Cellules tumorales circulantes et cancer du sein : méthodes de détection et résultats cliniques.

François-Clément Bidard (1,2,3), Antoine-Emmanuel Saliba (4), Laure Saias (4), Armelle Degeorges (5), Patricia de Cremoux (5), Jean-Louis Viovy (4), Anne Vincent-Salomon (6), Claire Mathiot (7), Jean-Yves Pierga (1,8), Aimery de Gramont (2,9).

1 Département d'Oncologie médicale, Institut Curie

2 Service d'Oncologie médicale, Hôpital Saint Antoine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

3 AERIO (Association d'Enseignement et de Recherche des Internes en Oncologie)

4 Laboratoire Physicochimie Curie, CNRS UMR 168, Institut Curie

5 Unité de Pharmacologie, Institut Curie

6 Département de Pathologie, Institut Curie

7 Laboratoire d'Hématologie biologique, Institut Curie

8 Université Paris Descartes

9 Université Pierre et Marie Curie

Titre court : Cellules tumorales circulantes et cancer du sein

Résumé

Grâce à des progrès technologiques récents, les Cellules Tumorales Circulantes (CTC) font l'objet actuellement d'une recherche importante en Oncologie pour définir leur intérêt diagnostique, pronostique et prédictif de réponse aux traitements. L'intérêt est également croissant sur les informations qu'elles peuvent fournir sur les caractéristiques biologiques de la tumeur. Nous faisons ici la revue les différentes méthodes de détection ainsi que les résultats cliniques obtenus jusqu'à présent par ces techniques dans le cancer du sein.

Mots clés :

Cellules tumorales circulantes ; Cancer du sein ; CellSearch ; ISET ; Adnagen ; Microfluidique

Abstract

Due to recent technological progresses, Circulating Tumor Cells (CTC) are currently extensively studied in order to define their diagnostic, prognostic and predictive value. We review here the different detection techniques and their clinical results in breast cancer patients.

Key words

Circulating tumor cells ; Breast cancer ; CellSearch ; ISET ; Adnagen ; Microfluidic

Introduction

L'apparition de métastases correspond biologiquement au franchissement réussi par des cellules tumorales de l'ensemble des étapes successives du processus de dissémination : invasion locale, extravasation, interaction des cellules tumorales circulantes (CTC) avec les éléments figurés du sang, arrêt des CTC et extravasation, dormance des cellules tumorales disséminées (DTC, aussi appelées micrométastases) et prolifération cellulaire finale conduisant à la formation de métastases (1). En clinique (en faisant donc abstraction des modèles précliniques de laboratoire), l'étude du processus métastatique a longtemps reposé sur les deux situations « extrêmes » de ce processus, à savoir la tumeur initiale et les métastases (métastases à distance et envahissement ganglionnaire régional). Il s'agissait généralement d'étudier quelles particularités (génétiques ou autres) définissaient les cellules métastatiques et si la présence de ces caractéristiques dans la tumeur initiale constituait un marqueur pronostique de rechute métastatique. Plus récemment, les études cliniques en rapport avec le processus métastatique se sont penchées sur les discordances d'expression des cibles thérapeutiques entre tumeur initiale et métastases (2, 3). Parallèlement à ces observations, deux nouvelles « fenêtres » d'étude du processus métastatique se sont développées techniquement depuis une dizaine d'année et devraient s'implanter en pratique clinique : une fenêtre « post-intravasation » avec la détection et l'étude des CTC (*Circulating Tumor Cells*) dans le sang (4), et une fenêtre « post-dissémination » avec la détection et l'étude des DTC (*Disseminated Tumor Cells*) dans la moelle osseuse (5). Ces deux types de cellules tumorales correspondent à des étapes différentes le long du processus métastatique et n'ont vraisemblablement pas la même signification clinique. En l'absence d'un marqueur de clonalité fiable dans les cancers du sein, il est probable que le type de détection utilisé (pour les CTC ou les DTC) a une influence majeure sur la nature des résultats et leur éventuelles applications cliniques concrètes que l'on peut en attendre. Après un rappel méthodologique, nous rapportons ici une synthèse des principaux résultats cliniques obtenus par les nouveaux systèmes de détection (la plupart proposés par des industriels) et les perspectives d'utilisation des CTC dans le cancer du sein.

Méthodes de détection

La concentration « réelle » en CTC du sang périphérique est inconnue, des variations d'environ 1 à 10.000 étant rapportées, à même stade clinique (cancer localisé ou métastatique), par les différentes techniques de détection. Les CTC correspondent cependant à une infime minorité des éléments figurés du sang, et ont probablement une concentration inférieure à 0,1 cellule par mm^3 , soit moins d'une cellule pour 100.000 cellules mononucléées sanguines (CMNS), concentration très inférieure au seuil de détection des techniques de type FACS (6). Leur détection doit donc faire appel à des techniques hautement sensibles (peu de CTC) et encore plus hautement spécifiques (beaucoup de CMNS).

Enrichissement

Une première étape d'enrichissement du prélèvement sanguin peut consister en une centrifugation sur gradient de Ficoll, de manière à séparer (par différence de densité) les CMNS des globules rouges et plaquettes. Les CTC ayant une densité similaire aux CMNS, elles sont présentes au niveau de l'anneau leucocytaire qui est récupéré après centrifugation. Une variante, utilisée par l'université de Jena, consiste à faire adhérer par dépôt du sang sur une lame de cytologie les CMNS et les CTC (après lyse des érythrocytes), en considérant que les CTC pourraient avoir une adhésion plus rapide que les CMNS sur la lame.

