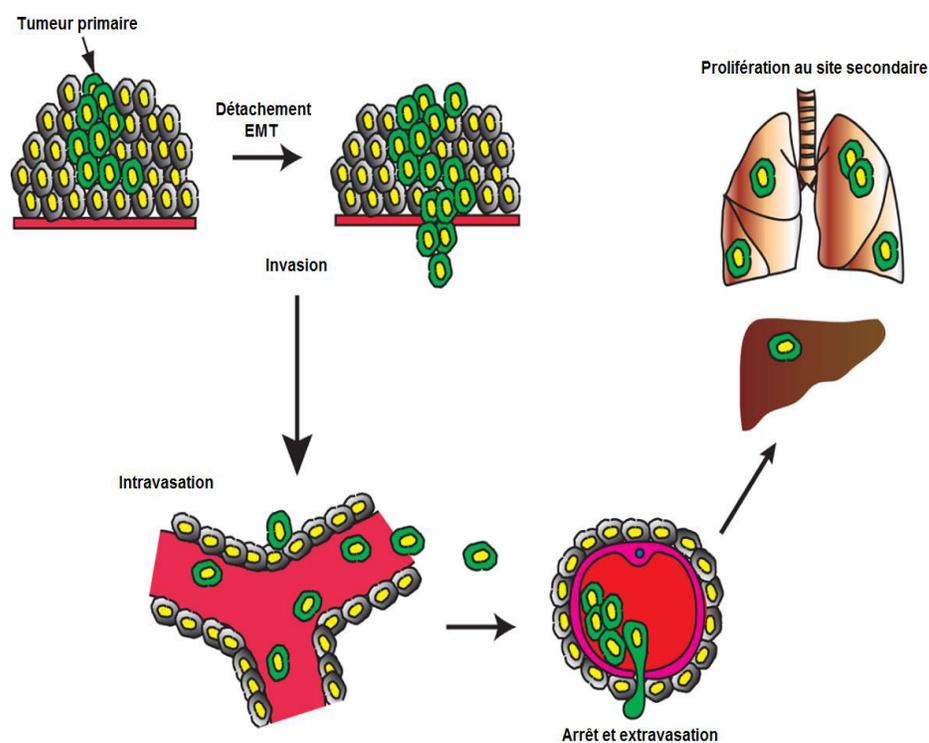


Figure 2 : La cascade métastatique

Les cellules tumorales primaires se détachent de la tumeur-mère. La transition épithélio-mésenchymateuse joue un rôle dans l'entrée de ces cellules dans la circulation sanguine et leurs déplacements vers l'organe secondaire, site de la formation des micro-métastases. (Adapté de ¹²)

1.4 Les outils de diagnostic du cancer du sein

Il existe plusieurs outils pour établir un bon diagnostic du cancer du sein. Le médecin commence par palper la masse soupçonnée d'être cancéreuse dans le sein pour déterminer sa forme, sa taille et sa mobilité. L'identification de l'ampleur de la maladie est primordiale dans le pronostic, le choix du traitement et la chronologie des thérapies proposées. Le recours aux autres techniques d'imagerie ajoute de l'information concernant le type et la taille de la tumeur. Seul l'examen histologique des tissus par une biopsie confirme le diagnostic.

- **La mammographie**

La mammographie de dépistage est une technique de radiographie à très faible dose qui permet de visualiser les tissus mammaires³. L'image de la mammographie renseigne sur l'opacité, le contour, le volume et la réaction ou l'épaississement de la lésion. On recherche aussi les micro-calcifications en cliché agrandi pour le diagnostic des cancers infra-cliniques.¹⁴ Bien que les images fournies soient d'une sensibilité de 80 %, plusieurs études controversées sur l'utilisation de la radiologie en stade précoce soulignent un niveau élevé de faux positifs ainsi que son inconveniance et son coût élevé. Une autre limite dans l'utilité de la mammographie est la densité des seins. Un sein dense, tel que fréquemment observé chez les jeunes femmes, rend l'interprétation des clichés de l'imagerie plus difficile. Le médecin pourrait alors demander un autre examen.

- **L'échographie**

Dans certains cas comme celui des seins denses, la mammographie peut être complétée par une échographie. C'est un examen qui utilise des ondes sonores de haute fréquence pour produire des images afin de différencier une masse liquide (kyste) d'une masse solide, d'identifier la région atteinte ou de guider une biopsie.

- **La biopsie**

Il s'agit d'un prélèvement de cellules, de tissus ou de ganglions afin d'être examiné en anatomopathologie. Seule la biopsie pourra confirmer un diagnostic de cancer du sein. Cet examen histologique se fait sous guidage échographique ou par tomодensitométrie. Il existe trois types principaux de biopsies, soit la biopsie à aiguille fine, la micro biopsie et la biopsie par forage. On peut procéder aussi à la biopsie de la peau ou du mamelon si le médecin soupçonne un cancer inflammatoire ou la maladie de Paget, respectivement.³ Cependant, la biopsie est une méthode très coûteuse et peu adaptée à un suivi de routine étant donné qu'elle est invasive, douloureuse et parfois impossible par manque d'accessibilité des lésions mammaires.¹⁵

- **Le dosage sérique des marqueurs tumoraux CA15.3 et CEA**

Le dosage sérique permet l'évaluation des taux sanguins de certains marqueurs dans la circulation. Ce dosage est utilisé pour des fins de diagnostic ou dans le suivi des patients. Il existe deux principaux marqueurs disponibles en clinique pour le suivi des patientes au cours de leur maladie soient le CA15.3 et le CEA. Le CA15.3 est un antigène décrit en 1985 par Tobias *et al.* qui est une glycoprotéine présente au pôle

ductal des cellules épithéliales dans de nombreux tissus comme le sein, l'utérus et l'ovaire. Dans les tumeurs, elle est exprimée sur toute la surface cellulaire et elle est relâchée dans la circulation sanguine. L'augmentation de l'expression du CA15.3 sérique corrèle avec le stade de la maladie et 88 à 97% des patientes qui ont un taux élevé lors du premier diagnostic vont développer des métastases.

Le CEA est un antigène carcinoembryonnaire identifié en 1965 dans les coupes histologiques de cancer du côlon. C'est une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellulaire. Le taux sérique de CEA peut être élevé dans plusieurs cas de cancers (colon, foie, pancréas...). Son dosage sérique est utilisé en combinaison avec le CA15.3 pour des fins de suivi du cancer du sein métastatique. Il a été conclu que l'utilisation de l'association de ces deux marqueurs pourrait augmenter la sensibilité de détection des récidives.^{16, 17} Environ 40 % des patientes métastatiques du cancer du sein ont un taux sérique élevé de CEA mais 10 % de celles-ci ont un taux élevé sans augmentation pour autant de l'expression du CA15.3.¹⁶⁻¹⁸

Il a été démontré que ces deux marqueurs ont une faible sensibilité aux stades précoces de la maladie et peuvent ne pas être détectés dans tous les types de cancers, ce qui a comme conséquence de donner de faux sujets négatifs. Le manque de spécificité peut aussi donner des faux-positifs. En effet, il a été démontré que les marqueurs CA15.3 et CEA n'augmentent pas seulement dans le cas de cancer du sein mais aussi dans certaines affections bénignes (hépatopathies ou broncho-pneumopathies) ou dans des états pathologiques tels que les cancers de l'ovaire, du poumon et de la thyroïde.¹⁹

1.5 Recommandations canadiennes pour le suivi du cancer du sein

- **Cancer du sein en stade précoce :**

Le cancer du sein est classifié selon le système TNM (Tumeur, Nodules, Métastases). Le suivi du cancer nouvellement diagnostiqué est réalisé par une mammographie bilatérale et un ultrason du sein. Un bilan complet d'analyse du sang est aussi recommandé incluant la phosphatase alcaline, les enzymes hépatiques et les plaquettes.

Le stade de la tumeur et l'atteinte des ganglions sont souvent établis suite à l'imagerie par résonance magnétique ou à la mammographie. Si l'envahissement ganglionnaire ne peut être vu par radiographie ou palpé par examen physique, une intervention chirurgicale est nécessaire pour effectuer une recherche de ganglions sentinelles touchés par la tumeur. Un échantillon tissulaire est envoyé en biopsie pour confirmer le statut hormonal et le stade tumoral.²⁰ En accord avec les lignes directrices du Cancer Care Ontario, il n'est pas recommandé d'utiliser la radiographie de la poitrine, la scintillographie osseuse ou l'ultrasonographie du foie pour les premiers stades de cancer du sein malgré leurs avantages potentiels dans la détection des métastases distantes.

Malgré l'approbation d'un système de détection des cellules tumorales circulantes dans le sang par l'administration américaine *Food and Drug Administration* FDA, l'évaluation de ces cellules ne doit pas être prise en considération pour établir le diagnostic ou influencer le choix de traitements chez les patientes atteintes de cancer du sein en stade primaire ou avancé.²⁰

- **Cancer du sein métastatique :**

Le praticien peut se fier aux signes et aux symptômes comme les douleurs localisées développées suite à une thérapie chez une patiente pour soupçonner la présence de métastases. Les tumeurs secondaires distantes dans le cancer du sein se situent généralement dans le foie, les poumons et les os. Pour l'évaluation de la maladie dans ces sites, l'utilisation de la radiologie est recommandée, dont la radiographie de la poitrine, la tomographie de l'abdomen, l'imagerie par résonance magnétique IRM ou le scan des os. Ces techniques permettent de situer les métastases distantes et d'évaluer l'ampleur de l'invasion tumorale. Cependant, tel que décrit précédemment, ces pratiques présentent des risques pour la santé à long terme des patientes et sont peu adaptées au suivi de routine.

Actuellement, en clinique, les marqueurs tumoraux sont déterminés par dosage immunologique et le taux dans le sérum est comparé à différents stades de la thérapie. Étant présent sur la surface des cellules tumorales, le marqueur tumoral CA15.3 est libéré dans la circulation, d'où la corrélation de son taux avec le statut de la maladie. Le CA15.3 est un marqueur sérique et son analyse est très bien décrite pour la détection des antigènes tumoraux circulants dans le sang périphérique des patientes. Des études cliniques ont évalué la performance de ces marqueurs dans le diagnostic, le pronostic et la prédiction de récurrences après chirurgie ou radiothérapie.²⁰ Malgré qu'ils soient pertinents pour le pronostic ils ne sont pas recommandés pour le cancer du sein en stade primaire. À l'instar de la Société Américaine d'Oncologie Clinique, il a été conclu au Canada en 2007 de ne pas utiliser ces marqueurs tumoraux dans le cancer du sein à cause de l'insuffisance des études supportant la pertinence clinique de leur utilisation dans le diagnostic ou le statut du cancer du sein. Leur utilité

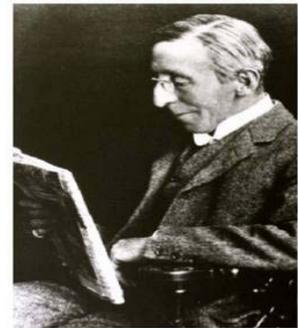
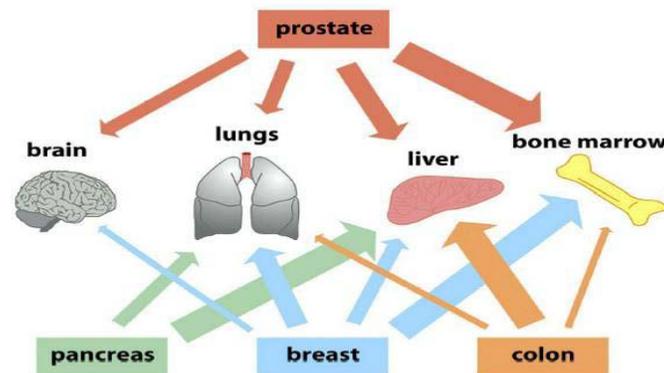
dans le suivi de routine n'a pas été prouvée cliniquement par des études concluantes dans le cancer du sein métastatique.²⁰

2 Les cellules tumorales circulantes

2.1 Description

Les métastases sont décrites comme des cellules ayant franchit les différentes étapes de la dissémination : l'invasion locale, , l'interaction des cellules tumorales circulantes (CTC) avec les composantes du sang, l'extravasation, la dormance des cellules tumorales disséminées et enfin la prolifération et la formation des métastases.²¹

La présence des CTC a été initialement décrite par l'australien Thomas Ashworth en 1869. Stephen Paget a publié en 1889 dans the Lancet sa fameuse hypothèse *the seed and soil* soutenant que la formation des métastases dans des organes spécifiques soit dépendante des cellules cancéreuses (*the seed*) et de l'organe secondaire (*the soil*).¹⁰



**Théorie du
« seed and soil »
Stephen PAGET, 1889**

Figure 3 : Théorie du «seed and soil»

Les cellules de la tumeur primitive (*the seed*) vont sélectionner le site de l'organe hôte dépendamment de la capacité des cellules du nouveau microenvironnement (*the soil*) à réussir toutes les étapes de la colonisation.

(Illustration de ²²)

Les CTC représentent une population de cellules hétérogènes qui possèdent différentes caractéristiques génétiques et antigéniques d'un type spécifique de cancer. ²³ Elles peuvent avoir aussi différentes formes et tailles avec des intensités variables en cytokératines. Dans certains cas, elles sont tout à fait distinctives et uniques dans un échantillon d'un patient et donc bien repérables, alors que dans un autre échantillon leurs traits cytologiques sont très variables. La taille de ces cellules est très variable. Leur noyau peut mesurer d'un tiers jusqu'à 4 fois la taille des noyaux des cellules voisines. Cette caractérisation morphologique a été récemment répertoriée grâce aux travaux de recherche d'une équipe américaine en se basant sur le principe d'une biopsie fluide des CTC en haute définition

chez les patients métastatiques de cancer du sein, de prostate et du pancréas.²⁴

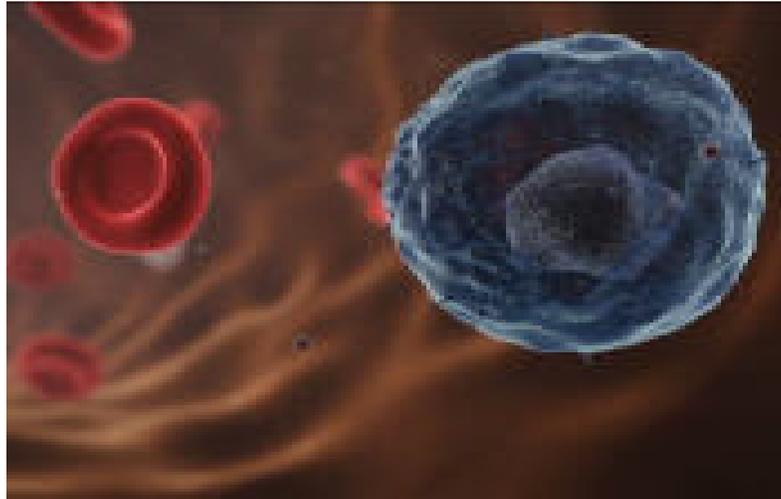


Figure 4 : Image de *CELL SEARCH* vidéo, courtoisie de Veridex, LLC aux laboratoires Mayo

Cellule tumorale en circulation présentant une forme et une couleur différente de celle des globules rouges adjacentes.

La TEM, décrite plus haut, joue un rôle très important dans la formation et la réparation des tissus et des organes du corps, mais elle est responsable aussi de la progression des carcinomes à travers divers mécanismes. Au cours de la TEM, le statut mésenchymateux des CTC leur confère la possibilité de voyager vers d'autres organes distants ce qui leur permet de se différencier en différents types de cellules durant le développement et l'initiation des métastases. Étant donné que les principes actifs des traitements conventionnels du cancer ciblent des récepteurs spécifiquement connus des cellules tumorales, les CTC métamorphosées lors de TEM peuvent ne pas exprimer ces agents thérapeutiques et donc peuvent échapper aux traitements et permettre la progression de l'invasion tumorale distante.²⁵

2.2 Utilité clinique

Les CTC sont impliquées non seulement dans le diagnostic, mais aussi dans le pronostic et le suivi du cancer du sein.

