

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2013/072584 A2**

(43) Date de la publication internationale  
23 mai 2013 (23.05.2013)

(51) Classification internationale des brevets : Non classée

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2012/000470

(22) Date de dépôt international :  
19 novembre 2012 (19.11.2012)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
PCT7FR2011/052688  
17 novembre 2011 (17.11.2011) FR

(71) Déposant : INSTITUT GUSTAVE ROUSSY [FR/FR];  
39, rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif Cedex (FR).

(72) Inventeurs : BARTHELEMY, Amélie; 51, avenue du  
Moulin de Saquet, F94400 Vitry sur Seine (FR). FA-  
RACE, Françoise; 58, rue Louis Rolland, F-92120 Mon-  
trouge (FR). OULHEN, Marianne; 237, rue de Crimée, F-  
75019 Paris (FR). VALENT, Alexander; 9, rue Greneta,  
F-75003 Paris (FR). VIELH, Philippe; 49, boulevard Des-  
granges, F-92330 Sceauxfrfr (FR). MASSARD, Chris-  
tophe; 16, rue Ste Marthe, F-75010 Paris (FR).

(74) Mandataire : GROSSET-FOURNIER, Chantal; 54, rue  
Saint-Lazare, F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,  
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,  
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,  
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,  
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,  
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,  
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,  
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,  
ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,  
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,  
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,  
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,  
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))

(54) Title : METHOD FOR CHARACTERIZING CIRCULATING TUMOR CELLS, AND USE THEREOF IN DIAGNOSIS

(54) Titre : MÉTHODE DE CARACTÉRISATION DE CELLULES TUMORALES CIRCULANTES ET APPLICATION AU  
DIAGNOSTIC

(57) Abstract : The invention relates to a method for characterizing, in a biological sample, circulating tumor cells (CTCs) having at least one marker characteristic of the neoplastic nature of the cell, said marker being selected from the groups consisting of: oncogenic proteins characteristic of the CTCs, except for the proteins coded by the EML4-ALK fusion gene; and tumor markers. The invention also relates to the use of said method in the decision to use a treatment on a patient suffering from cancer.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet une méthode de caractérisation, dans un échantillon biologique de cellules tumorales circulantes (CTC) porteuses d'au moins un marqueur caractéristique de la nature tumorale de la cellule, ledit marqueur étant choisi dans les groupes constitués par : - les protéines oncogéniques caractéristiques des CTC, à l'exception des protéines codées par le gène de fusion EML4-ALK, et - les marqueurs tumoraux. L'invention concerne également l'utilisation de cette méthode pour décider de la mise en œuvre d'un traitement chez un patient atteint d'un cancer.



WO 2013/072584 A2

## **Méthode de caractérisation de cellules tumorales circulantes et application au diagnostic**

5 La présente invention a pour objet une nouvelle méthode de caractérisation de cellules tumorales circulantes (CTC) ainsi que les utilisations de cette méthode pour décider de la mise en œuvre d'un traitement antitumoral, diagnostiquer l'état d'avancement d'un cancer et prognostiquer l'évolution de la maladie chez un patient.

10

Les cellules tumorales circulantes jouent un rôle crucial dans le processus métastatique, et leur analyse peut fournir des informations importantes pour le pronostic d'un patient. Elles constituent en outre un matériel tumoral facilement accessible par des méthodes non invasives, représentatif en temps réel de la

15 maladie métastatique. Dans le contexte du développement de la médecine personnalisée des cancers, la détection de la présence dans des CTC de marqueurs moléculaires cibles d'un traitement antitumoral, peut permettre de sélectionner les patients susceptibles de bénéficier de ce traitement voire d'évaluer au niveau individuel la réponse ou la résistance à ce même traitement.

20

La sélection des patients susceptibles de bénéficier d'un traitement ciblé antitumoral est actuellement basée sur la recherche de marqueurs moléculaires dans des biopsies de métastases. La présente méthode permet de réaliser cette recherche sur des CTC, complétant voire se substituant à l'analyse de la biopsie tumorale.