Une deuxième étape d'enrichissement peut reposer sur l'expression différentielle d'un antigène de membrane entre CTC et CMNS. Si l'on prend l'image théorique de la colonne d'affinité, une immunosélection positive consiste à « retenir » par des anticorps les CTC et éluer les CMNS, l'inverse étant une immunosélection négative (7). Les CMNS expriment des antigènes de surface relativement bien définis (par exemple, CD45, antigène pan-leucocytaire présent à la surface de la quasi totalité des CMNS) mais les approches d'immunosélection négative ont été généralement abandonnées du fait d'un enrichissement en CTC considéré comme insuffisant. L'immunosélection positive, largement utilisée, repose quant à elle sur la présence d'antigènes spécifiques à la surface des CTC non exprimés par les CMNS (par exemple, la protéine membranaire épithéliale EpCAM, *Epithelial Cell Adhesion Molecule*). Le choix du marqueur membranaire utilisé pour l'immunosélection est déterminant et varie selon le type de cancer à étudier. En effet, l'expression de ces antigènes de surface par les CTC varie entre types histologiques de cancer ; il varie aussi très probablement entre patients présentant un même type histologique de cancer et varie enfin potentiellement au cours de l'évolution de la maladie tumorale chez un même patient. EpCAM, qui est l'un des marqueurs les plus utilisés, est ainsi exprimé par environ 90% des cancers du sein, 80% des cancers du pancréas, du côlon et des cancers hormonorésistants de la prostate, mais n'est exprimé par aucun type de sarcome ou de lymphome (8). Cependant, la seule expression d'une molécule de surface de cellules épithéliales ne suffit pas pour affirmer le caractère malin d'une cellule circulante et des cellules non tumorales peuvent parfois exprimer ces molécules. De plus, l'utilisation de marqueurs

épithéliaux pour l'isolement des CTC peut s'avérer inadaptée dans la mesure où certains leucocytes activés présentent l'expression de ce marqueur et où les cellules tumorales qui ont subi une transition épithélio-mésenchymateuse perdent (au moins en partie) l'expression de ces marqueurs (9). En pratique, ces étapes se déroulent rarement sur des colonnes d'affinité, mais plutôt en phase liquide : les CTC et CMNS sont incubées dans un tube avec les anticorps conjugués à des microbilles ferromagnétiques : l'application d'un champ magnétique permet de retenir ces anticorps (et les CTC) à la paroi du tube le temps des lavages qui éliminent les CMNS non reconnues par l'anticorps. L'efficacité de l'immuno-enrichissement magnétique (utilisant un anticorps adapté) a été validée dans plusieurs types de tumeurs épithéliales, dont les cancers du sein.

Une variante intéressante de l'étape d'immuno-enrichissement des CTC utilise les techniques de « puces microfluidiques ». Schématiquement, ces puces comportent un circuit de très faible diamètre au sein duquel les fluides (en l'occurrence le sang) vont s'écouler de manière laminaire. Grâce au diamètre particulièrement réduit de ces « conduits », la fréquence et la durée d'interaction entre les anticorps (disposés sur les parois du circuit) et les CTC augmente, permettant d'augmenter la probabilité de liaison des CTC, et donc la sensibilité générale de la technique (**cf encart microfluidique**).

Une troisième méthode d'enrichissement repose sur le fait que les CTC sont plus volumineuses que les autres CMNS, et peuvent donc être retenues par des filtres adaptés. Il existe là aussi plusieurs techniques, utilisant des filtres du commerce (10) ou spécialement brevetés à cette fin (Metagenex®) (11). Des filtres « mixtes », combinant sélection par la plus grande taille cellulaire et la plus faible visco-élasticité des CTC sont aussi en phase de développement pré-clinique (Canopus Bioscience®).

Détection

Après la/les étape(s) de sélection précédentes (parfois non utilisées), la détection des CTC parmi les CMNS restantes peut se faire par biologie moléculaire ou techniques de marquage cytologique, deux approches différentes conduisant à des résultats qui ne sont pas toujours exactement concordants (12, 13).

Les techniques de biologie moléculaire (RT-PCR) reposent sur la détection de séquences d'ARNm qui seraient présents dans les CTC et absents dans les CMNS, moyennant la définition préalable de seuils de positivité (14, 15). Au contraire de nombreux sarcomes, les adénocarcinomes mammaires ne présentent pas de transcrite de fusion permettant une détection spécifique des cellules tumorales par RT-PCR. Les transcrits amplifiés sont donc choisis pour être exprimés dans les cellules épithéliales et/ou les cellules mammaires transformées, comme la cytokératine 19 (CK19), la mucine 1 (MUC1), l'*Epithelial Cell Adhesion molecule* (EpCAM), la mammaglobine, HER2, ou encore la télomérase (16). Les marqueurs les plus utilisés sont MUC1 et CK19, sans supériorité nette de l'un ou l'autre dans le cancer du sein (17, 18). La détection peut être réalisée de manière quantitative (RT-

qPCR), si l'on n'amplifie qu'un seul gène à la fois. Dans ce cas, il faut réaliser n PCR sur n échantillons différents pour analyser n marqueurs, sans possibilité d'étudier directement la co-expression de ces marqueurs dans une même population cellulaire. L'autre possibilité est de réaliser une *multiplex-PCR* en amplifiant simultanément plusieurs transcrits d'intérêts grâce à un mélange d'amorces de PCR. L'avantage est alors de détecter plusieurs marqueurs simultanément (gain de temps), mais sacrifie l'aspect quantitatif, l'amplification ne se réalisant pas uniquement de manière linéaire pour chacun des cDNA obtenus. Ainsi, si la détection simplex ne pose aucun problème technique avec les outils de biologie moléculaire dont nous disposons actuellement, la détection multiplex peut diminuer l'efficacité de la PCR et entraîner, même avec un bon design, une compétition entre les cibles.