Le diagnostic initial du cancer du sein est basé sur l'identification et la caractérisation des cellules tumorales par une première biopsie des carcinomes, et, à l'occasion, une seconde est effectuée pour confirmer que les métastases distantes apparentes sont issues de la tumeur primaire.²⁴

Dans le cancer du sein au stade primaire comme métastatique, les CTC pourraient servir de facteur prédictif selon des études publiées par des équipes de recherche en Grèce.²⁶⁻²⁹ Ils ont démontré, dans une cohorte de patientes ayant subi une chirurgie et avant de recevoir une thérapie adjuvante (c'est-à-dire traitement préventif des récives), que la détection des CTC serait associée à une possibilité de survie sans rechute.³⁰

D'autres publications ont associé la détection des CTC dans le sang périphérique de patientes aux différents stades du cancer du sein, à la prédiction de la survie sans rechute et à la progression du statut métastatique.³¹⁻³³ Pour le cancer du sein métastatique, il a d'abord été démontré que la plupart des CTC détectées dans le sang des patientes présentent les caractéristiques de la TEM et des cellules souches tumorales. Ensuite, les CTC exprimant les marqueurs spécifiques à la TEM et aux cellules souches tumorales sont un indicateur de la résistance des cellules à la thérapie et constitue un facteur de mauvais pronostic.³⁴ *Cristofanilli et al.* ont publié plusieurs études et ont décrit la présence de CTC comme un facteur de pronostic important dans le cancer du sein métastatique nouvellement diagnostiqué, et que leur détection corrèle avec la progression de la maladie et la survie des patientes atteintes.^{35, 36}

Le suivi de la réponse au traitement est d'une grande importance dans la progression de la maladie à cause de la variation de l'efficacité des thérapies au cours d'un cancer. En effet, des publications suggèrent que les cellules cancéreuses du sein ayant un potentiel métastatique circulent dans le sang très tôt dans la maladie avant de s'établir et de s'installer en tumeurs secondaires.³⁷ Au stade précoce du cancer du sein, la présence des CTC permet aux cliniciens d'identifier les patientes qui sont à risque de rechuter et ainsi de planifier des traitements additionnels. En phase métastatique, le suivi des CTC permet aux oncologues d'adapter les thérapies plus tôt au cours de la progression de la maladie.³⁸ Ainsi, l'énumération des CTC au cours d'un traitement du cancer du sein métastatique serait un marqueur biologique de réponse tumorale qui permet l'adaptation de la chimiothérapie après un seul cycle sans attendre les rapports de radiologie faits habituellement après trois à quatre cycles de chimiothérapie. Deux publications ont montré que l'utilisation des CTC pour le suivi apporte des informations indépendantes des rapports de

radiologie ou des analyses sériques.^{31, 39} La caractérisation moléculaire et génétique des CTC, qui permet de dessiner un profil de chimiorésistance, serait un atout pour les cliniciens dans leurs choix de régime de chimiothérapie les plus efficaces à leurs patientes.³⁸ En résumé, les études des CTC montrent leur utilité dans l'identification du potentiel métastatique de la maladie aux stades précoces, la gestion des risques de la stratification dans les traitements adjuvants, le suivi de la réponse aux traitements, l'évaluation des rechutes et le développement éventuel des thérapies anti-cancer individualisées.⁴⁰

2.3 Techniques de détection des CTC dans le cancer du sein

Les CTC sont de rares composantes parmi des millions de cellules circulantes dans le sang humain. Pour les identifier, les investigateurs se sont basés sur la différence entre les cellules épithéliales versus les cellules hématopoïétiques, et entre les cellules épithéliales saines versus malignes. Ces différences sont déterminées par des caractéristiques physiques, comme la taille et la masse, et aussi biologiques, comme l'expression de marqueurs spécifiques aux épithéliums ou aux tumeurs épithéliales malignes. L'analyse des CTC est un paramètre très prometteur dans l'estimation du développement de métastases et le risque de rechute chez les patientes atteintes de cancer du sein. Plusieurs systèmes analytiques ont été développés pour l'isolement, l'enrichissement et la détection des CTC. Ces techniques incluent des méthodes qui se basent sur la caractérisation moléculaire et biologique comme la réaction en chaîne par polymérisation (PCR) ou des méthodes d'imagerie et d'outils de microfiltration et de Micro Chip.

La caractérisation moléculaire des CTC peut donner des informations supplémentaires sur la nature biologique de ces cellules, comme le statut des récepteurs hormonaux et les récepteurs des facteurs de croissance. Ce qui permet aussi l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, la compréhension des mécanismes de résistance aux traitements et le suivi en temps réel des thérapies systémiques.⁴¹ Les plates-formes qui présentent une haute sensibilité de détection des CTC sont associées à un meilleur suivi de la maladie et une bonne efficacité du traitement. Dans la majorité des cas, la détection des CTC passe par deux étapes analytiques : l'isolement-enrichissement et la détection.

Considérant leur rareté dans le sang humain, la première étape consiste en l'enrichissement des cellules avant leur détection, en utilisant la centrifugation par gradient de densité suivie d'une séparation *Ficoll-Hypaque* ou une filtration immuno-magnétique.^{42, 43} La détection des CTC est la seconde étape qui peut se faire principalement par les essais PCR d'amplification de transcrits spécifiques de tissus ou par des techniques de marquage cytologique avec des anticorps monoclonaux spécifiques aux antigènes épithéliaux.²³

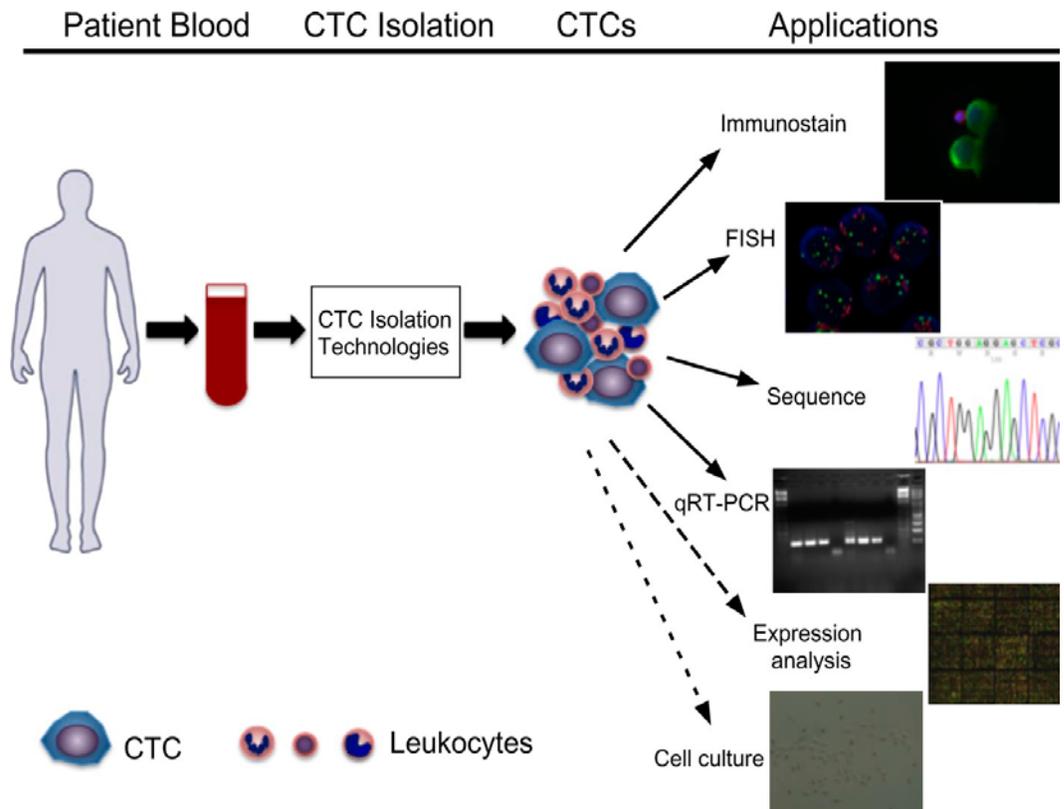


Figure 5 : Illustration des technologies disponibles pour l'isolement des CTC.

À partir du sang périphérique de patient atteint de cancer, les CTC sont capturés avec des leucocytes contaminants. Divers technologies courantes sont disponibles pour l'isolement des CTC. Des marqueurs fluorescents peuvent servir dans la détection par imagerie ou par *FISH*. L'extraction des ADN ou ARN des CTC permet leur séquençage ou leur quantification par RT-PCR en temps réel (qRT-PCR). Les cellules viables peuvent être utilisées en culture pour des analyses d'expression géniques. (Adapté de 44)

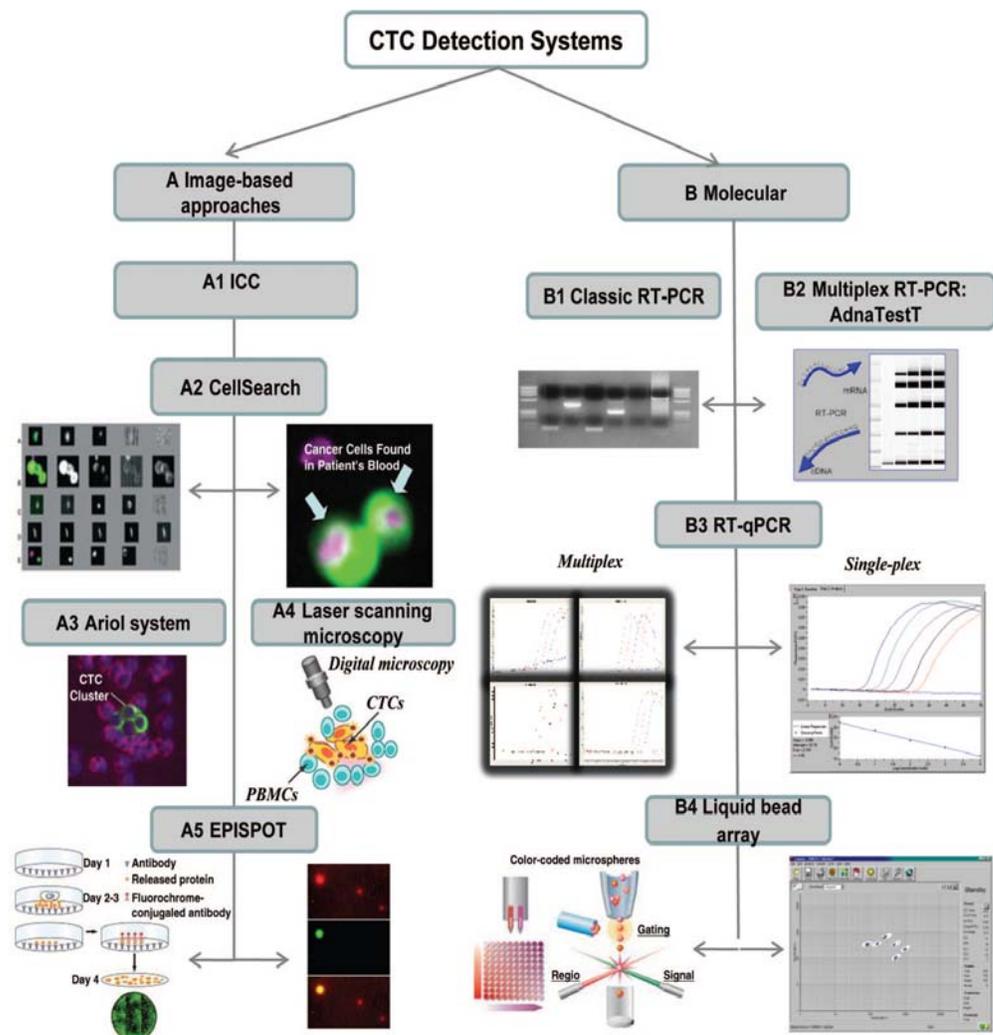


Figure 6 : Les techniques de détection des CTC.

Deux approches différentes sont utilisées dans la détection des CTC. Il y a d'abord l'approche basée sur l'imagerie qui regroupe les techniques d'immunocytochimie ICC, les systèmes commerciaux *CELL SEARCH* et le système *ARIOL*, la technologie d'imagerie par microscopie laser et l'analyse de protéine par l'approche l'*EPISPOT*. Il y a ensuite l'approche moléculaire, basée sur l'amplification et la quantification par qRT-PCR (classique et multiplex) ainsi que la technologie de *Liquid bead array*. (Adapté de⁴¹)

Le « *CELL SEARCH* » est le principal système automatique commercial et le seul approuvé par la FDA. Les cellules sont aspirées dans des tubes spécifiques qui contiennent un stabilisateur et des billes magnétiques anti-EpCAM (epithelial cell adhesion molecule). L'immunomarquage avec ce dernier et avec des anti-cytokératines est utilisé pour la saisie et la confirmation des cellules tumorales respectivement.⁴¹ Cette méthode standardisée a été validée par des programmes de tests cliniques très rigoureux dans le but de réaliser l'énumération des CTC *in vitro* à partir du sang des patients atteints de cancer métastatique du sein, du côlon et de la prostate.^{23, 45} Une étude en phase III a été initiée en utilisant ce système pour tester si le changement de chimiothérapie chez des patients, qui ont un niveau élevé de CTC dans leur sang après la première évaluation post chimio-thérapeutique, ajoute une information clinique pertinente aux résultats du suivi de la maladie.²³ Cependant, le désavantage principal du système *CELL SEARCH* est la dépendance à la positivité des cellules au marqueur EpCAM.⁴¹

Le « *Adna test* » est un système de sélection/détection qui comporte deux étapes. La première étape consiste en l'enrichissement des CTC *in vitro*, du sang de patientes atteintes d'un cancer du sein, en utilisant des anticorps anti-Mucine et anti-EpCAM. Après une transcription inverse qui permet d'obtenir l'ADNc à partir de l'ARNm, la deuxième étape est une PCR multiplex qui permet de visualiser l'expression d'une variété de marqueurs tumoraux.^{46, 47}

Le « *MAINTRAC* » est spécialement conçu pour la détection des cellules tumorales épithéliales circulantes dans le sang total non séparé en utilisant la cytométrie à balayage laser après une coloration des anticorps fluorescents anti-EpCAM et anti-CD45.^{23, 48}

Le test « *EPISPOT* » utilise une approche différente des autres systèmes basé sur la détection des protéines spécifiques de tumeurs secrétées par les CTC et non pas sur les anticorps monoclonaux.²³ Cette méthode permet de déterminer la fréquence de sécrétion de protéine par les cellules tumorales et de les retracer par ces épitopes. Une culture cellulaire est nécessaire dans cette méthode pour avoir une quantité suffisante de protéines viables secrétées par les CTC.⁴⁹ Malgré qu'*EPISPOT* détecte seulement les bonnes cellules tumorales viables qui peuvent être étudiées et suivies *in vitro*, aucune étude n'a été amorcée pour tester la pertinence clinique de l'utilisation de cette technique dans le cancer du sein.⁴⁹

Le système « *Ariol* » est similaire à la méthode de *CELL SEARCH*. Il consiste à faire une étape d'enrichissement en utilisant des anticorps de cytokératines CK et d'EpCAM couplés à des microbilles et la détection se base sur les CK, le CD 45 et DAPI.⁴¹ L'inconvénient commun des techniques de l'*ARIOL*, la cytométrie à balayage par laser, est leur dépendance à la positivité au marqueur EpCAM.^{45, 48, 50, 51}

Dans l'approche moléculaire, on trouve la technologie « *Dy light* » qui est une autre méthode de détection des CTC avec une étape d'enrichissement qui diffère des précédentes. Après un processus de filtration, la détection se fait *via* une multitude d'anticorps marqués comme les CK, HER2, ALDH1, CD44, et le CD24.^{41, 52}

La « RT-PCR » est la méthode de biologie moléculaire la plus étudiée dans la détection des ARNm des marqueurs tumoraux dans le cancer du sein. Plusieurs marqueurs ont été documentés pour leur utilisation chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. Plusieurs études ont étudié la possibilité d'utilisation de marqueurs seuls ou en combinaison pour augmenter la spécificité et la sensibilité du test. La

méthode de détection de l'ARNm de la CK19 a été développée et brevetée en utilisant la qRT-PCR chez les patientes atteintes de cancer du sein en stade précoce.^{53, 54}

2.4 Études de comparaison des différentes méthodes de détection des CTC

Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients. Plusieurs études ont comparé ceux-ci afin d'évaluer leur potentiel d'utilisation en clinique.

Le potentiel de la technique *CELL SEARCH* dans le pronostic, a été évalué dans l'étude de *Budd et al.* qui a montré que ce système est plus avantageux que la radiologie conventionnelle pour l'évaluation de la réponse aux traitements ainsi qu'à la prédiction de la survie totale des patientes de cancer du sein métastatique.³¹

Pour un même type d'échantillons cliniques de patientes avec cancer du sein métastatique, Van der Auwera *et al.* ont mené une vaste étude de comparaison entre les principales méthodes d'analyse et ont conclu qu'il y a une concordance de 81% entre les approches *CELL SEARCH* et *Adna test*, de 57 % entre *CELL SEARCH* et la RT-PCR et de 50 % entre *Adna test* et la RT-PCR.⁴⁷ Dans une étude, la technologie de *CELL SEARCH* a été comparée à *MAINTRAC*, qui sont deux analyses basées sur l'expression du récepteur de l'EpCAM à la surface des CTC dans le sang. La conclusion de cette étude a évoqué la nette supériorité de la détection et la confirmation morphologique des CTC par *MAINTRAC* versus une simple détection des cellules tumorales dans le sang par *CELL*

SEARCH. Aussi, en analysant les étapes d'enrichissement dans chacune de ces technologies, il a été démontré que l'utilisation des billes magnétiques réduit le nombre de cellules extraites par *CELL SEARCH*, ce qui explique que *MAINTRAC* soit plus performant dans l'énumération des CTC.⁵⁵ L'équipe de *Fehm et al.* a obtenu une corrélation de 50% entre *CELL SEARCH* et *Adnatest* dans une cohorte de 245 patientes métastatiques.⁵⁶

Une autre étude sur la corrélation des techniques pour la détection des CTC dans une cohorte de 80 patientes avec cancer du sein métastatique et de 20 sujets sains a conclu que la corrélation entre *CELL SEARCH system* et la qRT-PCR est de 88 %. Dans cette étude, le taux le plus élevé de positivité des échantillons des deux groupes a été observé avec la qRT-PCR en utilisant les marqueurs CK19 et le marqueur tumoral mammaire la mammaglobine. Ce qui mène à conclure que cette méthode est la plus sensible pour la détection des CTC.⁵⁷

Dans une évaluation du potentiel clinique du suivi de la maladie par RT-PCR, l'équipe de *Becker et al.* a obtenu une concordance de 73 % avec la RT-PCR par rapport à une approche basée sur l'immunocytochimie classique (*ICC*). L'étude a démontré l'utilité clinique du suivi de routine du cancer du sein par RT-PCR *via* une détection précoce des récurrences et des métastases.⁵⁸

2.5 Les marqueurs tumoraux des CTC

2.5.1 Les marqueurs tumoraux :

Les marqueurs tumoraux sont des substances trouvées dans les liquides biologiques en réponse à un cancer, d'où la désignation de biomarqueur tumoral. Ce sont des molécules ou des fonctions cellulaires caractéristiques d'un cancer ou d'une personne à haut risque de cancer par rapport à sa contrepartie normale. Ils peuvent être associés à une caractéristique donnée du processus tumoral, comme l'invasion ou la résistance aux thérapies.⁵⁹ Un biomarqueur peut être de l'ADN, de l'ARNm ou une protéine. Il peut s'agir d'un facteur pronostic ou d'un facteur prédictif, selon le contexte pathologique et le tissu investigué :

-Un biomarqueur tumoral est dit pronostic lorsqu'il est évalué chez un patient qui ne reçoit pas un traitement ou n'est pas suivi dans un protocole standard. Il permet d'estimer le potentiel évolutif tumoral chez un patient et d'identifier ceux qui nécessitent une thérapie adjuvante.