25

Les difficultés actuelles de détection des CTC sont liées à leur présence en faible nombre dans le sang. Dans le contexte des traitements ciblés antitumoraux, le diagnostic de la présence d'un marqueur moléculaire dans des CTC doit donc être réalisé sur très peu de cellules. Pour établir de façon

30 certaine ce diagnostic, différentes analyses doivent donc être réalisées en parallèle sur les cellules afin de montrer d'une part la nature tumorale des CTC sur la base du phénotype (marqueurs tumoraux), de la morphologie et d'une anomalie moléculaire impliquée dans l'oncogénèse (exemple : remaniement du gène ALK, amplification du gène HER2).

Lecharpentier et al (2011) décrit une méthode de détection des CTC dans un échantillon sanguin, basée sur la co-expression par lesdites cellules de marqueurs spécifiques de cellules épithéliales et de marqueurs spécifiques de  
5 cellules mésenchymateuses. Cette méthode met en œuvre l'utilisation combinée de trois marquages fluorescents et requiert une analyse morphocytologique complémentaire, pratiquée par un cytopathologiste expérimenté.

La méthode selon la présente invention offre une solution alternative pour la  
10 détection des CTC ne requérant pas la présence d'un cytopathologiste patenté, car elle combine une véritable analyse morphologique, une identification phénotypique des cellules par immunomarquage fluorescent et la détection au niveau génomique de la présence de séquences particulières d'ADN, telles que des réarrangements caractéristiques de cellules cancéreuses.

15 La combinaison, selon la méthode de l'invention, de deux techniques différentes de détection et de deux niveaux d'analyse différents, appliquées sur un même échantillon biologique, confère à ce diagnostic une sensibilité et une fiabilité élevée. Plus particulièrement, la méthode selon la présente invention constitue un test diagnostique permettant de poser l'indication d'un traitement antitumoral  
20 ciblé contre la protéine oncogénique ALK chez les patients atteints de cancer.

La méthode de détection selon l'invention est maintenant décrite de façon détaillée.

25 La présente invention a pour objet une méthode d'identification, dans un échantillon biologique et notamment un échantillon sanguin, de cellules tumorales circulantes (CTC) porteuses d'au moins un marqueur caractéristique de la nature tumorale de la cellule, ledit marqueur étant choisi dans les groupes constitués par :

- 30 - les protéines oncogéniques caractéristiques des CTC, et  
- les marqueurs tumoraux,

ladite méthode comprenant les étapes suivantes :

a. Identification, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, d'au moins un signal témoin de la présence de CTC, notamment du signal caractérisant la présence d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale des CTC,

5

b. Détection, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, à l'aide d'une technique de type FISH, du signal associé à la présence d'un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule,

10 c. Comparaison de la localisation sur le support des signaux obtenus dans les étapes a et b et identification des CTC.

L'invention a pour avantage de combiner, sur le même support, un marquage phénotypique et une analyse par une méthode de type FISH, qui préservent l'intégrité des CTC.

15

L'échantillon biologique, et notamment l'échantillon sanguin, provient d'un patient atteint d'un cancer.

20 Selon un mode particulier de la méthode d'identification, les cellules tumorales circulantes (CTC) sont d'origine épithéliale et mésenchymateuse.

Au sens de la présente invention, la méthode d'identification des CTC est également appelée méthode d'enrichissement des CTC ou méthode de caractérisation des CTC. Les trois expressions sont équivalentes et peuvent être employées indifféremment. La méthode d'enrichissement utilisée selon la présente invention est la méthode ISET.

25

Selon un mode particulier de la méthode d'identification, les cellules provenant de l'échantillon biologique servant à l'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC et à la détection du signal associé à la présence d'un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule, à l'exception du gène de fusion EML4-ALK sont isolées selon leur taille qui varie de 8  $\mu\text{m}$  à au moins 40  $\mu\text{m}$ .