Un intérêt de ces techniques moléculaires est qu'elles reposent sur un matériel congelable (ARNm puis cDNA après transcription inverse) et donc facilement analysable *a posteriori*. De plus, la sensibilité des techniques de biologie moléculaire est extrême et unanimement reconnue : dans les situations cliniques où il existe un transcrit spécifique détectable (sarcomes, maladies du sang...), l'utilisation de ces techniques a permis de détecter après traitement des cellules tumorales (maladie résiduelle moléculaire : 1 cellule cancéreuse parmi 1 à 10 millions d'autres cellules) de manière nettement plus sensible et spécifique que les techniques cytologiques (maladie résiduelle cytologique en l'absence d'immunocytochimie : 1 cellule cancéreuse parmi 100). Cependant, ces techniques se heurtent à une baisse non négligeable de leur spécificité dès lors que la détection repose sur des transcrits épithéliaux ou mammaires, qui sont souvent exprimés par des cellules non tumorales, que ce soit de manière légitime (cellules circulantes non tumorales exprimant le gène cible) ou illégitime : progéniteurs hématopoïétiques, voire même CMNS (19). Enfin, une éventuelle hétérogénéité d'expression des marqueurs des CTC (par exemple, hétérogénéité de l'expression de récepteurs hormonaux au sein du pool de CTC) ne peut être détectée, les différentes cellules étant mélangées lors de l'extraction d'ARNm.

Les autres techniques de détection sont cytologiques (20). La détection des CTC parmi les CMNS restantes après enrichissement initial repose alors sur un immunomarquage des CTC. Ce marquage « cible » logiquement les mêmes marqueurs épithéliaux et/ou mammaire (tels que CK19, EpCAM, *etc*) à l'instar de la détection des DTC dans la moelle (21). Un marquage simultané de plusieurs cibles peut être obtenu en utilisant des anticorps primaires couplés à des fluorochromes différents. Les structures cellulaires (noyau, cytoplasmes) peuvent être visualisées par marquage chimique de type Hématéine-Eosine en lumière blanche ou par DAPI en fluorescence. Des techniques de FISH interphasique sont aussi possibles sur les cellules isolées et fixées. A l'opposé, la fixation des cellules n'est pas obligatoire si les marquages ont pour cible des protéines membranaires, avec caractérisation de l'expression de certains gènes cibles par RT-PCR quantitative, voire même une mise en culture des CTC isolées. Ces techniques se caractérisent généralement par une plus grande spécificité que les techniques de biologie moléculaire : les cellules sont « vues », permettant d'écarter

des CMNS sur des critères morphologiques ou d'immunomarquage (par exemple, expression de l'antigène pan-leucocytaire CD45). L'amélioration de la sensibilité des techniques morphologiques est par ailleurs l'objet des principales avancées dans le domaine. Enfin, la détection optique des cellules au microscope requiert beaucoup de temps et un personnel particulièrement entraîné à la cytologie, ce qui est incompatible avec son utilisation à moyenne ou grande échelle ; des systèmes de détection automatisés, couplés à des logiciels de reconnaissance d'image, permettent toutefois de contourner cette obstacle en réduisant le temps de détection, au prix d'erreurs marginales supplémentaires (22).

Systèmes industriels

La plupart des systèmes de détection des CTC sont issus de la recherche académique et plusieurs de ces techniques devraient connaître prochainement un développement industriel. Pour l'instant, seul trois systèmes ont été développés par l'industrie : deux systèmes (Adnagen®, Metagenex®) sont actuellement à un stade clinique expérimental, alors que l'utilisation du troisième système Cellsearch (Veridex®) a été validée aux USA dans plusieurs indications.

La technique développée par Adnagen® (23) comporte tout d'abord une séparation immunomagnétique non automatisée reposant sur des billes magnétiques couplées à un mélange de plusieurs anticorps différents (et variant d'après le type de cancer recherché). Les ARNm sont ensuite extraits, avant transcription inverse (RT). Une PCR multiplex est alors réalisée en amplifiant dans une même réaction plusieurs séquences correspondant à des gènes d'intérêt différents. Ces gènes sont pour certains des gènes épithéliaux mammaires censés être exprimés par toutes les CTC et donc refléter la charge tumorale (MUC1...), d'autres sont des gènes « cibles », potentiellement non exprimés par tout ou partie des CTC (famille HER, récepteurs hormonaux...). A noter qu'en l'absence de contrôle morphologique des cellules ou d'un marqueur moléculaire clonal, l'origine tumorale du signal PCR obtenu par cette technique n'est pas prouvée. Les résultats sont rendus sous forme qualitative (résultat positif ou négatif), sans nombre de CTC/ml. Les intérêts de cette technique sont qu'elle permet de détecter la transcription d'à peu près n'importe quel gène cible, et que la détection des CTC ne repose pas sur l'expression d'une cible unique possiblement labile (plusieurs anticorps pour l'immunosélection, plusieurs amorces) ; les kits commercialisés (comprenant les amorces de PCR) ne sont cependant pas modulables à façon. Par ailleurs, l'amplification de plusieurs cibles à la fois ne permet pas d'obtenir une amplification linéaire pour chacun des ADNc : la définition d'un seuil de positivité pour HER2, RE et RP reste difficilement envisageable avec une technique non quantitative. La technique Adnagen® n'est pas encore automatisée.