-Un biomarqueur prédictif d'une réponse à une thérapie est évalué de façon statistique en comparant les tests randomisés entre les patients subissant un traitement standard et ceux qui sont en absence de traitement. La valeur prédictive est alors obtenue par l'analyse de l'interaction entre le traitement et le statut du marqueur sélectionné.⁶⁰

L'utilité d'un biomarqueur tumoral dépend du stade de la tumeur. Il apporte une information nouvelle et supplémentaire utile dans la décision clinique et doit être pris en considération dans des cas spécifiques et ne peut pas être utilisé isolément. Selon une théorie commune des experts en pharmacologie et en biochimie clinique, la validation d'un biomarqueur doit passer d'abord par l'évaluation du niveau d'évidence de son utilité clinique. Cette évaluation inclut plusieurs paramètres comme l'évidence

biologique, ensuite la définition de la cible moléculaire et finalement la définition de la méthode analytique.⁶¹

Le choix d'un marqueur tumoral est basé sur sa spécificité et sa sensibilité. La sensibilité est définie par la proportion de résultats positifs chez les sujets atteints de la maladie. Alors que la spécificité est la proportion de résultats négatifs chez les sujets sains.

Dans le cancer du sein, un marqueur tumoral idéal doit être exprimé uniquement dans les cellules cancéreuses du sein et détecté à de très faibles concentrations. Son niveau d'expression doit corrélérer avec le stade de la tumeur, prédire le pronostic et ajoute de l'information concernant la réponse au traitement. Par contre aucun des marqueurs rapportés dans la littérature ne répond à tous ces critères.

2.5.2 Marqueurs tumoraux utilisés dans la détection des CTC :

L'étude du profil d'expression d'un gène marqueur est rendue possible grâce aux avancées technologiques des outils de biologie moléculaire. Outre les marqueurs CA15.3 et CEA du cancer du sein, il existe d'autres marqueurs étudiés et documentés pour la détection des CTC :

La mammaglobine est exprimée exclusivement dans les cellules épithéliales mammaires, et surexprimée dans un sous-groupe de cancers du sein métastatiques.⁶² Des études ont montré la présence de l'ARNm de la mammaglobine dans les cellules tumorales disséminées dans le sang, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse.^{63, 64} Chez des femmes atteintes de cancer du sein non traité, la présence de l'ARNm de la mammaglobine a été observée dans 62 % des cas et chez aucune des 50 femmes témoins.⁶⁵ Dans une autre étude, la présence de l'ARNm de la

mammaglobine a été associée au stade de la tumeur et au statut nodal.⁶⁶ La présence de l'ARNm de la mammaglobine dans la circulation chez les femmes atteintes de cancer du sein a été démontrée dans 41 % des cas de femmes atteintes en stade IV comparativement à 2 % seulement pour les tumeurs de patientes de stade I⁶⁷.

Les cytokératines sont des filaments intermédiaires que l'on retrouve dans les cellules épithéliales. Leur expression spécifique dans les cellules épithéliales permet l'identification de cellules tumorales d'origine épithéliale. Leurs profils d'expression sont différents selon l'origine de la tumeur. Pour le cancer du sein, les marqueurs potentiels rapportés dans la littérature sont principalement les CK7, CK19 et CK20.

La CK19, un marqueur très documenté dans la littérature pour le suivi du cancer du sein, a démontré une spécificité de 98 % dans une cohorte de 77 patientes de cancer du sein de stade I / II et 47 % au stade IV en comparaison à 89 donneuses saines. La CK19 a été détectée chez 31% de patientes de stade I/II avant le traitement de la chimiothérapie alors qu'il en restait que 7 % suite au traitement. Chez des patientes qui ont des métastases (stade IV), l'ARNm de la CK19 a été détecté dans 42% des patientes post chimiothérapie.^{53, 68} D'autres études ont confirmé la corrélation entre la CK19 et la réponse au traitement. Dans une cohorte de 111 patientes au stade I/II, l'ARNm de la CK19 a été observé dans 31 % de patientes avec le statut nodal N0 et 38 % de celles avec le statut N1. Après la chimiothérapie, la CK19 est non détectée dans le sang de patientes avec le statut nodal No alors qu'elle a été détectée dans 50 % des patientes avec le statut N1. Le suivi des patientes sur une période de 4 mois a révélé une rechute chez 13 % des cas de patientes N1 et aucune rechute chez celles N0.^{53, 54, 68} *Gaforio et al.* a montré que la détection de

cellules CK19 positives est associée à un mauvais pronostic et une absence de réponse à la chimiothérapie³².

L'ARNm de la CK7 a été détecté dans la circulation sanguine de 206 patientes atteintes, avant et une année suite à une intervention chirurgicale. Avant la chirurgie, 18 % de patientes étaient positives à la CK7, correspondait à un mauvais pronostic de survie et de rechute.⁶⁹

La CK20 a démontré une spécificité de 100 % dans une cohorte de 150 sujets sains, 99 patientes avec un cancer colorectal et 110 patientes avec un cancer du sein. La positivité à la CK20 était associée à 29 % des cancers du sein et 22 % des cancers colorectaux, mais la corrélation avec le potentiel métastatique n'est montrée que pour le cancer du sein.⁷⁰

L'EpCAM est une protéine transmembranaire qui code pour le gène GA733-2. Elle joue un rôle dans l'adhésion, la différenciation, la signalisation et la prolifération cellulaire. Son expression accrue est associée à l'adhérence inter-cellulaire. L'EpCAM est un marqueur utilisé dans les examens histologiques. L'antigène EpCAM est fortement exprimé par les tumeurs d'origine épithéliale. La quantification de l'ARNm de ce marqueur par PCR en temps réel chez des sujets sains et des patientes avec cancer du sein primaire et métastatique a montré la valeur pronostique de cette molécule⁷¹. D'autres études ont suggéré des traitements ciblés (immunothérapie) avec l'EpCAM basés sur des analyses d'immunohistochimie.⁷²

La maspine est une protéine apparentée aux inhibiteurs de protéases de la famille des serpins. Tout comme la mammaglobine, elle est extrêmement spécifique aux cellules épithéliales mammaires. Une régulation négative de la maspine dans les lignées cellulaires de cancer du sein primaire et métastatique a été rapportée, mais cet effet est en

contradiction avec plusieurs études cliniques.⁷³ Dans une étude récente, l'ARNm de la maspine a été détecté dans le sang périphérique de 27 femmes saines et de 140 patientes atteintes d'un cancer du sein non traité. Une spécificité de 89 % et une sensibilité de 24 % ont été rapportées. Dans cette même étude, la présence de la maspine corrélait avec la prolifération cellulaire de la tumeur primaire, ainsi qu'avec le statut nodal.⁶⁶ Une autre étude, dans laquelle l'ARNm de la maspine était comparée avec la CK19 et le CEA, a démontré une spécificité de 100 % de la maspine. L'étude a été effectuée chez 54 donneuses saines, 28 patientes avec un cancer hématologique, 31 patientes avec un cancer colorectal métastatique, 75 patientes avec un cancer du sein opérable et 50 avec un cancer du sein métastatique. L'ARNm de la maspine n'était pas détectable chez les sujets sains ou atteints de cancers hématologiques ou colorectaux, mais était détecté dans 9 % des cancers du sein opérables et 14 % des cancers du sein métastatiques. La positivité de l'ARNm de la maspine était alors en corrélation avec la grosseur de la tumeur aux stades précoces du cancer.⁵⁴

Le CEA est un marqueur spécifique aux cellules épithéliales. En plus d'augmenter la sensibilité de l'essai lorsque détecté parallèlement avec d'autres marqueurs, les informations apportées par la détection d'ARNm du CEA pour le pronostic suite à une chirurgie sont importantes. Dans une étude portant sur 100 patientes avec un cancer du sein sans infiltration nodulaire, des échantillons sanguins avant et 2-3 semaines suite à la chirurgie ont été évalués. Les patientes dont l'échantillon était positif pour l'ARNm du CEA avaient un taux de survie plus faible que celles dont l'ARNm n'était pas détectable. Les plus faibles taux de survie ont été observés chez les patientes pour lesquelles l'ARNm de CEA était positif dans les échantillons pré- et post-chirurgie⁷⁴. Une étude comparable a été réalisée chez 32 patientes atteintes de différents stades de cancer du sein. La détection de l'ARNm du CEA était alors associée à une évidence de

maladie résiduelle.⁷⁵ Dans une étude portant sur 28 témoins, 20 femmes avec une lésion bénigne du sein et 108 patientes avec un cancer du sein localisé ou avec métastases, la détection combinée de l'ARNm de la CK19 et du CEA a démontré une augmentation du taux de détection de micrométastases dans le sang périphérique.⁷⁶

Les molécules d'adhésion cellulaire jouent un rôle majeur dans le phénomène de progression tumorale, *via* une régulation des interactions cellule-cellule et cellule-matrice. CD44 est un récepteur transmembranaire impliqué dans la progression tumorale et la formation de métastases. Plusieurs variants de la forme standard sont générés par l'épissage alternatif de l'ARNm de CD44, dont le variant 6 (CD44v6). Un rôle de CD44v6 a été proposé dans le cancer du sein et l'angiogenèse.^{77, 78}

HER2/neu appelé aussi ErbB2 est un gène membre de la famille des gènes qui codent pour les récepteurs transmembranaires des facteurs de croissance. Le type de cancer du sein HER2-positif tire son nom de la surexpression du gène HER2. Les cancers HER2-négatif ont un meilleur pronostic que le type HER2 positif. Plusieurs études se sont intéressées à la valeur clinique de l'expression du HER2.⁷⁹ En effet, la présence de l'ARNm de HER2 dans le sang des patientes a été associée à un degré de malignité élevé et un phénotype de cancer agressif. Dans une cohorte de 106 patientes, l'expression de l'ARNm corrèle avec la présence des cellules tumorales circulantes.⁸⁰ Des études de recherche ont conclu que la présence d'un taux élevé de ce marqueur dans le sang est prédictive d'une réponse non favorable à la thérapie hormonale ou à la chimiothérapie chez les patientes de cancer du sein métastatique.⁸¹ Une autre publication a montré que la surexpression de HER2 joue un rôle dans l'induction de la chimiorésistance.⁸²

2.6 Approche moléculaire dans la détection des CTC

La PCR est une réaction en chaîne au cours de laquelle des brins d'ADN néo synthétisés pendant un cycle d'amplification servent comme matrice pour le cycle suivant. L'utilisation de l'enzyme « ADN polymérase » résistante à des températures très élevées qu'on appelle, la Taq polymérase, permet une automatisation de la technique. Cette Taq polymérase, créée par *K. Mullis* en 1985 (Prix Nobel dès 1993), permet alors la synthèse d'un nouveau brin d'ADN à partir du brin existant d'ADNc.

Un cycle de PCR est composé de 3 étapes: dénaturation, hybridation et élongation. Ce cycle est répété de nombreuses fois au cours de la réaction. Ainsi, la réaction en chaîne aboutit à une accumulation exponentielle théorique de 2^n fois par molécule d'ADN. En effet, l'amplification se fait suivant la relation mathématique suivante : $N = N_0 \times 2^n$ (où N est le nombre final de molécules amplifiées, N_0 le nombre initial de molécules et n le nombre de cycles d'amplification). La PCR en temps réel est une puissante innovation pour l'étude de l'expression des acides ribonucléiques messagers à de très faibles concentrations. Le temps réel vient du fait que les produits formés par PCR sont visualisés au fur et à mesure dans le temps. Plusieurs systèmes ont permis l'analyse du transcriptôme et le séquençage du génome humain et l'utilité des expressions des ARNm comme approche d'analyse multiparamétrique dans les cancers et leurs microenvironnements tissulaires a été démontrée dans beaucoup de publications.⁸³⁻⁸⁶ La qRT-PCR est la méthode moléculaire la plus documentée pour la détection des CTC chez les patientes atteintes de cancer du sein.⁵³ C'est une méthode très sensible

pour la quantification des ARNm qui pourrait distinguer d'une à dix cellules tumorales parmi 10^6 cellules mononuclées normales.^{87, 88}

Plusieurs plateformes sont disponibles sur le marché pour la détection des acides nucléiques par PCR basée sur le transfert d'énergie par résonance de fluorescence FRET en utilisant des sondes d'hybridation ou des systèmes TaqMan. Ces systèmes ne sont pas appropriés pour une application de suivi de routine à cause de leurs prix très dispendieux. Parmi les appareils commerciaux économiques qui peuvent procéder à la PCR avec l'agent fluorescent SYBR Green I, on trouve le « *Light Cycler* » de Roche Diagnostics utilisé dans le cadre de cette étude (Figure 7). C'est un thermocycleur à air pulsé couplé à un micro-spectrofluorimètre. Il est connecté à un ordinateur qui permet de suivre les réactions et d'acquérir les données en temps réel. Ce système permet de chauffer l'échantillon avec un rythme de 20°C par seconde ce qui est une puissance dix fois plus importante que les thermocycleurs classiques. Par conséquent, une routine de PCR sur le *Light Cycler* de 30 à 40 cycles pourrait se faire en 30 minutes.

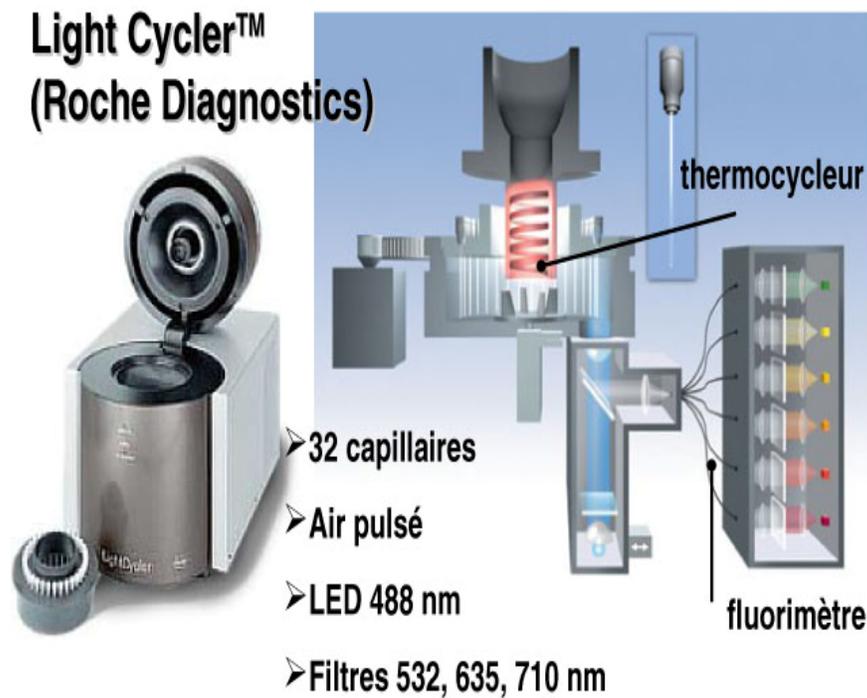


Figure7 : Le système de PCR en temps réel *Light Cycler* de Roche Diagnostics

Le light cycler est un thermocycleur à air pulsé pouvant comprendre jusqu'à 32 capillaires. Il fonctionne avec une lumière LED de longueur d'onde 488 nm. Il est couplé à un fluorimètre qui permet de suivre en temps réel l'amplification des échantillons.

L'agent fluorescent utilisé, le SYBR « Sybr Green », se lie à l'ADN double brin et émet une fluorescence qui est mesurée à la fin de l'élongation. Les données, sous forme de courbe sigmoïde, représente l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplification (Figure 8).