30

Selon un premier aspect particulier, l'invention a pour objet une méthode d'identification, dans un échantillon biologique provenant d'un patient, de cellules tumorales circulantes (CTC) porteuses du gène de fusion EML4-ALK, ladite méthode comprenant les étapes suivantes :

- 5 a. Identification, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, d'au moins un signal témoin de la présence de CTC, notamment du signal caractérisant la présence d'une protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,
  - b. Détection, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon  
10 biologique, à l'aide d'une technique de type FISH, du signal associé à la présence du gène de fusion EML4-ALK,
  - c. Comparaison de la localisation sur le support des signaux obtenus dans les étapes a et b et identification des CTC.
- 15 Selon ce premier aspect de l'invention, la méthode détecte la présence du gène de fusion EML4-ALK, par la technique de FISH, et identifie morphologiquement et phénotypiquement les CTC, et notamment la présence de la protéine codée par ledit gène de fusion.
- 20 La protéine de fusion EML4-ALK a une puissante activité oncogénique et un rôle clé dans la cancérogénèse chez une sous population de patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (également appelé cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC)). Cette activité qui peut être bloquée par des petites molécules, notamment des inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant ALK, est  
25 une cible moléculaire importante dans le traitement de ces cancers.

Selon un deuxième aspect particulier, l'invention a pour objet une méthode d'identification, dans un échantillon biologique provenant d'un patient, de cellules tumorales circulantes (CTC) porteuses d'au moins un marqueur  
30 caractéristique de la nature tumorale de la cellule, ledit marqueur étant choisi dans les groupes constitués par :

- les protéines oncogéniques caractéristiques des CTC, à l'exception du gène de fusion EML4-ALK, et
- les marqueurs tumoraux,

ladite méthode comprenant les étapes suivantes :

- a. Identification, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, d'au moins un signal témoin de la présence de CTC, notamment du signal caractérisant la présence d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale des CTC, à l'exception d'une protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,
- b. Détection, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, à l'aide d'une technique de type FISH, du signal associé à la présence d'un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule, à l'exception du gène de fusion EML4-ALK,
- c. Comparaison de la localisation sur le support des signaux obtenus dans les étapes a et b et identification des CTC,

Toujours selon ce deuxième aspect, l'invention a pour objet une méthode d'identification, dans un échantillon biologique, notamment un échantillon sanguin, de cellules tumorales circulantes (CTC) porteuses d'au moins un marqueur caractéristique de la nature tumorale de la cellule, ledit marqueur étant choisi dans les groupes constitués par :

- les protéines oncogéniques caractéristiques des CTC, à l'exception d'une protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK, et
- les marqueurs tumoraux,

ladite méthode comprenant les étapes suivantes :

- a. Identification, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, d'au moins un signal témoin de la présence de CTC, notamment du signal caractérisant la présence d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale des CTC, à l'exception d'une protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,
- b. Détection, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, à l'aide d'une technique de type FISH utilisant des sondes spécifiques de remaniement ou d'amplification, du signal associé à la présence

d'un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule, à l'exception du gène de fusion EML4-ALK,

- 5 c. Comparaison de la localisation sur le support des signaux obtenus dans les étapes a et b et identification des CTC.

La méthode de détection des CTC décrite dans la publication de Charpentier et al (2011) décrit une méthode de détection de CTC comprenant, d'une part, l'utilisation combinée de trois marquages fluorescents et, d'autre part, une  
10 analyse morphocytologique pratiquée par un cytopathologiste expérimenté. Ce document ne divulgue pas une méthode de détection de CTC combinant des marquages phénotypiques fluorescents et une analyse automatisée de la morphologie des cellules ; il ne divulgue pas non plus une méthode combinant la détection phénotypique des cellules par immunomarquage fluorescent et la  
15 détection au niveau chromosomique de la présence de séquences particulières d'ADN. Enfin, ce document ne divulgue pas une méthode de détection combinant une détection automatisée de la morphologie des cellules, une détection phénotypique par immunomarquage fluorescent et une détection moléculaire par l'utilisation de procédés de type FISH (Fluorescence In Situ  
20 Hybridisation).

Selon un autre aspect, la méthode d'identification selon l'invention comprend les étapes suivantes :

- 25 a. Identification, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, d'au moins un signal témoin de la présence de CTC, notamment du signal caractérisant la présence d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule à l'exception du gène de la protéine de fusion EML4-ALK,
- b. Détection, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon  
30 biologique, à l'aide d'une technique de type FISH, du signal associé à la présence du gène de fusion EML4-ALK,
- c. Comparaison de la localisation sur le support des signaux obtenus dans les étapes a et b et identification des CTC,

Selon cet aspect, la méthode détecte, d'une part, la présence du gène de fusion EML4-ALK et, d'autre part, la présence d'une protéine autre qu'une protéine codée par ledit gène de fusion.