La technique ISET (*Isolation by Size of Epithelial Tumor cells*) de Metagenex® est une technique « ouverte » qui permet une caractérisation à la fois morphologique, immunocytologique et moléculaire des CTC (11). Il s'agit d'un enrichissement par filtration des cellules du sang sur une membrane microporeuse (pores cylindriques de 8 microns) laissant passer la plupart des CMNS et permettant de retenir les CTC. Une fois les CTC ainsi isolées, les techniques ultérieures sont laissées à

discrétion des laboratoires. Il peut s'agir d'un décompte optique des CTC (permettant de vérifier l'existence des anomalies cytologiques propres aux cellules tumorales) par immunocyto marquage (en lumière blanche ou en fluorescence), d'une microdissection laser des CTC et extraction de l'ARN ou de l'ADN pour recherche des altérations moléculaires cellulaires (mutations, variations d'expression, *etc*). L'utilisation d'un filtre permet de s'affranchir de l'étape d'immunoenrichissement initiale (diminution des biais de sélection) et peut donc être potentiellement appliquée à de très nombreux types histologiques tumoraux. Cependant, si le décompte des CTC après marquage pouvait reposer sur des systèmes automatisés de détection et de reconnaissance d'image (24), il n'existe pas pour l'instant d'automatisation des différentes techniques utilisables après l'étape de filtrage, qui nécessitent donc un temps important de manipulation pour chaque échantillon. L'étape initiale de filtrage doit par ailleurs être réalisée dans les heures qui suivent le prélèvement sanguin, l'acheminement vers un laboratoire spécialisé dans l'analyse moléculaire des CTC pouvant être réalisé par la suite après congélation ou fixation des filtres.

La technique CellSearch de Veridex® est une technique cytologique automatisée (25). Le sang périphérique est prélevé dans un tube dédié de 7,5ml (tubes CellSave), pouvant être conservé à température ambiante pendant 4 jours avant analyse et permettant le transport vers un laboratoire d'analyse référent. Après centrifugation, un enrichissement immunomagnétique sélectionne les cellules sur l'expression de la molécule EpCAM. Les cellules ainsi isolées sont détectées en fluorescence, après marquage nucléaire (DAPI, fluorescence bleue) et immunomarquage des cytokératine 8, 18 et 19 (fluorescence verte) et de l'antigène pan-leucocytaire CD45 (fluorescence rouge). Les corps fluorescents sont ensuite analysés un à un et un logiciel de reconnaissance d'image permet d'isoler les CTC sur une conjonction de plusieurs critères : une CTC doit avoir une morphologie ronde et une taille adaptée et un noyau (DAPI) entouré par du cytoplasme CK+ et ne pas exprimer l'antigène CD45. Un quatrième canal de fluorescence est utilisable, permettant de détecter l'expression de certaines protéines d'intérêt, comme HER2 ou EGFR (**Figure 1**). Les résultats sont exprimés en nombre de CTC/7,5ml. Cette technique est actuellement la seule à permettre une analyse reproductible des CTC (26) dans de vastes cohortes sans nécessiter de l'intervention d'experts en cytologie. L'utilisation en routine clinique du système CellSearch a ainsi été validée par la FDA dans les cancers du sein, du côlon et de la prostate hormono-résistant, compte-tenu des résultats cliniques obtenus jusqu'à présent (cf ci dessous). Elle reste cependant une technique « fermée » qui ne donne pas la possibilité d'analyser d'autres protéines que celles pour lesquelles un kit de détection est commercialisé ; il n'y a pas non plus d'analyse moléculaire possible des CTC jusqu'à présent. Dernière évolution disponible, un kit permet de récupérer les CTC « intactes » après la phase d'immunoenrichissement afin d'analyser, par exemple, le profil d'expression global de ces cellules (27).

Résultats cliniques

Technique CellSearch (Veridex®). Utilisée par de nombreux centres depuis presque 5 ans, la technique CellSearch a fait l'objet de nombreuses publications qui ont permis de constituer un corpus important de données cliniques à tous les stades de la prise en charge du cancer du sein (28-32). Ces résultats, en terme de sensibilité de détection et d'impact clinique sont présentés **Tableau 1**. En résumé, le seuil de 5 CTC par tube (7,5ml de sang périphérique) a été validé comme permettant de distinguer les patientes à bon (<5 CTC) ou à mauvais (≥ 5 CTC) pronostic, lors du diagnostic de rechute métastatique, avant le début de la première ligne de chimiothérapie (survie globale médiane : 10,1 mois contre plus de 18 mois, $p < 0.001$). L'intérêt majeur des CTC est que les variations quantitatives des CTC entre le diagnostic et après seulement un cycle de chimiothérapie permettent de prédire la réponse à la chimiothérapie (survie sans progression : 2,1 mois contre 7,0 mois, $p < 0.001$), et ce de manière plus précoce que l'évaluation radiologique faite après 3 ou 4 cycles. En situation adjuvante, le nombre de CTC détectées par cette technique est nettement plus faible (cf Tableau 1) et atteint peut-être les limites de sensibilité de l'appareil ; l'essai SUCCESS mené en Allemagne sur 1500 patientes devrait permettre de conclure quand à son intérêt exact dans cette situation (33). En situation néo-adjuvante, correspondant à des tumeurs inflammatoires ou localement avancées, la fréquence de détection et le nombre de cellules détectées sont faibles, ne permettant pas un suivi valable des variations quantitatives en cours de chimiothérapie. Néanmoins, les CTC y jouent un rôle pronostique indépendant de rechute métastatique (rapport de risque = 4,15 [1.3-13], $p = 0,017$) (34). Sur la base des résultats publiés, la technique CellSearch® a reçu l'agrément de la FDA pour être utilisée par les oncologues américains dans leur pratique clinique quotidienne. Les indications reconnues sont l'évaluation pronostique chez des patientes métastatiques et le suivi de l'efficacité de la chimiothérapie. Cette autorisation « large » permettra peut-être de vérifier si le seuil utilisé en première ligne métastatique (5 CTC/tube, seuil déterminé par une méthode empirique d'apprentissage/validation) reste utilisable au delà de la première ligne métastatique, compte-tenu de l'augmentation possible du nombre de CTC au cours de la progression de la maladie.