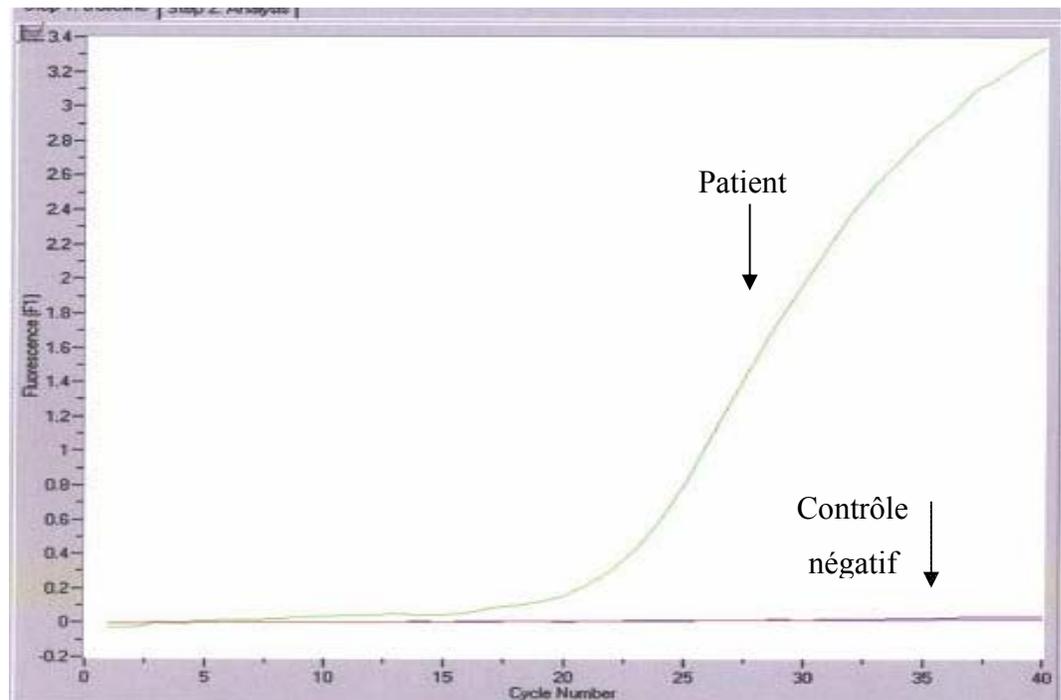


Figure 8 : Courbe d'amplification par PCR en temps réel

L'amplification est calculée par le logiciel du *Light Cycler* et est présentée sous la forme d'une courbe de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycle.

La première étape du cycle s'effectue à très haute température (95°C) permet la dénaturation des brins d'ADN. par la suite, la chute rapide de la température en continu vers la température d'hybridation des amorces permet l'obtention d'une courbe sigmoïde lorsque la température de fusion est atteinte.

Chaque produit amplifié a une température de fusion spécifique ce qui permet de différencier les produits amplifiés. À cette température, la moitié de la quantité du produit est sous la forme d'ADN double brin et

l'autre moitié simple brin. Le logiciel du *Light Cycler* produit alors une courbe de la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température ($-dF/dT$). La courbe obtenue montre un pic qui correspond à une température de fusion unique pour chacun des produits amplifiés selon la taille et la quantité en oligonucléotides du produit de départ (Figure 9).

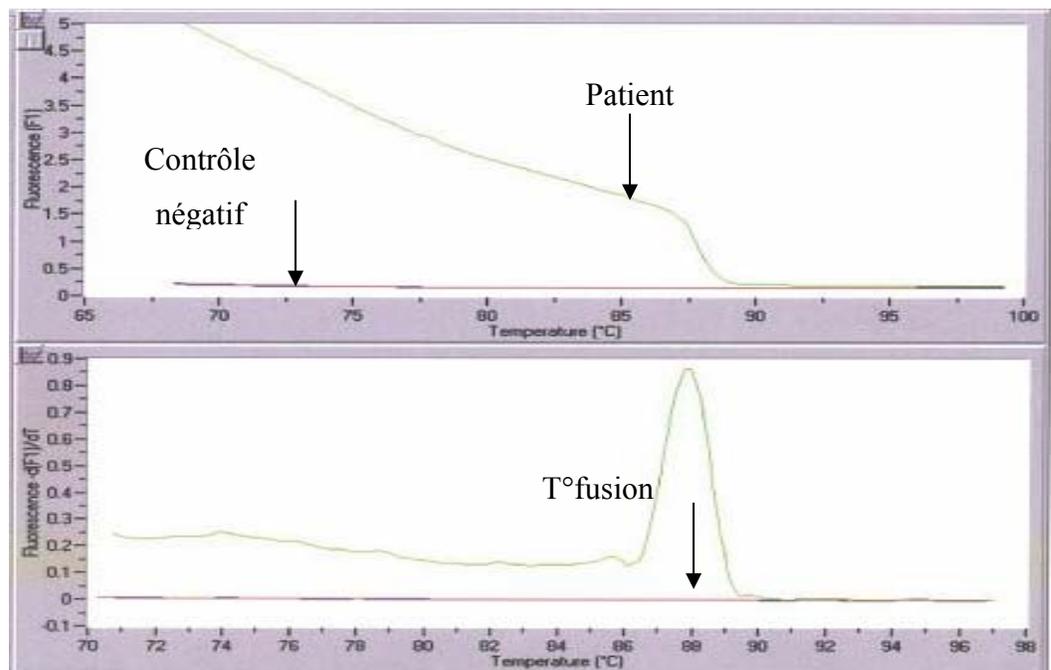


Figure 9 : Courbe de dénaturation et courbe de fusion

Courbe de dénaturation des brins d'ADN (en haut) et courbe de fusion du produit (en bas)

3 Projet de recherche

3.1 Problématique

Le suivi de routine du cancer du sein est réalisé par le dosage immunologique des marqueurs tumoraux CA15.3 et CEA. Cependant, la faible sensibilité de ces marqueurs aux stades précoces de la maladie et leur manque de spécificité tissulaire ne permet pas leur utilisation pour le diagnostic et le pronostic du cancer du sein ⁸⁹. Le diagnostic de la maladie est plutôt basé sur l'analyse d'une biopsie de la tumeur ou des ganglions lymphatiques, des méthodes invasives, coûteuses et peu adaptées pour un suivi de routine dans l'évaluation du risque de rechute et de la réponse aux thérapies. L'identification de marqueurs sensibles et spécifiques pour la détection des cellules cancéreuses circulantes serait donc souhaitable.

3.2 Hypothèse

De nombreuses études ont démontrées un lien entre la présence de cellules cancéreuses circulantes et le risque de rechute de la maladie. Malgré ces études, l'application de celles-ci dans les laboratoires en milieu hospitaliers est rare. En routine, les principaux marqueurs offerts pour le suivi des patientes atteintes du cancer du sein demeurent le CA15.3 et le CEA, dont le dosage immunologique est automatisé. Bien que le dosage de ces marqueurs protéiques soit recommandé dans certains cas dans les lignes directrices en vigueur, ceux-ci possèdent leurs limites. Étant donné que la RT-PCR possède une sensibilité considérablement supérieure à celle d'un dosage immunologique, nous émettons l'hypothèse que la détection plus rapide des CTC par RT-PCR permettra d'initier plus tôt les traitements nécessaires.

3.3 Objectifs

- **Mise au point d'un test RT-PCR en temps réel pour le dosage des marqueurs tumoraux;**
- **Détermination de la sensibilité et la spécificité diagnostiques du test;**
- **Comparaison du test RT-PCR avec le dosage immunologique actuel des marqueurs CA15.3 et CEA et les caractéristiques cliniques.**

Méthodologie

1. Consentement d'éthique

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (ND06.076) et tous les sujets recrutés ont été informés du déroulement du projet de recherche. Les patientes ont signé un formulaire de consentement détaillé.

2. Classification des sujets

Les participants sont divisés en trois groupes : groupe de sujets de référence (Réf), groupe de patientes avec cancer du sein nouvellement diagnostiqué sans métastase apparente (GrI) et un groupe de patientes avec des métastases distantes (GrII). Les patientes nouvellement diagnostiquées ont été recrutées lors de leur première visite chez l'oncologue et les échantillons ont été prélevés par une infirmière. Le choix des patientes du groupe II est basé sur leurs données cliniques et les résultats des tests biochimiques et pathologiques disponibles dans leur dossier clinique au CHUM (OACIS). Lors de leur visite de routine chez le médecin traitant, les patientes ont été prélevées soit avant de débuter leur chimiothérapie ou à la fin des premiers cycles de traitement. Aucun prélèvement n'a été fait pour les patientes pendant leur cycle de thérapie.

3. Recrutement des sujets de référence

Les sujets ont été recrutés au centre de prélèvement de l'hôpital Saint-Luc du CHUM selon plusieurs critères d'inclusion et d'exclusion. Après avoir eu une explication vulgarisée du projet, les sujets ont répondu volontairement à un questionnaire de santé général et ont accepté que l'on prélève un volume de 28 ml de sang, soit quatre tubes Na-EDTA de 7 ml. Les critères d'inclusion étaient : des hommes et des femmes entre 18 et 35 ans, n'ayant aucun problème de santé apparent. Les critères d'exclusion

étaient : aucun des sujets ne présente une histoire de maladie auto-immune ou inflammatoire chronique ni de chirurgie ou d'infection au cours des trois mois précédant le prélèvement sanguin. Les sujets de référence n'ont aucun antécédent de cancer individuel ou familial. Toutes les femmes recrutées ont confirmé qu'elles n'étaient pas enceintes. Le tableau I présente les caractéristiques des sujets du groupe de référence. Les échantillons récoltés ont été traités dans les deux heures suivant le prélèvement afin d'éviter la dégradation de l'ARN par les RNases.

4. Recrutement des patientes avec cancer du sein

Les patientes avec cancer du sein ont été recrutées au centre d'investigation intégrée de l'hôpital Hôtel-Dieu de Montréal. Après avoir expliqué les modalités de participation à ce projet de recherche, des formulaires d'explication et de consentement ont été remis à chacune des patientes. À leur visite de routine, le médecin traitant a répondu aux questionnements des patientes à propos de l'étude. Les prélèvements ont été effectués au centre de prélèvement de l'Hôpital Hôtel-Dieu ou celui de Notre-Dame. Aucune participante choisie n'a abandonnée ou a été exclue de l'étude. Un seul prélèvement a été effectué, par ponction veineuse, et est composé de quatre tubes lavande Na-EDTA et un tube doré avec un gel activateur de coagulation pour un total de 32 ml de sang veineux. Le sang recueilli dans les tubes Na-EDTA a servi à l'analyse des marqueurs tumoraux par RT-PCR alors que celui recueilli dans les tubes dorés a servi au dosage des marqueurs tumoraux dans le sérum. Les échantillons récoltés ont été traités dans les deux heures suivant le prélèvement afin d'éviter la dégradation de l'ARN par les RNases.

5. Lignée cellulaire cancéreuse

La mise au point de la méthode de dosage par RT-PCR a été réalisée à partir de la lignée cellulaire MCF7. Ce sont des cellules épithéliales d'origine mammaire issue en 1970 d'une femme caucasienne de 69 ans. Cette lignée cancéreuse adhérente est différenciée et elle exprime de façon endogène deux formes du récepteur aux œstrogènes, RE α et RE β . Cette lignée est utilisée dans plusieurs laboratoires de recherche dans les études *in vitro* du cancer du sein.⁹⁰⁻⁹² La courbe standard est produite par une dilution sériée de l'ADNc synthétisé à partir de l'ARN de cellules MCF7.

6. Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN total des échantillons a été faite d'une façon uniforme et stérile pour tous les sujets en utilisant la même trousse commerciale « Qiamp RNA Blood Mini Kits » et en suivant les instructions du manufacturier.

Un volume de 3 ml de sang a été homogénéisé dans 20 ml de tampon de lyse de globules rouges (Tampon EL). Après une incubation sur glace de 20 minutes et une centrifugation de 10 min (à une vitesse de 1500 RPM), le culot a été suspendu dans le même tampon de lyse. La solution a été incubée 20 minutes sur glace et centrifugée pendant 10 min à 1500 RPM une deuxième fois. Le culot cellulaire obtenu a été reconstitué dans une solution de lyse de globules blancs (Tampon RLT), à laquelle est ajouté du Beta-mercaptoéthanol pour stabiliser l'ARN. L'homogénéisation du lysat obtenu a été faite par une brève centrifugation de la colonne QIAshredder de la trousse. Ensuite l'addition de l'éthanol 70 % permettra la liaison de l'ARN à la membrane de la colonne. L'ajout d'une DNase (30 K unit de DNase dissoute dans 10 μ l d'eau et 70 μ l de tampon RDD) assure la digestion de l'ADN génomique qui

peut contaminer l'ARN total. Trois étapes de lavage des contaminants en utilisant les tampons RW1 et RPE et une étape d'éluion de l'ARN pur dans l'eau sans RNase suivent ce processus.

La pureté de l'ARN a été déterminée par le ratio des absorbances à 260nm / 280nm après une calibration du spectrophotomètre ultrospec3100 (BIOCHEM- England). Un ARN pur accepté présente un ratio A260/A280 entre 1,9 et 2,1.

La concentration en ARN total (ARN_{tot}) a été calculée en tenant compte de l'absorbance à 260nm et de la dilution effectuée dans l'eau pour la lecture des densités optiques.

Une quantité de 200 ng d'ARN est marquée au bromure d'éthidium et déposée sur un gel d'agarose 1% afin de vérifier l'intégrité de l'ARN_{tot} extrait. La migration a été faite à 90 V pendant 35 min. La présence de deux bandes correspondant aux composantes 18S et 28S de l'ARN ribosomal, visualisées par ultra violet UV, confirme l'intégrité de l'ARN purifié.

7. La transcription inverse

Une quantité de 150 ng d'ARN_{tot} des échantillons ou des standards est mélangée avec des hexamères randomisées pour générer des ADN complémentaires (ADNc). La synthèse des ADNc est effectuée dans un volume total de 20 µl en utilisant 50 µM d'hexamères, 40 U d'inhibiteur RNase, 200 U de l'enzyme transcriptase inverse M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus), 50 mM de Tris HCl, 75 mM de KCl, 3 mM du MgCl₂, 10 mM du dithiothreitol et 50 mM de dNTP. Un contrôle négatif qui contient de l'eau au lieu de l'ARN a été ajouté à cette étape pour exclure les contaminations.

Tous les échantillons ont été incubés sur le thermocycleur PTC 100 (Bio Rad) 60 minutes à 42°C. La réaction est inactivée à 99°C pendant 5 minutes. Finalement les échantillons ont été refroidis à 4°C. Les ADNc des échantillons obtenus sont utilisés pour la PCR ou conservés à 4°C pour une utilisation ultérieure.

8. La PCR en temps réel

Un volume de 4 µl d'ADNc des échantillons obtenus par RT a été ajouté au mélange réactionnel de 20 µl comportant les amorces (tableaux 1,2), du MgCl₂, de la Taq polymérase Expand High Fidelity (Roche), des dNTP et 2 µL de SYBR Green I Mix (Roche). Les mélanges réactionnels sont analysés par PCR en temps réel sur le *Light Cycler* (Roche diagnostics). Les concentrations finales des réactifs de PCR et des conditions des cycles d'amplification varient pour chacun des marqueurs et sont résumés dans la section « Résultats ».

9. Électrophorèse sur gel

Les produits d'amplification par PCR marqués avec le colorant bromure d'éthidium sont ensuite déposés sur gel d'agarose 3 % pendant 1h15 sous 90V de tension. Pour déterminer le poids moléculaire du fragment amplifié, les bandes sur le gel correspondant à chaque amplicon sont comparées au poids moléculaire du marqueur ADN *amplisize marker* (Bio-Rad).

10. Les valeurs de référence

C'est la valeur établie à partir de la répartition des sujets de référence correspondant à la quantité des ARNm pour 95 % des sujets sains.

11. La spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique du test a été déterminée par la proportion des résultats négatifs chez les sujets sains par rapport aux nombre de sujets sains.

12. La sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique du test a été déterminée par la proportion des résultats positifs chez les patientes atteintes de cancer du sein.

Résultats

1. Mise au point d'un test RT-PCR en temps réel pour le dosage des marqueurs tumoraux

1.1 Choix des marqueurs :

Le choix des marqueurs a été basé sur une revue de la littérature récente et les avancées publiées qui portent sur la pertinence de l'utilisation de ces marqueurs dans un laboratoire clinique pour le suivi de routine des patientes du cancer du sein. Les marqueurs potentiels qui ont été choisis sont la mammaglobine A, les Cytokératines 7, 19 et 20, la maspine, la C-Met, le CEA, la CD44v6, la CD146, la β hCG et HER2.

Les deux marqueurs CK19 et HER2 présentait les profils optimisés les plus stables avec moins de variations après les tests d'amplification. D'où leur priorisation pour le reste de ce projet.

1.2 Choix du gène constitutif (*Housekeeping gene*) :

Les gènes constitutifs sont un groupe de gènes qui codent pour des protéines dont la fonction est essentielle à la viabilité de la cellule. Ils ont une expression ubiquitaire et stable quels que soient les tissus, les individus ou les conditions expérimentales. En utilisant un gène constitutif comme contrôle dans le protocole expérimental, son expression permettra de refléter la quantité et la qualité de l'ARN et aussi l'efficacité de la RT-PCR.⁹³ La β -actine est parmi les gènes utilisés dans les études sur le cancer du sein.

La β -actine est une des six protéines d'actine. C'est un gène hautement conservé. Il est impliqué dans la mobilité, la structure et la

motilité de la cellule. Le choix de la β -actine comme gène constitutif a été fait à partir des données publiées dans des études sur le cancer du sein.^{94, 95}
⁹⁶ L'intégrité de l'ARN de tous les échantillons de patientes et de références a été vérifiée sur gel d'agarose 3 % par la présence du fragment de la β -actine.

1.3 Choix des amorces :

Le tableau 1 comporte les séquences d'amorce des marqueurs choisis et leurs caractéristiques. Le tableau 2 montre plusieurs couples d'amorces de la mammaglobine A qui ont été testés. Les séquences d'amorces utilisées pour chaque marqueur ont été prises dans la littérature, sans aucune modification.

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées pour chacun des marqueurs étudiés

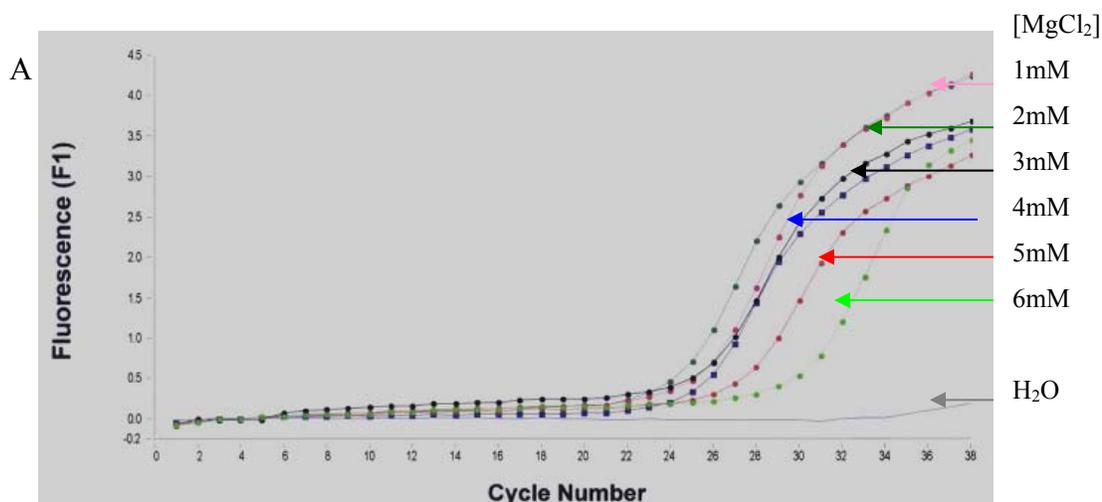
| Marqueur | séquence Sens 5'-3' | séquence Anti Sens 5'-3' | Fragment bp | Réf |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------|
| CD44v6 | TCC AGG CAA CTC CTA GTA GT | CAGCTGTCC CTG TTG TCG AA | 129 | 97 |
| MASPINE | CTA CTT TGT TGG CAA GTG GAT GAA | ACT GGT TTG GTG TCT GTC TTG TTG | 90 | 98 |
| HER2 | CAA CCA AGT GAG GCA GGT CC | AGA GGC TGC GGA TTG TGC GA | 205 | 99 |
| c-met | CAG ATG TGT GGT CCT TTG | ATT CGG GTT GTA GGA GTC T | 129 | 100 |
| CK 20 | TCT TTG ATG ACC TAA CCC TAC A | ATT GAC AGT GTT GCC CAG AT | 137 | 70 |
| CK19 | CAT GAA AGC TGC CTT GGA AGA | TGA TTC TGC CGC TCA CTA TCA G | 138 | 69 |
| CK7 | TGA ATG ATG AGA TCA ACT TCC TCA G | TGT CGG AGA TCT GGG ACT GC | 75 | 69 |
| CEA | TAA GTG TTG ACC ACA GCG ACC C | GTT CCC ATC AAT CAG CCA AGA A | 167 | 69 |
| CD146 | CCA AGG CAA CCT CAG CCA TGT C | CTC GAC TCC ACA GTC TGG GAC GAC T | 437 | 101 |
| β hCG | CTA CTG CCC CAC CAT GAC CC | TGG ACT CGA AGC GCA CAT C | 92 | 102 |

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour la mammaglobine

| Séquence sens 5' 3' | Séquence Anti sens 5' 3' | AMPLICON bp | Réf |
|--|--|------------------------|------------|
| GAG TTC ATA GAC GAC AAT GCC | CCG TAG TTG GTT TCT CAC CAT | 199 | 103 |
| GCG GCT TCC TTG ATG CTTG | GAA AGA GAA GGT GTG GTT TGC | 423 | 104 |
| CAC CGA CAG CAG CAG CCT | AGT TCT GTG AGC CAA AGG TCT | 334 | 104 |
| CCA TGA AGT TGC TGA TGG TC | TCA GAG TTT CAT CCG TTT GG | 225 | 105 |
| CGG ATG AAA CTC TGA GCA ATG T | CTG CAG TTC TGT GAG CCA AAG | 108 | 69 |
| AGC ACT GCT ACG CAG GCT CT | ATA AGA AAG AGA AGG TGT GG | 335 | 95 |
| CAA TCA ATC CAC AAG TGT CTA A | AAC ATG TAT AGC AGG TTT CAA C | 328 | 83 |
| ACG GAT GAA ACT CTG AGC AAT G | CAG TTC TGT GAG CCA AAG GT | 106 | 83 |
| GAA GTT GCT GAT GGT CCT CAT GCT GGC | CTC ACC ATA CCC TGC AGT TCT GTG AGC | 325 | 106 |
| CTC CCA GCA CTG CTA CGC AGG CT | CAC CTC AAC ATT GCT CAG AGT TTC ATC CG | 201 | 106 |

1.4 Détermination de la concentration de $MgCl_2$

Le chlorure de magnésium joue un rôle important et crucial dans une réaction PCR. En fait il aide à promouvoir les interactions ADN/ADN et agit avec les dNTP comme cofacteur pour la polymérase.^{107, 108} La quantité de $MgCl_2$ ajoutée dans une réaction PCR n'est pas consommée mais la réaction ne peut pas avoir lieu en son absence. On peut donc le décrire comme catalyseur de la PCR.¹⁰⁸ Les PCR des marqueurs ont été effectués en variant les concentrations de $MgCl_2$ de 1 à 6 mM. Le choix de la concentration adéquate à la technique a été basé sur le profil des courbes de fusion et d'amplification pour chaque marqueur. Plus les pics sont filiformes et ont une intensité élevée, plus le profil du marqueur est optimal. (Figure10)



B

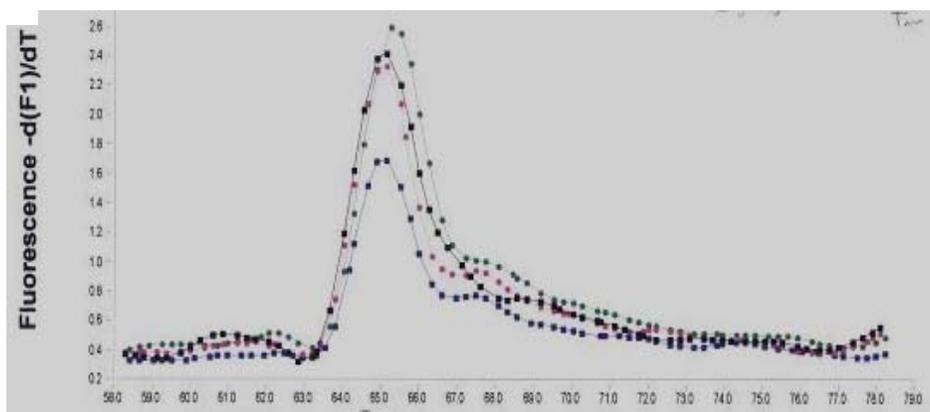


Figure 10 : Courbe d'amplification A) et de fusion B) pour un couple d'amorces de la mammaglobine en titrant les concentrations de $MgCl_2$. ($[MgCl_2]_{op}=3mM$). La concentration de $MgCl_2$ choisie pour chaque marqueur est utilisée dans le reste de l'optimisation des PCR (Tableau 3)

1.5 Détermination de la concentration des amorces et de la quantité de la Taq polymérase

La concentration des amorces a été testée entre 0,1 et 0,8 μM et la quantité de la Taq polymérase a variée de 0,5 U à 4,9 U pour chacun des marqueurs. Comme pour la titration de $MgCl_2$, la concentration des amorces et de l'enzyme qui correspond aux courbes d'amplification et de fusion les plus optimales pour chaque marqueur ont été sélectionnées pour le reste de la technique. Les concentrations finales sont résumées dans le tableau 3. La spécificité de l'amplicon obtenu après le test est vérifiée sur gel d'agarose 3 % *via* le poids moléculaire du fragment du gène.

Tableau 3 : Conditions expérimentales des marqueurs après optimisation de la PCR

| Marqueur | T° appariement | [MgCl ₂] mM | [AMORCES] μM | TAQ U | Nb de cycles | T° fusion C° |
|----------|-------------------|----------------------------|-----------------|----------|--------------|-----------------|
| MA SPINE | 66 | 4 | 0,8 | 4 | 40 | 79 |
| CK19 | 60 | 3 | 0,6 | 4 | 40 | 89 |
| CK7 | 64 | 4 | 0,8 | 3 | 40 | 82 |
| CEA | 60 | 2 | 0,4 | 4 | 40 | 86 |
| CD44 | 60 | 3 | 0,8 | 4 | 40 | 83 |
| C-met | 58 | 3 | 0,8 | 4,9 | 40 | 82 |
| HER2 | 60 | 3 | 0,6 | 4 | 40 | 89 |
| CK20 | 60 | 4 | 0,8 | 4,9 | 40 | 82 |
| β hCG | 60 | 3 | 0,8 | 4,9 | 38 | 90 |

Le choix des marqueurs finaux à étudier a été fait au fur et à mesure de leurs amplifications et leurs profils optimisés (Figure 11). La vérification du poids moléculaire des fragments obtenus est faite par électrophorèse sur gel d'agarose 3 %.

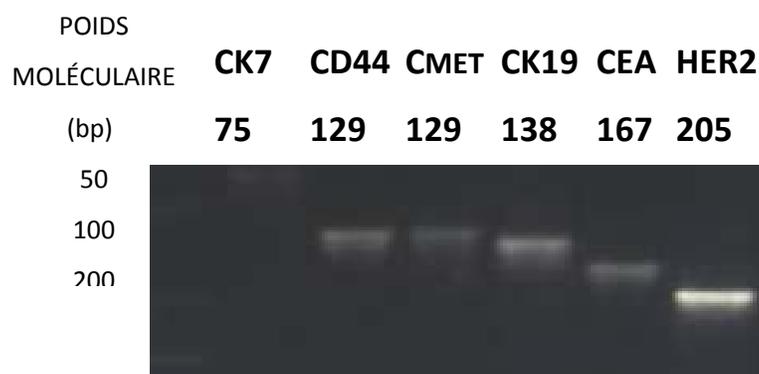


Figure 11 : Gel d'agarose 3% des marqueurs après optimisation de la PCR

Les séquences d'amorces de mammaglobine (tableau 2) ont été testées à maintes reprises mais l'optimisation des réactions PCR n'a pas abouti à des résultats concluants. Nous n'avons pas réussi à avoir des profils d'expression significatifs qui pourraient être utilisés ultérieurement. Ce qui explique l'absence du gène de la mammaglobine dans la figure 11 et dans le tableau 3.

2. Caractéristiques des sujets de référence et des patientes recrutés

En tenant compte des critères d'inclusion et d'exclusion dans le recrutement des sujets pour cette étude, les données statistiques et les caractéristiques clinico-pathologiques sont regroupées dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4 : Caractéristiques des sujets de référence

| Age 18-35 | Nombre |
|------------------|---------------|
| <30 | 24 |
| ≥30 | 26 |
| Sexe | |
| homme | 12 |
| femme | 38 |

Tableau 5: Caractéristiques cliniques des patientes

| Caractéristiques | N° de patiente (%) |
|----------------------------|---------------------------|
| Nombre de patientes | 90 |
| Age | 27-81 |
| Stade clinique | |
| I | 31(34) |
| II | 19 (21) |
| III et + | 40 (44) |
| Récepteurs PR | |
| Positif | 57(63) |
| Négatif | 16(17) |
| Inconnu* | 17(18) |
| Récepteurs ER | |
| Positif | 60(66) |
| Négatif | 13(14) |
| Inconnu* | 17(18) |
| Statut HER2 | |
| Positif | 13(14) |
| Négatif | 61(67) |
| Inconnu* | 16(17) |

NB les statuts des récepteurs positifs ou négatifs sont confirmés par des rapports de pathologie

* inconnu : statut non déterminé dans le dossier clinique

3. Détermination de la sensibilité et la spécificité diagnostique

3.1 Valeur de référence établie pour l'ARNm de la CK19

L'expression de l'ARNm de la CK19 a été évaluée dans les échantillons des sujets de références et des patientes avec cancer du sein. Les concentrations en ARN sont obtenues par une analyse RT-PCR en temps réel. La quantification de la CK19 est faite par le logiciel intégré de l'appareil *Light Cycler* (Roche, diagnostics). Les taux d'ARNm varient entre le groupe des sujets de référence et les groupes de patientes avec cancer du sein. Les valeurs de la [ARNm] pour les sujets de références se situent entre 0 et 400 pg/ μ l, tandis que la [ARNm] pour les patientes avec cancer du sein varie entre 0 et 900 pg/ μ l.

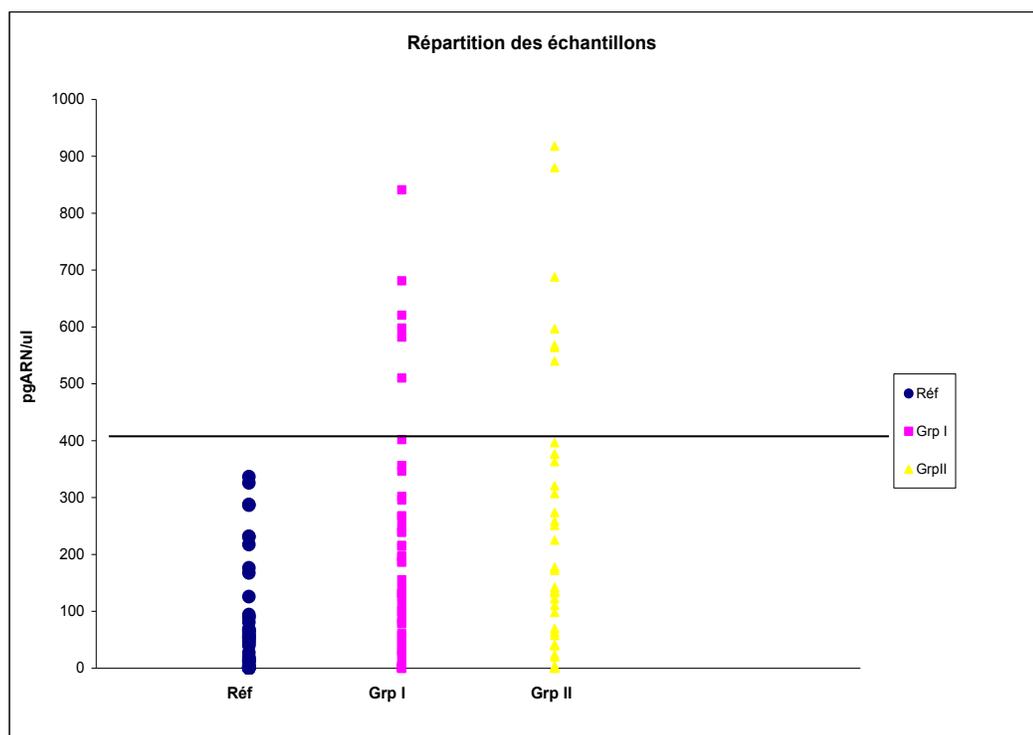


Figure 12 : Répartition des sujets références, GrI et GrII pour l'ARNm de la CK19.

En premier lieu, une courbe de calibration préparée à partir d'une dilution sériée de standard de cellules MCF7 a été faite. En deuxième lieu, les concentrations sont calculées par le logiciel intégré du *Light Cycler* après la RT-PCR en temps réel à partir de la courbe standard. Les concentrations obtenues de l'ARNm de la CK19 chez les sujets références sont situées entre 0 et 400pg/ μ l.

Considérant ces résultats de quantification, le seuil de positivité à la CK19 est établi à 400pg d'ARN/ μ l (barre horizontale dans la figure 12). Tous les sujets qui dépassent cette limite sont définis alors comme positifs à la CK19 (Tableau 6).

Tableau 6 : Pourcentage de présence de l'ARNm de la CK19 dans la cohorte

| Sujets | N/N_{total} | % |
|---------------|----------------------------|----------|
| Réf | 0/50 | - |
| GrI | 5/50 | 10 |
| GrII | 17/40 | 34 |

3.2 Calcul de la sensibilité et de la spécificité

Tel que mentionné plus haut, la spécificité diagnostique est la proportion des résultats négatifs chez les sujets sains par rapport aux nombre de sujets sains et la sensibilité diagnostique du test est la proportion des résultats positifs chez les patientes atteintes de cancer du sein.