Université d'Iéna. Le laboratoire de l'Université d'Iéna (Allemagne) a rapporté plusieurs études réalisées avec un système de détection cytologique original. Après lyse des érythrocytes, les prélèvements sont étalés pendant 30 minutes sur une lame de verre de manière à ce que les cellules vivantes y adhèrent. Un immunomarquage positif (anti HEA, *Human Epithelial Antigen*) et négatif (anti CD45) sont réalisés, avant lecture de la lame par un logiciel de reconnaissance d'image. Les concentrations rapportées de CTC (appelées dans leurs publications CETC, *Circulating Epithelial Tumor Cells*) sont très importantes avec cette technique qui détecte des CTC chez la quasi totalité des patientes, quel que soit le stade de la maladie. Ainsi, en néoadjuvant, une moyenne de plus de 26.000 CTC/ml est rapportée (concentration équivalente à celle des polynucléaires basophiles), avec un maximum à 270.000 CTC/ml (35). Si de telles concentrations s'avéraient exactes (concentration équivalente à celle des polynucléaires éosinophiles ou des monocytes), les CTC devant alors être

visibles sur un simple frottis sanguin. Par comparaison, l'examen de frottis de CMNS du sang à l'Institut Curie (après Ficoll et immunocyto-marquage des cytokératines 8, 18 et 19) ne retrouvait de rares CTC (généralement moins de 10 CTC/ml) chez 40% des patientes atteintes de cancer du sein métastatique (36). Plusieurs résultats cliniques ont été néanmoins publiés par l'Université de Jena : la variation numérique des CTC d'après cette technique serait prédictive d'une bonne réponse tumorale en situation néoadjuvante (n=58) (35) ainsi que d'une bonne survie sans récurrence en situation adjuvante (n=91) (37). Le critère utilisé pour y définir la réponse (diminution de plus de 90% des CTC en cours de chimiothérapie) est d'autant plus surprenant que la plupart des CTC détectées doivent correspondre en réalité à des leucocytes ; une validation de ces résultats par d'autres centres est donc requise.

Plusieurs autres données ont été publiées avec diverses techniques cytologiques. Après immuno-enrichissement, l'immunocyto-marquage de HER2 a permis d'isoler des CTC chez près de la moitié des patientes traitées pour des cancers du sein localisés (n=35), quel que soit le statut HER2 de la tumeur initiale (38). La détection de CTC HER2+ était associée en outre à un risque augmenté de rechute métastatique. D'autres systèmes similaires non automatisés ont donné des résultats cliniques intéressants, mais leur utilisation, chronophage, a été arrêtée (36, 39-41)

Microfluidique. La performance des puces microfluidiques pour la détection des CTC dans plusieurs types de cancers a été rapportée en premier lieu par Nagrath (42). Parmi la centaine d'échantillons cliniques testés, 10 provenaient de patientes présentant un cancer du sein métastatique. Des CTC ont été retrouvées dans tous les échantillons, avec une distribution inhomogène : 2 patientes avaient entre 1 et 20 CTC/ml, 8 avaient entre 50 et 150 CTC/ml. Des résultats similaires ont été retrouvés dans tous les autres types de cancer testés (prostate, côlon, poumon...). D'après cette première publication, ces approches permettraient d'atteindre une sensibilité proche des techniques moléculaires avec les avantages de la détection par immunocyto-marquage, et constituent donc une voie de recherche intéressante. Ces résultats doivent cependant être reproduits indépendamment ; l'impact clinique des CTC reste à redéfinir avec ce type de technique très sensible ; enfin, le passage d'une détection « artisanale » en laboratoire à une utilisation routinière restera à faire, avec notamment l'automatisation de cette technique de détection.

Technique de filtration. L'incidence de détection des CTC par la technique ISET (Metagenex®) en situation adjuvante a été évaluée à 27% chez 44 patientes (43). Le nombre moyen de CTC était de 8 CTC/ml, ce qui semble correspondre à une meilleure sensibilité que le système CellSearch® utilisé en situation adjuvante. De plus, cette publication rapporte une bonne corrélation entre l'expression de HER2 par les CTC (après microdissection laser) et le statut HER2 de la tumeur primitive. Sur 131 patientes en situation adjuvante ou métastatique, une équipe de Toronto utilisant un enrichissement par filtration avant immunomarquage de la cytokératine 8 a rapporté 80% de détection de CTC en situation métastatique et 20% en adjuvant, avec un impact clinique (temps jusqu'à progression) des CTC uniquement en situation métastatique (10).