La sensibilité diagnostique de la quantification de l'ARNm de la CK19 chez toutes les patientes du cancer du sein a été de 43 % (tableau 7). La spécificité de ce

test chez 50 sujets sains a été de 100 % en tenant compte de la valeur seuil établie et obtenue plus haut à partir de la répartition des échantillons des trois groupes.

Tableau 7 : La sensibilité et la spécificité de la quantification de la CK19 chez les sujets de l'étude

| Patientes(N) | Références(N) | Sensibilité | Spécificité |
|---------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| 90 | 50 | 43 % | 100 % |

La spécificité et la sensibilité obtenues pour l'ARNm de la CK19 sont comparables à la littérature. Vu le nombre limité de sujets testés dans ce projet, la conclusion quant à la performance de la quantification de l'ARNm de la CK19 en milieu clinique, reste à approuver par les différentes études de grande envergure.

3.3 Valeur de référence établie pour le HER2

Tel que décrit pour la CK19, les conditions optimales de l'expérience ont aussi été utilisées pour la quantification de l'ARNm de HER2 chez les sujets références et les patientes du cancer du sein. Le seuil de positivité a été calculé en tenant compte des résultats du dosage de l'ARNm de HER2 dans le groupe de sujets de références (figure13). Le taux d'expression de l'ARNm de HER2 chez les sujets de références varie entre 0 et 100 pg d'ARN/ μ l, alors que les valeurs pour les patientes du groupe I et II se situent entre 0 et 370 pg d'ARN/ μ l. Le seuil de positivité de l'ARNm de HER2 a été fixé à 100 pg d'ARN/ μ l (barre horizontale).

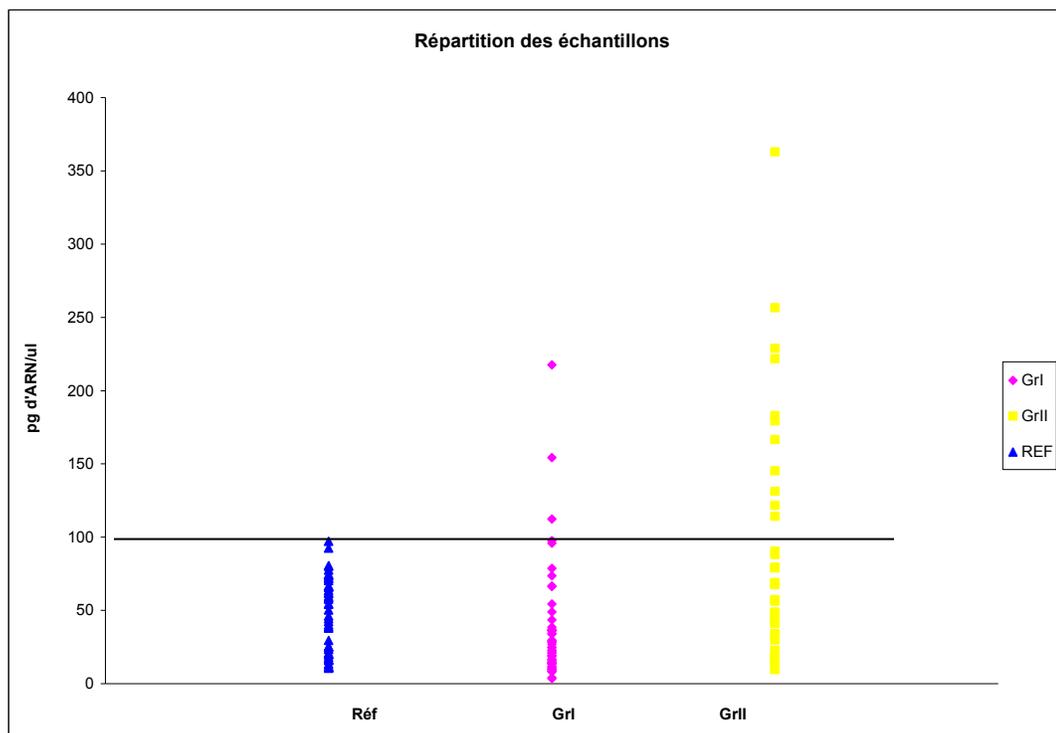


Figure13: Répartition des sujets références, GrI et GrII pour le HER2.

À partir du seuil de positivité déterminé, les sujets positifs au HER2 dans le groupe I représentent seulement 6% des 50 patientes au stade primaire alors que chez les patientes du groupe II, 25% sont positives au HER2.

Tableau 8 : Pourcentage de présence de l'ARNm de HER2

| Sujets | N/N Total | % |
|--------|-----------|----|
| Réf | 0/50 | - |
| GrI | 3/50 | 6 |
| GrII | 10/40 | 25 |

3.4 Calcul de la sensibilité et de la spécificité

La sensibilité et la spécificité diagnostique ont été calculées pour l'ARNm de HER2. Dans une cohorte de 90 patientes atteintes du cancer du sein, le pourcentage des résultats positifs est de 17 % tandis qu'une spécificité obtenue de 100 % a été calculée à partir de la proportion des sujets positifs chez les 50 sujets références.

Tableau 9: La sensibilité et la spécificité de la quantification de l'ARNm de HER2

| Patientes(N) | Références(N) | Sensibilité | Spécificité |
|--------------|---------------|-------------|-------------|
| 90 | 50 | 17 % | 100 % |

4. Comparaison des résultats du test RT-PCR avec le dosage immunologique actuel des marqueurs CA15.3 et CEA

La comparaison a été faite entre les résultats obtenus par quantification RT-PCR en temps réel et les taux sérique des marqueurs tumoraux CA15.3 et CEA, utilisés actuellement pour le suivi de routine des patientes de cancer du sein.

Le dosage immunologique des marqueurs a été réalisé sur l'analyseur E170 (Roche, diagnostics) dans le laboratoire regroupé du département de biochimie de l'hôpital Saint-Luc du CHUM. Tous les contrôles de qualité et les calibrations sont faits quotidiennement sur cet appareil. Pour limiter les facteurs de variations inter-spécimens l'analyse est effectuée dans les mêmes conditions et avec les mêmes contrôles de qualité qui sont validés par le biochimiste clinique responsable.

Les valeurs de références pour l'analyse du CA15.3 se situent entre 0 et 29 KU/l et celles du CEA s'étendent entre 0 et 7 µg/l. En tenant compte de ces valeurs, le dosage de ces marqueurs chez les 90 patientes du cancer du sein a montré que 28% des patientes ont un taux élevé de CA15.3 et que 9 % de patientes ont un taux élevé de CEA dans le sérum (tableau 10).

Tableau 10 : Taux sériques des marqueurs CA15.3 et CEA chez les patientes avec cancer du sein

| CA15.3 | (N) | (%) |
|---------------|------------|------------|
| Positif | 25 | 28% |
| Négatif | 57 | 63% |
| Inconnu* | 8 | 9% |

| CEA | (N) | (%) |
|------------|------------|------------|
| Positif | 8 | 9% |
| Négatif | 74 | 82% |
| Inconnu* | 8 | 9% |

*inconnu : spécimen non quantifiable ou non disponible

Afin d'étudier la relation entre l'expression de l'ARNm de la CK19 et l'expression des marqueurs CA15.3 et CEA, nous avons fait la corrélation entre les résultats des quantifications par RT-PCR et les résultats des tests de dosage immunologique des marqueurs. Les dosages ont montré que parmi les 5 patientes du groupe I en stade primaire positives à la CK19, une seule patiente a une élévation du CA15.3 sans exprimer le CEA (tableau 11) Huit patientes ont des taux élevés de

CA15.3 et CEA en stade primaire et n'expriment pas l'ARNm de la CK19. Donc, il ne semble pas y avoir une bonne corrélation entre les résultats de l'expression de l'ARNm de la CK19 et le dosage de CA15.3 et CEA pour le groupe I. Ceci confirme la controverse de l'usage du test immunologique des marqueurs CA15.3 et CEA au stade primaire de la maladie.

Tableau 11: Corrélation de l'ARNm de la CK19 avec CA15.3 et CEA sériques pour les patientes du groupe I

| N | ARNm | CA15.3 | CEA |
|------------|-------------|---------------|------------|
| GrI | CK19 | | |
| 4 | + | - | - |
| 1 | + | + | - |
| 8 | - | + | + |

Le tableau 12 montre que neuf patientes des 17 obtenues positives plus haut pour l'ARNm CK19, présentent aussi un taux élevé du marqueur CA15.3, alors que sept des patientes du groupe II n'ont pas été positives à la CK19 mais exprimaient quand même un taux sérique élevé pour les autres marqueurs dosés. Ceci montre une éventuelle corrélation entre les deux tests au stade métastatique mais avant d'en tirer des conclusions, des études de l'historique clinique de chacune de ces patientes pourraient confirmer la concordance entre les résultats de l'expression de CK19 avec le dosage de CA15.3 et CEA.

Tableau 12: Corrélation de l'ARNm de la CK19 avec CA15.3 et CEA pour les patientes du groupe II

| N | ARNm | CA15.3 | CEA |
|-------------|-------------|---------------|------------|
| GrII | CK19 | | |
| 8 | + | - | - |
| 9 | + | + | - |
| 7 | - | + | + |

Le même test de comparaison a été effectué pour le marqueur HER2. Le tableau 13 montre que les trois patientes positives pour HER2 dans le groupe I n'ont pas un taux élevé des marqueurs CA15.3 et CEA. Tandis qu'au groupe II, parmi les 10 patientes positives au HER2, six d'entre elles ont un taux normal de valeurs sériques (tableau 14). Les tests de corrélation montrent aussi que parmi les patientes qui n'exprimaient pas l'ARNm du HER2, trois patientes ont des taux élevés de CA15.3 et CEA. Donc, il n'y a pas de corrélation évidente entre l'expression de HER2 et les marqueurs CA15.3 et CEA. Par ailleurs, un suivi des données clinico-pathologiques de ces patientes pourrait nous renseigner sur une éventuelle association entre les deux tests pour chaque cas de patientes.

Tableau 13: Corrélation de l'ARNm de HER2 avec CA15.3 et CEA sériques pour les patientes du groupe I

| N | ARNm | CA15.3 | CEA |
|------------|-------------|---------------|------------|
| GrI | HER2 | | |
| 3 | + | - | - |

Tableau 14: Corrélation de l'ARNm de HER2 avec CA15.3 et CEA sériques pour les patientes du groupe II

| N | ARNm | CA15.3 | CEA |
|-------------|-------------|---------------|------------|
| GrII | HER2 | | |
| 1 | + | + | + |
| 3 | + | + | - |
| 6 | + | - | - |
| 3 | - | + | + |

5. Comparaison des résultats du test RT-PCR de l'ARNm avec le statut pathologique de HER2

Les biopsies analysées en pathologie des tumeurs des patientes du groupe I et du groupe II sont répertoriées dans les dossiers électroniques disponibles au CHUM. Les résultats du test de la quantification de l'ARNm du HER2 par RT-PCR, comparés à ceux obtenus par biopsie des tumeurs du sein, ont révélé que les patientes positives pour HER2 ont aussi un statut de HER2-positif. Donc la corrélation est positive entre les résultats du test RT-PCR et ceux de la pathologie quant à l'expression du marqueur tumoral HER2.

Discussion

De par leur implication dans le cancer du sein, les CTC sont une cible importante des thérapies pour les patientes avec cancer du sein en stade primaire ou métastatique. Présentes dans le sang des patientes dès les premiers stades de la progression de la maladie³⁷, ces rares cellules présentent un défi associé à leur détection. Il est donc indispensable d'avoir la meilleure méthode de détection pour des traitements plus efficaces et plus confortables aux patientes.

Actuellement, en milieu clinique le suivi du cancer du sein est basé sur la biopsie de la tumeur ou le dosage des marqueurs tumoraux CA15.3 et CEA. La présence des marqueurs tumoraux associés aux CTC dans le sang périphérique qui pourrait simplifier le suivi a été démontrée dans les études de recherche sur certains types de cancer comme le cancer de la prostate, la thyroïde, l'ovaire et le cancer du sein. Au CHUM Saint-Luc le dosage des ARNm de la thyroglobuline est offert par la technique RT-PCR en temps réel. Le dosage des ARNm des marqueurs tumoraux du cancer du sein en milieu clinique n'a pas été amorcé jusqu'à ce jour. La détection de ces marqueurs est faite par *CELL SEARCH*, le seul système approuvé par la FDA.³⁷

La quantification par PCR en temps réel a été décrite comme étant une technique très sensible et spécifique dans la détection de transcrits, menant à son utilisation répandue dans la détection des marqueurs tumoraux messagers pour le suivi des patientes du cancer du sein et la réponse aux thérapies.^{37, 87, 109}

L'hypothèse de départ pour ce projet de recherche était de déterminer la sensibilité et la spécificité d'un test de quantification d'un ou plusieurs marqueurs tumoraux pour le suivi de routine des patientes avec cancer du sein. Quelques marqueurs documentés dans la littérature sont comparés en analysant les expressions de leurs ARNm dans le sang périphérique par PCR en temps réel.

1. Quantification de la CK 19 :

Les cytokératines sont des marqueurs de choix pour la détection des CTC par RT-PCR. Étant donné leurs niveaux d'expression relativement plus élevés dans les tumeurs épithéliales que dans les autres tissus. Le marqueur CK19 est le plus utilisé dans le cancer du sein.^{28, 29, 37, 53} La quantification de l'ARNm de la CK19 doit être en mesure de détecter les cellules tumorales circulantes dans le sang au stade primaire de la maladie avant qu'elles ne s'établissent dans les sites secondaires pour la formation des métastases. Pour se faire, nous avons commencé par mettre au point un test de quantification par RT-PCR en temps réel. La mise au point du test inclut tous les paramètres qui peuvent intervenir dans la réaction PCR. Nous avons commencé par déterminer les bonnes concentrations de MgCl₂, des amorces et des quantités de l'enzyme Taq nécessaires à l'amorçage de la polymérisation. Le profil optimisé de l'expression de l'ARNm de la CK19, observé en temps réel sous forme de courbe d'amplification et de température, était le plus stable et présentait le moins de variation. Ce fût notre premier choix de marqueur à étudier pour le reste du projet.

En vue de déterminer une population adulte à titre de référence, des échantillons de sang périphérique de sujets sains ont été analysés pour avoir une valeur représentative de l'ARNm de la CK19. Aucune des valeurs obtenues de la [ARNm] chez les sujets de référence n'a été supérieure à 400 pg d'ARN/μl (figure 12). Ceci nous a amené à fixer cette concentration comme valeur de référence pour l'analyse RT-PCR de l'ARNm de la CK19. Par ailleurs, la distribution des concentrations d'ARNm de la CK19 chez les patientes du cancer du sein était variable. Les valeurs s'étendaient entre 0 et 900 pg/μl. D'après la répartition établie de tous les échantillons étudiés, une expression plus élevée de la CK19 chez les patientes a été observée par rapport au groupe des sujets de référence.

Dans le groupe I qui se compose de 50 patientes de cancer du sein en stade primaire, cinq patientes sont positives, soit 10 % de l'ensemble de ce groupe. Or la présence de ce marqueur épithélial dans le sang chez un sujet sain. En effet, d'après *Ghossein et al.* L'expression de gènes qui encodent des protéines épithéliales comme les cytokératines ne devrait pas être normalement détectée dans le sang.^{37, 110} Plusieurs observations suggèrent que les cellules tumorales du sein se détachent de la tumeur primaire et circulent dans le sang tôt dans la progression de la maladie.³⁷ Ceci confirme que les CTC peuvent être détectées plus tôt dans le cancer du sein avant l'apparition des métastases. Plusieurs études ont démontré l'utilité de la détection des CTC en stade primaire du cancer du sein parce qu'elle permet de prédire le développement des métastases distantes.^{26, 43, 111} Pour confirmer cette hypothèse, nous avons fait le suivi des patientes du groupe I pour lesquelles la présence de l'ARNm de la CK19 a été observée. Nous avons alors constaté que deux d'entre elles ont développé des métastases dans les deux années suivant le prélèvement. De plus, rappelons que la CK19 est associée à un mauvais pronostic dans le stade primaire du cancer du sein et que des rechutes ont été observées chez des patientes étant positives à la CK19 aux premiers stades de leurs cancers du sein.³² Nous pouvons donc faire le lien entre la littérature et ce que nous avons observés chez les patientes positives du groupe I et confirmer que la quantification de la CK19 pourrait être très utile pour le pronostic des patientes.

Cependant, nous avons examiné particulièrement les trois cas de patientes du groupe I , qui étaient négatives à la CK19, et qui ont développé des métastases dans l'année qui suivit le prélèvement sanguin effectué dans le cadre de ce projet. D'après l'hypothèse de *Ghossein et al.* , les patientes négatives à la CK19 ont une très faible chance de développer des métastases. ^{37, 110} Pourtant, nous avons obtenu trois patientes du groupe I négatives à la CK19 ayant développé des métastases plus tard.

En étudiant le dossier clinique de ces dernières, les examens histologiques en biopsie des tissus du site des métastases distantes ont révélé une différence dans le

type de la tumeur secondaire par rapport au type de la tumeur mammaire. Ces examens sont basés sur les statuts hormonaux des récepteurs présents dans chacune des tumeurs.

Par exemple, une patiente pourrait avoir une tumeur mammaire primaire avec des récepteurs PR et ER positifs et que la biopsie des tissus de la tumeur métastatique distante révèle que ces récepteurs sont négatifs. Ce qui suggère que les cellules de la tumeur primaire pourraient ne pas être à l'origine de la tumeur secondaire. Étant donné que la patiente présentant une tumeur mammaire primaire épithéliale et que cette patiente a développé une tumeur distante d'origine non épithéliale, cette dernière pourrait ne pas avoir de lien avec la tumeur primaire. D'où l'absence de l'ARNm de la CK 19 (marqueur épithélial) dans la circulation sanguine.

Dans ce cas la quantification simultanée de différents types de marqueurs tumoraux pourrait augmenter la chance de détecter les CTC chez les patientes avant l'établissement de leur diagnostic de rechute. Le cancer du sein, qui regroupe plusieurs types de cancers mammaires, est composé d'un ensemble hétérogène de cellules. Donc, l'identification d'un groupe de marqueurs, comparativement à la mesure d'un seul, pourrait ainsi maximiser la sensibilité diagnostique. Plusieurs études suggèrent l'utilisation d'une combinaison de marqueurs tumoraux afin d'augmenter les chances de détecter les CTC exprimant des différents marqueurs. Ces publications ont montré qu'un essai combinant deux marqueurs ou plus favorisait la détection optimale des cellules malignes dans la circulation. Par exemple, le groupe de *Chen et al.* a montré que le test de quantification des 3 marqueurs CK19, CEA et Mammaglobine en combinaison a permis d'augmenter la spécificité et la sensibilité chez les patientes de cancer du sein.¹⁰⁶

Dans le groupe II, 17 patientes étaient positives à la CK19. Rappelons que le prélèvement des patientes du groupe II était fait sans tenir compte que ces patientes

aient eu des traitements de chimiothérapies ou non. En ayant des cycles de chimiothérapies, l'absence des marqueurs tumoraux dans le sang est fort attendue.

Or, parmi ce groupe, 14 patientes ont eu de la chimiothérapie avant le prélèvement sanguin, elles ont été positives tout de même à la CK19. Nous nous remettons donc en question l'efficacité et le délai de la réponse au traitement par chimiothérapie.

Lors de l'administration des régimes chimiothérapeutiques, le suivi de la réponse de la tumeur est fait par l'imagerie ou par dosage des enzymes hépatiques selon les lignes directrices de l'ASCO. Cependant, il n'est pas recommandé de se fier aux taux sériques des marqueurs CA15.3 et CEA à cause de leur délai de réponse. En effet, environ 20 % des patientes ayant répondu positivement à leurs traitements de chimiothérapies, ont des taux sériques des CA15.3 et CEA élevés après un ou deux mois du début de l'administration de la médication. Cela peut être dû à la libération des antigènes par cytolyse.^{112, 113} Les patientes, au cours de leurs cycles de traitements, peuvent avoir plusieurs symptômes maladifs. Par contre, ces symptômes ne peuvent renseigner sur la progression de la maladie ou la réponse au traitement. En général, les praticiens ne peuvent se fier seulement aux symptômes maladifs. Chez la moitié des patientes de cancer du sein, ces symptômes peuvent être confondus à une toxicité du traitement ou des causes bénignes. Il va de dire qu'une information efficace et rapide sur l'état de la progression de la maladie est d'une grande importance à ce stade. Ceci appuie donc notre hypothèse qu'un test de quantification d'un marqueur tumoral pourrait rajouter une information clinique quant à la présence des CTC dans le sang au cours ou après d'un traitement. En conclusion, nous suggérons que les patientes positives à la CK19 quantifiée pendant leurs traitements nous renseignent plus sur leurs états de maladie et ont plus de chance d'être réorientées vers d'autres régimes efficacement et rapidement avant de subir la totalité des cycles de chimiothérapie avec tous les effets secondaires connus.

Ensuite, nous avons évalué le pourcentage de sensibilité de ce test. Rappelons que la sensibilité est le ratio du nombre des résultats positifs chez les patientes par rapport à toute la cohorte. La sensibilité obtenue chez les patientes du groupe I et II est de l'ordre de 43 %. Dans une étude publiée en 2010 par l'équipe de *Chen et al.*, la sensibilité de la CK19 était 20 % dans le groupe de patientes de cancer du sein primaire et de 17 % dans un groupe de patientes métastatiques soit en totale 40 % dans toute la cohorte.¹⁰⁶ L'équipe grecque qui a breveté la méthode de quantification de la CK19 par RT-PCR chez les patientes de cancer du sein a obtenu une sensibilité de 31 % pour 77 patientes en stade primaire et 5 % pour des patientes en stade avancé soit 36 % pour tous les groupes de patientes atteintes.⁵³ Ce qui nous permet de dire que nos résultats sont comparables aux autres études publiées sur le même sujet. Nous avons calculé une spécificité de 100 % qui est aussi comparable aux autres spécificités des analyses des deux groupes cités ci haut soient 90 % et 98 % respectivement.

2. Comparaison du test RT-PCR pour la CK19 avec le dosage immunologique de CA15.3 et CEA

Après avoir mis au point le test RT-PCR pour la quantification de la CK19, nous avons comparé les résultats obtenus pour les patientes avec le dosage immunologique des marqueurs tumoraux CA15.3 et CEA actuellement offert en clinique. Le dosage des marqueurs tumoraux du cancer du sein CA15.3 et CEA s'effectue sur l'appareil E170 (Roche, Diagnostics) au laboratoire de biochimie au CHUM. Dans le groupe I, 4 patientes positives à l'ARNm de la CK19 ont un taux normal de CA15.3 et CEA. Le suivi des cas de ces patientes nous a révélé que deux d'entre elles ont développées des métastases au cours de l'année qui suit le prélèvement. Ce qui nous amène à conclure, malgré le fait que les marqueurs donnaient un taux normal dans le sang, les patientes pourraient être en rechute. Dans ce cas, le dosage des marqueurs ne permettait pas de renseigner sur le pronostic. D'où l'utilité de la quantification de l'ARNm de la CK19 comme facteur pronostique

comparant au dosage sériques non prédictif de l'évolution de la maladie. En ce qui concerne le groupe II, une bonne corrélation est obtenue entre l'expression de l'ARNm de la CK19 et le taux sérique des CA15.3 et CEA. En effet, 58 % des patientes positives à la CK19 sont positives aussi aux marqueurs CA15.3 et CEA. Ce qui montre que l'analyse par RT-PCR corrèle avec le dosage des marqueurs tumoraux pour le suivi des patientes en phase métastatique. Le manque de sensibilité et le délai de réponse des marqueurs immunologiques pourraient expliquer les 42 % du non concordance entre les deux analyses.

3. Statut HER2 de la tumeur :

Le statut de HER2 est important dans la classification du type de cancer du sein chez une patiente. Plusieurs méthodes disponibles pour la détermination de ce statut soit par l'analyse du gène (par microscopie ou PCR) soit par l'analyse immunohistochimique de la protéine. Les cancers du sein métastatiques avec HER2 surexprimé représentent 20 à 30 % des cancers du sein. La concordance entre le statut de HER2 de la tumeur primaire et du site des métastases est de 80 à 100 % selon les méthodes d'analyses utilisées. Généralement, le statut HER2 des métastases est demandé lorsque celui ci n'est pas disponible pour la tumeur primaire ou que les analyses par FISH sont douteux. Au diagnostic initial, il existe une corrélation entre la surexpression de HER2 et les caractéristiques du cancer (grade histologique III, type histologique canalaire ou infiltrant...).¹¹⁴

Dans le but de déterminer la corrélation entre l'expression du marqueur tumoral et le stade du cancer des patientes des groupes I et II, la quantification de l'ARNm de HER2 et la comparaison avec les marqueurs sériques ont été effectués dans cette partie du projet.

D'après la quantification de l'ARNm de HER2 dans les échantillons de sang, une expression plus élevée de HER2 chez les patientes a été observée que chez le groupe des sujets de référence.

Dans le groupe I, 3 patientes obtenues positives soit 6% des 50 patientes au stade primaire du cancer du sein. D'après la littérature, nous nous attendions à avoir un statut de HER2 qui corrèle avec l'analyse de quantification. Les patientes de ce groupe ayant l'ARNm de HER2 négatif ont le statut hormonal négatif aussi.

Les données clinico-pathologiques des trois patientes positives à l'ARNm de HER2 dans le groupe I ont montré que les cancers du sein de ces patientes sont aussi HER2 positif (surexpression de HER2 de la tumeur mammaire primaire). Ce qui montre la corrélation entre la quantification de l'ARNm par RT-PCR et le statut de HER2 des tumeurs du sein.

Chez les patientes métastatiques du groupe II, nous avons eu 10 patientes qui ont un taux élevé de l'ARNm de HER2 soit 25 % du groupe. En pathologie, les types des tumeurs de ces patientes sont confirmés par examen de coloration des tissus tumoraux mammaires. Ces patientes ont un cancer du sein HER2+. Ce qui démontre la concordance entre la détection de l'ARNm de HER2 dans le sang et le statut HER2+ chez les patientes du groupe II.

4. Comparaison du test RT-PCR pour le HER2 avec le dosage immunologique de CA15.3 et CEA

Afin de comparer nos résultats de quantification sur le light cycler avec le dosage immunologique, nous avons dosé le taux des marqueurs tumoraux CA15.3 et CEA dans le sérum.

Les trois patientes du groupe I positives à l'ARNm du HER2 ont eu un taux normal de CA15.3 et CEA. Les données cliniques de ces patientes montrent qu'elles ont un cancer du sein de type HER2+ donc cela ne nous permettra pas de faire un lien entre la présence de HER2 dans le sang en stade primaire et le risque de développement de métastases. Dans le groupe II, nous avons obtenu 6 patientes métastatiques qui étaient positives à l'ARNm de HER2 mais négatives aux deux autres marqueurs CA15.3 et CEA. Il a été démontré que la surexpression de HER2 reste stable après la

chimiothérapie.¹¹⁵ Ceci explique pourquoi nous avons obtenu des patientes métastatiques avec des taux normaux des marqueurs CA15.3 et CEA mais présentent toujours une surexpression de l'ARNm de HER2. La prise en charge des patientes ayant un cancer du sein HER2+ a été améliorée dès l'arrivée sur le marché du Trastuzumab (herceptin) en 1999. Il s'agit d'un anticorps monoclonal qui permet de bloquer le récepteur HER2 responsable de la prolifération incontrôlée des cellules. Il peut être administré seul ou avec chimiothérapie. Jusqu'à ce jour il n'a pas été démontré s'il existe un lien entre les tumeurs primaires HER2+ et les tumeurs secondaires chez les femmes traitées par Trastuzumab en même temps qu'une chimiothérapie. Nous suggérons donc de détecter les CTC par la quantification de HER2 chez les patientes de cancer du sein métastatique traitées par Trastuzumab pour savoir s'il y a un lien entre la tumeur mammaire primaire et les métastases développées chez ces patientes.

La sensibilité calculée pour le HER2 a été de 17 % chez les 90 patientes. D'après la littérature, la quantification de ce marqueur a atteint 68 % de sensibilité dans une cohorte de 182 patientes¹⁰⁵ et de 46 % chez un groupe de 156 patientes ayant les données cliniques semblables à celles élaborées dans ce projet.⁸⁰ Il est évident que la sensibilité obtenue est inférieure à celles publiées dans les autres études. Par contre, nous avons obtenu une spécificité de 100 %, supérieure à la spécificité de 73 % obtenue par le groupe de *Chen et al.* et au 90% obtenue par *XU et al.* Éventuellement, l'utilisation suggérée de combinaison de marqueurs pourrait augmenter la sensibilité du test de quantification de l'ARNm de HER2 pour la détection de cellules tumorales circulantes pour le cancer du sein. Il nous semble évident que l'hétérogénéité des types de cancers du sein dans ce projet incluant le type HER2+ pouvait influencer nos résultats d'où l'importance du dosage de ce marqueur pour chaque type de cancer du sein afin de faire l'association entre l'expression de l'ARNm et le type de la tumeur mammaire.

Conclusion et perspectives

Globalement nous avons montré que l'utilisation des transcrits des marqueurs présente beaucoup de potentiel dans le diagnostic du cancer du sein. Ceci permet d'envisager une nouvelle piste pour le suivi de routine des patientes sans passer aux méthodes invasives comme la biopsie.

Tout d'abord, du côté expérimental, la mise au point de la technique RT-PCR en temps réel a été effectuée pour les marqueurs CK19 et HER2. Toutefois, selon les lignes directrices pour le suivi du cancer du sein, la détection des CTC ne doit pas influencer la décision du choix de traitement.

Du côté théorique, on a conclu, à partir de l'analyse des résultats, que la présence de la CK19 ou de HER2 corrèle avec les données cliniques des patientes. Cette corrélation positive entre l'expression des marqueurs et le stade clinique de la maladie attribuerait à la fois un aspect diagnostique et pronostic quant à leur utilisation comme biomarqueurs de suivi. La quantification de la CK19 a été réussie. En effet, la sensibilité obtenue est comparable à celle de la littérature récente obtenue par les autres groupes de recherche. La comparaison de notre analyse au dosage immunologique de CA15.3 et CEA, présentement offert en clinique, a révélé que la sensibilité obtenue par le test RT-PCR est meilleure chez les patientes de cancer du sein métastatique. Toutefois, l'un des inconvénients des marqueurs sériques CA15.3 et CEA est le grand délai de réponse au traitement. Donc pour les patientes en stade précoce, pas de conclusions à tirer quant à la variation des taux de ces marqueurs durant leurs traitements car seul un prélèvement est dosé pour chaque patiente dans ce projet. Il serait important donc de modifier le protocole de base pour avoir plusieurs prélèvements sanguins. Dans cette étude, le groupe II des patientes métastatiques a été hétérogène et le prélèvement n'a pas été effectué dès la détection de récurrence chez ces patientes. L'idéal, serait d'effectuer les prélèvements sanguins des patientes dès leur diagnostic de rechute.

Les projets de collection de tissus pour des banques de tumeurs de sein permettront de phénotyper prochainement les cancers du sein. Il serait pertinent de faire la corrélation entre le type de la tumeur mammaire et l'expression des marqueurs

au cours de la maladie. Dans des travaux futurs, plusieurs combinaisons potentielles de marqueurs tumoraux seraient testées pour confirmer leur efficacité dans la détection précoce et préventive des CTC. Bien entendu, ce mémoire consiste en étude préliminaire et il faudra associer chaque profil de marqueur à un type de tumeur mammaire donné afin d'offrir un jour une thérapie «à la carte».

Bibliographie:

1. cancer cddscd. Statistiques canadiennes sur le cancer 2010.
2. de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WT, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, et al. Genes other than brca1 and brca2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet.* 2002;39:225-42.
3. [Www.cancer.ca](http://www.cancer.ca).
4. Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: Progress and promise. *Science.* 2011;331:1553-8.
5. Igbokwe A, Lopez-Terrada DH. Molecular testing of solid tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135:67-82.
6. Palazzo A, Iacovelli R, Cortesi E. Past, present and future of targeted therapy in solid tumors. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10:433-61.
7. H O. Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation — a hypothesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2000;74:345-50.
8. Vineis P, Schatzkin A, Potter JD. Models of carcinogenesis: An overview. *Carcinogenesis.* 2010;31:1703-9.
9. Walters S, Maringe C, Butler J, Brierley JD, Rachet B, Coleman MP. Comparability of stage data in cancer registries in six countries: Lessons from the international cancer benchmarking partnership. *Int J Cancer.* 2012:n/a-n/a.
10. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:563-72.
11. Ledford H. Cancer theory faces doubts. *Nature.* 2011;472:273.
12. Hunter K, Crawford N, Alsarraj J. Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Research.* 2008;10:S2.
13. Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res.* 2005;65:5996-6000; discussion -1.
14. Mohamed F. Étude multicentrique de nouveaux marqueurs tumoraux moléculaires dans les épanchements péritoneaux et le sang: Analyse par pcr quantitative en temps réel Jean Monnet de saint Etienne 2010.
15. Sieuwerts AM, Mostert B, Bolt-de Vries J, Peeters D, de Jongh FE, Stouthard JM, et al. Mrna and microrna expression profiles in circulating tumor cells and primary tumors of metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2011;17:3600-18.
16. Botti C, Bogni A, Seregini E, Vicario G, Buzzoni R, Carnaghi C, et al. Reliability of immunoradiometric assays for sex-hormone binding globulin, androstenedione, 17-beta estradiol and tumor-markers cea and cb15.3 to assess the biological response of megestrol-acetate treatment in patients with advanced breast-cancer. *Int J Oncol.* 1994;5:881-8.
17. Martoni A, Zamagni C, Bellanova B, Zanichelli L, Vecchi F, Cacciari N, et al. Cea, mca, ca 15.3 and ca 549 and their combinations in expressing and monitoring metastatic breast cancer: A prospective comparative study. *Eur J Cancer.* 1995;31A:1615-21.