Méthodes moléculaires

Les équipes grecques ont mis au point de détection une technique de détection des CTC par RT-PCR quantitative sur trois ARNm : cytokératine 19 (CK19), HER2 et la mammaglobine A, à l'origine de nombreuses publications. La détection des CTC après opération et avant traitement adjuvant serait associée de manière indépendante à une survie sans rechute et à une survie globale diminuée dans le sous groupe des cancers du sein N- (n=167), ce qui en ferait -d'après les auteurs- un facteur pronostique mais également prédictif (44). Dans une autre publication, la détection des CTC, cette fois ci quel que soit le statut ganglionnaire mais dans le sous-groupe des patientes sous tamoxifène adjuvant, aurait un impact similaire (n=119) (45). Dans l'ensemble de la population avant traitement adjuvant-, la détection de CK19 aurait la même valeur que celle de la mammaglobine (n=175) (46), sans que ces deux marqueurs ne soient fortement corrélés entre eux. Dans cette publication, la détection de HER2 n'apporterait apparemment pas d'information complémentaire, alors qu'elle semble intéressante dès lors qu'on ne prend en compte que les transcrits de CK19 (n=185) (47). La détection des CTC serait associée à une plus forte incidence de métastases cérébrales (n>800) (48). La détection des CTC par HER2 serait cependant pronostique de manière isolée (49) en situation adjuvante, stade III exclus (n=214). Tout cela est à rapprocher de la publication récente (n=444) rapportant que les CTC détectées par CK19 n'auraient une valeur pronostique que dans le sous groupe des patientes ayant une tumeur primitive triple négative (RE-, RP- HER2-) ou surexprimant HER2+, mais pas dans le sous-groupe des patientes avec des tumeurs exprimant les récepteurs hormonaux (50). Au total, la technique de RT-qPCR sur CK19 semble une technique facile à réaliser en routine et pouvant générer des résultats intéressants. Chaque publication portant sur un sous-groupe de la cohorte, sans justification rationnelle (par exemple inclusion ou exclusion selon les articles des stades III de la population adjuvante), la réutilisation probable des mêmes patientes dans chacune des publications et l'absence d'une analyse de synthèse de l'ensemble de la cohorte suggère que ces résultats sont issus, au moins en partie, d'analyse statistiques non planifiées ni définies à l'avance. En l'absence de correction du « p », des biais de type test multiples d'hypothèses (*multiple hypothesis testing*) peuvent donc intervenir. Il faut noter par ailleurs que ces résultats n'ont pas été reproduits à ce jour par d'autres équipes.

Pour éviter les faux positifs liés à la présence de transcrits légitimes ou illégitimes dans le sang, de nombreuses autres équipes de biologie moléculaire ont rapporté des études (concluant à un impact pronostique de la détection des CTC) avec des marqueurs couplés : CK19 et MUC1 (n=94) (16), MAGE-A3, Stanniocalcine et GalNact (n=90) (51) ou encore CK19, ACE, c-Met, HER2, mammaglobine (n=102) (52). Ce couplage des marqueurs est la base de la détection (non quantitative) des CTC par la technique Adnagen® (53).

Conclusion

Les perspectives d'utilisation des CTC sont nombreuses dans le cancer du sein, mais aussi dans d'autres types de cancers (54).

D'un point de vue diagnostique, il s'agirait de permettre éventuellement le **diagnostic de maladie tumorale** dès lors qu'elles ont atteint un stade invasif. Cette approche, encore non développée, demande des techniques hautement sensibles (pour limiter les faux négatifs, même à un stade localisé peu invasif de la maladie) et si possible spécifique (pour limiter les faux positifs), reposant sur une analyse visuelle morphologique des CTC à la recherche des atypies cytonucléaires tumorales. Plus simplement, il peut s'agir de **l'affirmation d'une rechute métastatique** lors du suivi en situation adjuvante, face à une potentielle localisation secondaire difficile à biopsier ou face à une augmentation isolée de marqueurs sériques. En situation diagnostique, les éléments strictement anatomopathologiques de type grade histopronostique pourraient par ailleurs être remplacés par les signatures de grade génomique (55), appliquées aux CTC. Il n'existe pour l'instant aucune étude publiée dans ces domaines.

Les CTC pourraient ensuite permettre une **caractérisation des cibles thérapeutiques et/ ou des mutations** (voire des signatures génomiques) présentes dans les cellules tumorales, les CTC étant le reflet de la tumeur initiale. Dans le cancer du sein, cette concordance CTC/tumeur a été rapportée pour l'expression de HER2 dans 3 publications différentes (43, 56, 57). Une étude récente faite par microfluidique a aussi permis de caractériser dans les CTC le statut mutationnel d'EGFR dans des tumeurs pulmonaires (58). Outre éviter une biopsie parfois invasive, les CTC auraient l'avantage de permettre un suivi répété de ces paramètres tumoraux au long de la maladie ; ce type de suivi est important, compte tenu des changements moléculaires survenant entre une tumeur primitive et ses métastases, ainsi qu'au cours de l'acquisition de résistance aux traitements reçus. Cela permettrait idéalement de réaliser, un traitement « à la carte » des tumeurs, quel que soit le nombre de traitement antérieurement reçus (59, 60). Les CTC peuvent dans ce cadre servir à **l'évaluation de phase I**, particulièrement pour la **sélection des patients éligibles aux différentes thérapies ciblées**, comme cela a été démontré dans le cancer de la prostate (61). Par ailleurs, la majeure partie des études rapporte que la détection de CTC, chez les patientes atteintes de cancer du sein, constitue un **facteur pronostique péjoratif**, au moins en situation métastatique. La transcription en clinique de ce type d'information pronostique peut trouver sa place dans les situations de rechute métastatique habituellement traitées par hormonothérapie (localisation osseuse isolée...), permettant d'isoler un sous-groupe de patientes au profil pronostique défavorable nécessitant une prise en charge par chimiothérapie.

Enfin, en cours de traitement des cancers du sein métastatiques, **le suivi numérique des CTC est un marqueur biologique précoce de réponse tumorale** qui permet d'adapter après 1 cycle la chimiothérapie sans attendre l'évaluation radiologique habituellement faite après 3 ou 4 cycles de chimiothérapie. Le suivi par CTC semble apporter des informations indépendante de l'évaluation par radiologie et marqueurs sériques (31,32). L'essai BrAT mené par le CALG-B avec le système

CellSearch a ainsi pour objectif principal de démontrer une amélioration de la survie globale des patientes suivies par CTC. Malheureusement, de nombreux défauts conceptuels (diminution de la dose densité des chimiothérapies, hypothèses statistiques peu réalistes) compromettent fortement la réussite de cet essai, qui est actuellement très en retard par rapport à ses objectifs d'inclusion.

Il faut toutefois rappeler qu'en l'absence de données cliniques issues d'études randomisées, **les recommandations de l'ASCO en 2007 étaient de ne pas utiliser en pratique quotidienne la détection des CTC** dans le management du cancer du sein (58). Des essais randomisés intégrant cet outil dans la stratégie de prise en charge du cancer du sein restent donc à mettre en place.

Bibliographie

1. 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(1):5-10.
2. Cottu PH, Asselah J, Lae M, Pierga JY, Dieras V, Mignot L, et al. Intratumoral heterogeneity of HER2/neu expression and its consequences for the management of advanced breast cancer. *Ann Oncol* 2008;19(3):595-7.
3. Santinelli A, Pisa E, Stramazzotti D, Fabris G. HER-2/neu antigen loss in metastatic breast tumors-A pathological point of view. *Int J Cancer* 2008;123(6):1478-1479.
4. Cristofanilli M, Mendelsohn J. Circulating tumor cells in breast cancer: Advanced tools for "tailored" therapy? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(46):17073-4.
5. Braun S, Vogl FD, Schneitter A, Egle D, Auer D, Lang M, et al. Disseminated tumor cells: are they ready for clinical use? *Breast* 2007;16 Suppl 2:S51-4.
6. Tsavellas G, Huang A, McCullough T, Patel H, Araia R, et al. Flow cytometry correlates with RT-PCR for detection of spiked but not circulating colorectal cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2002;19(6):495-502.
7. Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 2004;5(2):79-88.
8. Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 2004;35(1):122-8.
9. Jung R, Krüger W, Hosch S, Holweg M, Kröger N, Gutensohn K, et al. Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *Br J Cancer* 1998;78(9):1194-8.
10. 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(1):63-9.
11. Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schutze K, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells : a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 2000;156(1):57-63.
12. Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Luchtenborg M, Sinnett HD, et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol* 2000;18(7):1432-9.
13. Lambrechts AC, Bosma AJ, Klaver SG, Top B, Perebolte L, van't Veer LJ, et al. Comparison of immunocytochemistry, reverse transcriptase polymerase chain reaction, and nucleic acid sequence-based amplification for the detection of circulating breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1999;56(3):219-31.
14. de Crémoux P, Extra JM, Denis MG, Pierga JY, Boursstyn E, Nos C, et al. Detection of MUC1-expressing mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 2000;6(8):3117-22.
15. Bosma AJ, Weigelt B, Lambrechts AC, Verhagen OJ, Prunel R, Hart AA, et al. Detection of circulating breast tumor cells by differential expression of marker genes. *Clin Cancer Res* 2002;8(6):1871-7.
16. Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, Granotier C, Morat L, Armand JP, et al. Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999;5(5):971-5.
17. Pierga JY, Bidard FC, Denis MG, de Cremoux P. Prognostic value of peripheral blood double detection of CK19 and MUC1 mRNA positive cells detected by RT-quantitative PCR in 94 breast cancer patients with a follow up of 9 years. *Mol Oncol* 2007;1:267-268.
18. Iakovlev VV, Goswami RS, Vecchiarelli J, Arneson NC, Done SJ. Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Res Treat* 2008;107(1):145-54.
19. Kowalewska M, Chechlinska M, Markowicz S, Kober P, Nowak R. The relevance of RT-PCR detection of disseminated tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes. *Eur J Cancer* 2006;42(16):2671-4.