18. Willsher PC, Beaver J, Blamey RW, Robertson JF. Serum tissue polypeptide specific antigen (tps) in breast cancer patients: Comparison with ca 15.3 and cea. *Anticancer Res.* 1995;15:1609-11.
19. Colomer R, Ruibal A, Genolla J, Rubio D, Del Campo JM, Bodi R, et al. Circulating ca 15-3 levels in the postsurgical follow-up of breast cancer patients and in non-malignant diseases. *Breast Cancer Res Treat.* 1989;13:123-33.
20. http://www.uptodate.com/contents/initial-work-up-and-staging-after-a-new-diagnosis-of-breast-cancer?source=search_result&search=guidelines+monitoring+early+breast+cancer&selectedTitle=49%7E150.
21. Bidard FC, Pierga JY, Vincent-Salomon A, Poupon MF. A "class action" against the microenvironment: Do cancer cells cooperate in metastasis? *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27:5-10.
22. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 1989;8:98-101.
23. Mavroudis D. Circulating cancer cells. *Ann Oncol.* 2010;21 Suppl 7:vii95-100.
24. Dena M, Kelly B, Anand K, Madelyn SL, Michael M, Franziska B, et al. Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers. *Physical Biology.* 2012;9:016003.
25. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139:871-90.
26. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-pcr assay for cytokeratin 19, mammaglobin a, and her2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14:2593-600.
27. Ignatiadis M, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Xenidis N, Kafousi M, et al. Molecular detection and prognostic value of circulating cytokeratin-19 messenger rna-positive and her2 messenger rna-positive cells in the peripheral blood of women with early-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2007;7:883-9.
28. Ignatiadis M, Xenidis N, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Kafousi M, et al. Different prognostic value of cytokeratin-19 mrna positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and her2 status in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:5194-202.
29. Xenidis N, Markos V, Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, Sfakiotaki G, et al. Clinical relevance of circulating ck-19 mrna-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer. *Ann Oncol.* 2007;18:1623-31.
30. Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mrna-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2006;24:3756-62.

31. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, Stopeck A, Borden E, Miller MC, et al. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:6403-9.
32. Gaforio JJ, Serrano MJ, Sanchez-Rovira P, Sirvent A, Delgado-Rodriguez M, Campos M, et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer.* 2003;107:984-90.
33. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res.* 2006;12:4218-24.
34. Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Research.* 2012;14:R15.
35. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating tumor cells: A novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:1420-30.
36. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351:781-91.
37. Hogan BV, Peter MB, Shenoy H, Horgan K, Hughes TA. Circulating tumour cells in breast cancer: Prognostic indicators, metastatic intermediates, or irrelevant bystanders? (review). *Mol Med Report.* 2008;1:775-9.
38. Graves H, Czerniecki BJ. Circulating tumor cells in breast cancer patients: An evolving role in patient prognosis and disease progression. *Patholog Res Int.* 2011;2011:621090.
39. Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, Jackson S, Fritsche HA, Islam R, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: Biologic staging beyond tumor burden. *Clin Breast Cancer.* 2007;7:471-9.
40. Armakolas A, Panteleakou Z, Nezos A, Tsouma A, Skondra M, Lembessis P, et al. Detection of the circulating tumor cells in cancer patients. *Future Oncol.* 2010;6:1849-56.
41. Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: Detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem.* 2011;57:1242-55.
42. Pinzani P, Salvadori B, Simi L, Bianchi S, Distante V, Cataliotti L, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: Correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection. *Hum Pathol.* 2006;37:711-8.
43. Wong NS, Kahn HJ, Zhang L, Oldfield S, Yang LY, Marks A, et al. Prognostic significance of circulating tumour cells enumerated after filtration enrichment in early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;99:63-9.

44. Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: Approaches to isolation and characterization. *The Journal of Cell Biology*. 2011;192:373-82.
45. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the cellsearch system. *Clin Cancer Res*. 2007;13:920-8.
46. Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, Becker S, Solomayer EF, Wallwiener D, et al. Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by rt-pcr and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Res*. 2009;11:R59.
47. Van der Auwera I, Peeters D, Benoy IH, Elst HJ, Van Laere SJ, Prove A, et al. Circulating tumour cell detection: A direct comparison between the cellsearch system, the adnatest and ck-19/mammaglobin rt-pcr in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer*. 2010;102:276-84.
48. Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, Willen B, Camara O, Pachmann U, et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43:617-27.
49. Alix-Panabieres C, Vendrell JP, Pelle O, Rebillard X, Riethdorf S, Muller V, et al. Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients. *Clin Chem*. 2007;53:537-9.
50. Deng G, Herrler M, Burgess D, Manna E, Krag D, Burke JF. Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-epcam antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2008;10:R69.
51. Negrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007;450:1235-9.
52. Balic M, Rapp N, Stanzer S, Lin H, Strutz J, Szkandera J, et al. Novel immunofluorescence protocol for multimarker assessment of putative disseminating breast cancer stem cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19:33-40.
53. Stathopoulou A, Gizi A, Perraki M, Apostolaki S, Malamos N, Mavroudis D, et al. Real-time quantification of ck-19 mrna-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using the lightcycler system. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5145-51.
54. Stathopoulou A, Mavroudis D, Perraki M, Apostolaki S, Vlachonikolis I, Lianidou E, et al. Molecular detection of cancer cells in the peripheral blood of patients with breast cancer: Comparison of ck-19, cea and maspin as detection markers. *Anticancer Res*. 2003;23:1883-90.
55. Dr. Ulrich A Pachmann MKH, Mrs. Stephanie Carl , Mrs. Nadine Ruediger , Mrs. Carola Rabenstein , Prof. Katharina Pachmann Comparing sequential steps for detection of circulating tumor cells: More specific or just less sensitive? . webmed Central cancer 2011;WMCoo1490:2.

56. Fehm T, Muller V, Aktas B, Janni W, Schneeweiss A, Stickeler E, et al. Her2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: A prospective, multicenter trial. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;124:403-12.
57. Punnoose EA, Atwal SK, Spoerke JM, Savage H, Pandita A, Yeh R-F, et al. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PLoS One.* 2010;5:e12517.
58. Becker S, Becker-Pergola G, Banys M, Krawczyk N, Wallwiener D, Solomayer E, et al. Evaluation of a rt-pcr based routine screening tool for the detection of disseminated epithelial cells in the bone marrow of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;117:227-33.
59. Moïse Namer MHcR, Joseph Gligorov, Daniel Serin, Marc Spielmann. *Cancer du sein* In: springer, Ed. compte rendu du cours supérieur francophone de cancérologie saint paul de vence 18-20 janvier 2007. paris: springer 2007.
60. P.-M. MARTIN, OUAFIK LH. Bases objectives de jugement pour l'évaluation et la pertinence des biomarqueurs tumoraux en pratique clinique. *John Libbey Eurotext.* 2008;2008:151-6.
61. Hayes DF. Determination of clinical utility of tumor markers: A tumor marker utility grading system. *Recent Results Cancer Res.* 1998;152:71-85.
62. Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res.* 1996;56:860-5.
63. Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mrna. *J Clin Oncol.* 1999;17:2015-9.
64. Ooka M, Tamaki Y, Sakita I, Fujiwara Y, Yamamoto H, Miyake Y, et al. Bone marrow micrometastases detected by rt-pcr for mammaglobin can be an alternative prognostic factor of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;67:169-75.
65. Zehentner BK, Secrist H, Hayes DC, Zhang X, Ostenson RC, Loop S, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of breast cancer patients during or after therapy using a multigene real-time rt-pcr assay. *Mol Diagn Ther.* 2006;10:41-7.
66. Mercatali L, Valenti V, Calistri D, Calpona S, Rosti G, Folli S, et al. Rt-pcr determination of maspin and mammaglobin b in peripheral blood of healthy donors and breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2006;17:424-8.
67. Roncella S, Ferro P, Bacigalupo B, Pronzato P, Tognoni A, Falco E, et al. Human mammaglobin mrna is a reliable molecular marker for detecting occult breast cancer cells in peripheral blood. *J Exp Clin Cancer Res.* 2005;24:265-71.
68. Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis C, Apostolaki S, et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: Evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol.* 2002;20:3404-12.

69. Masuda TA, Kataoka A, Ohno S, Murakami S, Mimori K, Utsunomiya T, et al. Detection of occult cancer cells in peripheral blood and bone marrow by quantitative rt-pcr assay for cytokeratin-7 in breast cancer patients. *Int J Oncol.* 2005;26:721-30.
70. Giribaldi G, Procida S, Ulliers D, Mannu F, Volpatto R, Mandili G, et al. Specific detection of cytokeratin 20-positive cells in blood of colorectal and breast cancer patients by a high sensitivity real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. *J Mol Diagn.* 2006;8:105-12.
71. Cimino A, Halushka M, Illei P, Wu X, Sukumar S, Argani P. Epithelial cell adhesion molecule (epcam) is overexpressed in breast cancer metastases. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123:701-8.
72. Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Moch H, Baeuerle PA, et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (ep-cam) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2006;103:483-8.
73. Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science.* 1994;263:526-9.
74. Jotsuka T, Okumura Y, Nakano S, Nitta H, Sato T, Miyachi M, et al. Persistent evidence of circulating tumor cells detected by means of rt-pcr for cea mRNA predicts early relapse: A prospective study in node-negative breast cancer. *Surgery.* 2004;135:419-26.
75. An XY, Egami H, Hayashi N, Kurusu Y, Yamashita JI, Ogawa M. Clinical significance of circulating cancer cells in peripheral blood detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in patients with breast cancer. *Tohoku J Exp Med.* 2001;193:153-62.
76. Zheng HY, Chen Q, Ye YB, Huang WW. [mRNA expression of ck19 and cea in peripheral blood of patients with breast cancer detected by real-time quantitative PCR]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2008;88:2267-70.
77. Tremmel M, Matzke A, Albrecht I, Laib AM, Olaku V, Ballmer-Hofer K, et al. A cd44v6 peptide reveals a role of cd44 in vegfr-2 signaling and angiogenesis. *Blood.* 2009;114:5236-44.
78. Afify A, Purnell P, Nguyen L. Role of cd44s and cd44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Exp Mol Pathol.* 2009;86:95-100.
79. Burstein HJ. The distinctive nature of her2-positive breast cancers. *N Engl J Med.* 2005;353:1652-4.
80. Xu Y, Yao L, Li H, Ouyang T, Li J, Wang T, et al. Presence of erbb2 mRNA in the plasma of breast cancer patients is associated with circulating tumor cells and negative estrogen and progesterone receptor status. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;97:49-55.
81. Fehm T, Maimonis P, Katalinic A, Jager WH. The prognostic significance of c-erbb-2 serum protein in metastatic breast cancer. *Oncology.* 1998;55:33-8.

82. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against her2 for metastatic breast cancer that overexpresses her2. *N Engl J Med.* 2001;344:783-92.
83. Ntoulia M, Stathopoulou A, Ignatiadis M, Malamos N, Mavroudis D, Georgoulis V, et al. Detection of mammaglobin a-mrna-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested rt-pcr. *Clin Biochem.* 2006;39:879-87.
84. Sparano JA, Solin LJ. Defining the clinical utility of gene expression assays in breast cancer: The intersection of science and art in clinical decision making. *J Clin Oncol.* 2010;28:1625-7.
85. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med.* 2009;360:790-800.
86. Strati A, Markou A, Parisi C, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulis V, et al. Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by rt-qpcr. *BMC Cancer.* 2011;11:422.
87. Ghossein RA, Rosai J. Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. *Cancer.* 1996;78:10-6.
88. Ji XQ, Sato H, Tanaka H, Konishi Y, Fujimoto T, Takahashi O, et al. Real-time quantitative rt-pcr detection of disseminated endometrial tumor cells in peripheral blood and lymph nodes using the lightcycler system. *Gynecol Oncol.* 2006;100:355-60.
89. Sturgeon C. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. *Clinical Chemistry.* 2002;48:1151-9.
90. Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, et al. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (her-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress her-alpha activation function 1. *EMBO J.* 2000;19:4688-700.
91. Penot G, Le Peron C, Merot Y, Grimaud-Fanouillere E, Ferriere F, Boujrad N, et al. The human estrogen receptor-alpha isoform heralpha46 antagonizes the proliferative influence of heralpha66 in mcf7 breast cancer cells. *Endocrinology.* 2005;146:5474-84.
92. www.ATCC.org. Mcf7. cell line Designation
93. A Ho-Pun-Cheung DC, E Lopez-Crapez La rt-qpcr en oncologie : Considérations pour la normalisation. *Annales de biologie clinique* 2008;66.
94. Stathopoulou A, Angelopoulou K, Perraki M, Georgoulis V, Malamos N, Lianidou E. Quantitative rt-pcr luminometric hybridization assay with an rna internal standard for cytokeratin-19 mrna in peripheral blood of patients with breast cancer. *Clin Biochem.* 2001;34:651-9.
95. Min CJ, Tafta L, Verbanac KM. Identification of superior markers for polymerase chain reaction detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer Res.* 1998;58:4581-4.
96. Chen C-C, Hou M-F, Wang J-Y, Chang T-W, Lai D-Y, Chen Y-F, et al. Simultaneous detection of multiple mrna markers ck19, cea, c-met, her2/neu and

hmam with membrane array, an innovative technique with a great potential for breast cancer diagnosis. *Cancer Letters*. 2006;240:279-88.

97. Wang DR, Chen GY, Liu XL, Miao Y, Xia JG, Zhu LH, et al. Cd44v6 in peripheral blood and bone marrow of patients with gastric cancer as micro-metastasis. *World J Gastroenterol*. 2006;12:36-42.

98. Bieche I, Girault I, Sabourin JC, Tozlu S, Driouch K, Vidaud M, et al. Prognostic value of maspin mRNA expression in ER alpha-positive postmenopausal breast carcinomas. *Br J Cancer*. 2003;88:863-70.

99. de Cremoux P, Tran-Perennou C, Brockdorff BL, Boudou E, Brunner N, Magdelenat H, et al. Validation of real-time RT-PCR for analysis of human breast cancer cell lines resistant or sensitive to treatment with antiestrogens. *Endocr Relat Cancer*. 2003;10:409-18.

100. Takeuchi H, Bilchik A, Saha S, Turner R, Wiese D, Tanaka M, et al. C-met expression level in primary colon cancer: A predictor of tumor invasion and lymph node metastases. *Clin Cancer Res*. 2003;9:1480-8.

101. Furstemberger G, von Moos R, Senn HJ, Boneberg EM. Real-time PCR of CD146 mRNA in peripheral blood enables the relative quantification of circulating endothelial cells and is an indicator of angiogenesis. *Br J Cancer*. 2005;93:793-8.

102. Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:4748-53.

103. Corradini P, Voena C, Astolfi M, Delloro S, Pilotti S, Arrigoni G, et al. Maspin and mammaglobin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Ann Oncol*. 2001;12:1693-8.

104. Roncella S, Ferro P, Bacigalupo B, Dessanti P, Pronzato P, Franceschini MC, et al. Assessment of RT-PCR detection of human mammaglobin for the diagnosis of breast cancer derived pleural effusions. *Diagn Mol Pathol*. 2008;17:28-33.

105. Chen CC, Hou MF, Wang JY, Chang TW, Lai DY, Chen YF, et al. Simultaneous detection of multiple mRNA markers ck19, cea, c-met, her2/neu and hmam with membrane array, an innovative technique with a great potential for breast cancer diagnosis. *Cancer Lett*. 2006;240:279-88.

106. Chen Y, Zou TN, Wu ZP, Zhou YC, Gu YL, Liu X, et al. Detection of cytokeratin 19, human mammaglobin, and carcinoembryonic antigen-positive circulating tumor cells by three-marker reverse transcription-PCR assay and its relation to clinical outcome in early breast cancer. *Int J Biol Markers*. 2010;25:59-68.

107. Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*. 1993;14:214-7.

108. Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *Biotechniques*. 1989;7:762-9.

109. Julie Amyot FB, Claudette deMontigny et M'Bark Sadouk La RT-PCR comme approche diagnostique des néoplasies: Dosage de l'ARN messager de la thyroglobuline dans le suivi du cancer différencié de la thyroïde *Ann Biol Clin (Paris)*. 2001;41:9-13.

- 110.Ghossein RA, Carusone L, Bhattacharya S. Review: Polymerase chain reaction detection of micrometastases and circulating tumor cells: Application to melanoma, prostate, and thyroid carcinomas. *Diagn Mol Pathol*. 1999;8:165-75.
- 111.Andreopoulou E, Yang LY, Rangel KM, Reuben JM, Hsu L, Krishnamurthy S, et al. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: Adnagen adnatest breastcancer select/detect versus veridex cellsearch system. *Int J Cancer*. 2012;130:1590-7.
- 112.Stearns V, Yamauchi H, Hayes DF. Circulating tumor markers in breast cancer: Accepted utilities and novel prospects. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52:239-59.
- 113.Kiang DT, Greenberg LJ, Kennedy BJ. Tumor marker kinetics in the monitoring of breast cancer. *Cancer*. 1990;65:193-9.
- 114.moise Namer ds, marc spielmann, joseph gligorov. *Cancer du sein*. In: springer, Ed. springer ed2007.
- 115.Salomon Av. Détermination du statut de her2dans le s cancers du sein:Qu'avons nous appris en 10ans. institut Curie , Paris ,France.