20. Riethdorf S, Pantel K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. *Pathobiology*. 2008;75(2):140-8.
21. Vincent-Salomon A, Bidard FC, Pierga JY. Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues. *J Clin Pathol*. 2008;61(5):570-6.
22. Kraeft SK, Ladanyi A, Galiger K, Herlitz A, Sher AC, et al. Reliable and sensitive identification of occult tumor cells using the improved rare event imaging system. *Clin Cancer Res*. 2004;10(9):3020-8.
23. Zieglschmid V, Hollmann C, Gutierrez B, Albert W, Strothoff D, Gross E, et al. Combination of immunomagnetic enrichment with multiplex RT-PCR analysis for the detection of disseminated tumor cells. *Anticancer Res* 2005;25(3A):1803-10.
24. Kraeft SK, Sutherland R, Gravelin L, Hu GH, Ferland LH, Richardson P, et al. Detection and analysis of cancer cells in blood and bone marrow using a rare event imaging system [In Process Citation]. *Clin Cancer Res* 2000;6(2):434-42.
25. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004;10(20):6897-904.
26. 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(3):920-8.
27. Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW, Miller MC, Doyle GV, Pienta KJ, et al. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res* 2005;65(12):4993-7.
28. 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(8):781-91.
29. 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(7):1420-30.
30. 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(14 Pt 1):4218-24.
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(21):6403-9.
32. 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(6):471-9.
33. Rack B, Schindlbeck C, Schneeweiss A, et al. Prognostic relevance of circulating tumor cells (CTCs) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy: The German SUCCESS-Trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2008;26:abstr 503.
34. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, Brain E, Delaloge S, Giacchetti S, et al. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):7004-10.
35. Camara O, Rengsberger M, Egbe A, Koch A, Gajda M, Hammer U, et al. The relevance of circulating epithelial tumor cells (CETC) for therapy monitoring during neoadjuvant (primary systemic) chemotherapy in breast cancer. *Ann Oncol* 2007;18(9):1484-92.
36. Bidard FC, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Dieras V, Mathiot C, Mignot L, et al. Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells. *Ann Oncol* 2008;19:496-500.
37. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol* 2008;26(8):1208-15.
38. Wulfig P, Borchard J, Buerger H, Heidl S, Zanker KS, Kiesel L, et al. HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12(6):1715-20.

39. Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10(4):1392-400.
40. Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, et al. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer* 2006;118(8):2013-9.
41. Muller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* 2005;11(10):3678-85.
42. Nagrath 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(7173):1235-9.
43. 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(6):711-8.
44. 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(23):3756-62.
45. 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.
46. 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(9):2593-600.
47. 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(11):883-9.
48. Souglakos J, Vamvakas L, Apostolaki S, Perraki M, Saridaki Z, Kazakou I, et al. Central nervous system relapse in patients with breast cancer is associated with advanced stages, with the presence of circulating occult tumor cells and with the HER2/neu status. *Breast Cancer Res* 2006;8(4):R36.
49. Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, Bozionelou V, Agelaki S, Kanellou P, et al. Circulating HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance. *Ann Oncol* 2007;18(5):851-8.
50. 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(33):5194-202.
51. Nakagawa T, Martinez SR, Goto Y, Koyanagi K, Kitago M, Shingai T, et al. Detection of circulating tumor cells in early-stage breast cancer metastasis to axillary lymph nodes. *Clin Cancer Res* 2007;13(14):4105-10.
52. 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(2):279-88.
53. Zieglschmid V, Hollmann C, Mannel J, Albert W, Jaeschke-Melli S, Eckstein B, et al. Tumor-associated gene expression in disseminated tumor cells correlates with disease progression and tumor stage in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2007;27(4A):1823-32.
54. Hart LS, El-Deiry WS. Invincible, but not invisible: imaging approaches toward in vivo detection of cancer stem cells. *J Clin Oncol*. 2008;26(17):2901-10.
55. Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Lallemand F, Tutt AM, Gillet C, et al. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *J Clin Oncol* 2007;25(10):1239-46.

56. Fehm T, Becker S, Duerr-Stoerzer S, Sotlar K, Mueller V, Wallwiener D, et al. Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status. *Breast Cancer Res* 2007;9(5):R74.
57. Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Saboorian H, Haley B, et al. uPAR and HER-2 gene status in individual breast cancer cells from blood and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(46):17361-5.
58. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, et al. Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells. *N Engl J Med* 2008.
59. de Azambuja E, Cardoso F, Meirman L, Strahle C, Dolci S, Vantongelen K, et al. [The new generation of breast cancer clinical trials: the right drug for the right target]. *Bull Cancer* 2008;95(3):352-7.
60. Larsimont D, Durbecq V, Awada A, Di Leo A. [HER2 and topoisomerase II alpha: useful clinical markers in breast cancer]. *Bull Cancer* 2008;95(3):344-51.
61. de Bono JS, Attard G, Adjei A, Pollak MN, Fong PC, Haluska P, et al. Potential applications for circulating tumor cells expressing the insulin-like growth factor-I receptor. *Clin Cancer Res* 2007;13(12):3611-6.
62. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(33):5287-312.
63. Mueller V, Riethdorf S, Loibl S, et al. Prospective monitoring of circulating tumor cells in breast cancer patients treated with primary systemic therapy--A translational project of the German Breast Group study GeparQuattro. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007;25:21085.
64. Lucci A, Krishnamurthy S, Mosalpuria K, et al. Global evaluation of minimal residual disease in primary breast cancer patients. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2008;26:abstr 1020.
65. Liu MC, Isaacs C, Warren R, et al. Circulating tumor cells (CTC): A reliable predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer (MBC). *J Clin Oncol* 2008;26:abstr 11018.
66. Yagata H, Nakamura S, Toi M, Bando H, Ohno S, Kataoka A. Evaluation of circulating tumor cells in patients with breast cancer: multi-institutional clinical trial in Japan. *Int J Clin Oncol* 2008;13(3):252-256.
67. Nole F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, et al. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol* 2008;19(5):891-7.
68. Garcia-Saenz JA, Martin M, Maestro M, Vidaurreta M, Veganzones S, Villalobos L, et al. Circulating tumoral cells lack circadian-rhythm in hospitalized metastatic breast cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2006;8(11):826-9.
69. Mohamed H, McCurdy LD, Szarowski DH, Duva S, Turner JN, Caggana M. Development of a rare cell fractionation device: application for cancer detection. *IEEE Trans Nanobioscience* 2004;3(4):251-6.