5 Selon un autre aspect, la méthode d'identification selon l'invention comprend les étapes suivantes :

a. Identification, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, d'au moins un signal témoin de la présence de CTC,  
10 notamment du signal caractérisant la présence d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule, à l'exception d'une protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,

b. Détection, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon  
15 biologique, à l'aide d'une technique de type FISH utilisant des sondes spécifiques de remaniement ou d'amplification, du signal associé à la présence du gène codant pour la susdite protéine,

c. Comparaison de la localisation sur le support des signaux obtenus dans les  
20 étapes a et b et identification des CTC.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet une méthode comprenant les étapes suivantes :

a. Identification, sur un support comprenant les cellules provenant de  
25 l'échantillon biologique, d'au moins un signal témoin de la présence de CTC, notamment du signal caractérisant la présence d'un marqueur tumoral,

b. Détection, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, à l'aide d'une technique de type FISH, du signal associé à la présence d'un gène codant pour une protéine oncogénique caractéristique des  
30 CTC, à l'exception des protéines codées par le gène de fusion EML4-ALK, et

c. Comparaison de la localisation sur le support des signaux obtenus dans les étapes a et b et identification des CTC,

Toujours selon cet autre aspect, la méthode d'identification selon l'invention comprend les étapes suivantes :

- 5 a. Identification, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, d'au moins un signal témoin de la présence de CTC, notamment du signal caractérisant la présence d'un marqueur tumoral,
- 10 b. Détection, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, à l'aide d'une technique de type FISH utilisant des sondes spécifiques de remaniement ou d'amplification, du signal associé à la présence d'un gène codant pour une protéine oncogénique caractéristique des CTC, à l'exception des protéines codées par le gène de fusion EML4-ALK, et
- 15 c. Comparaison de la localisation sur le support des signaux obtenus dans les étapes a et b et identification des CTC.

Selon cet aspect, la méthode détecte, d'une part, la présence du gène codant pour une protéine oncogénique caractéristique des CTC et d'autre part, la présence d'un marqueur tumoral.

20

La combinaison de marqueurs de nature différente dans les étapes a et b de la méthode présente l'avantage particulier d'offrir une meilleure caractérisation des cellules, d'où la plus grande fiabilité du diagnostic.

- 25 Selon un aspect particulier, la méthode selon l'invention comporte une étape d'enrichissement de l'échantillon biologique en CTC, préalable ou inhérente aux étapes d'identification des différents signaux, le facteur d'enrichissement des cellules en CTC étant compris d'environ 1/100 à environ 1/100.000.

- 30 Lorsque le support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique est un filtre, notamment un filtre ISET (commercialisé par la société Rarecell ou Screencell) , la filtration de l'échantillon sanguin conduit, de façon inhérente à la filtration, à un enrichissement des cellules en CTC. L'approche sur filtres permet d'obtenir généralement plus de cellules pour asseoir le diagnostic. Les filtres

sont beaucoup délicats que tout autre support (pas de planéité, problèmes de bruit de fond et de pores). La taille des pores de ces filtres détermine la taille des cellules qui vont pouvoir être retenues sur le filtre, ladite taille des cellules pouvant varier de 8  $\mu\text{m}$  à au moins 40  $\mu\text{m}$ .

5

Lorsque le support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique est une lame, l'étape d'enrichissement a lieu lors de la séparation immunomagnétique, et est préalable au dépôt sur lame.

10 Cet enrichissement est de l'ordre d'un facteur environ 1/100 à un facteur environ 1/100.000, selon la méthode d'enrichissement utilisée et varie d'un patient à l'autre.

15 Selon un aspect plus particulier, l'invention a pour objet une de méthode dans laquelle le dépôt des cellules provenant de l'échantillon biologique du patient est réalisé sur un support approprié pouvant être analysé à l'aide d'un appareil de type microscope à fluorescence ou scanner, ledit support pouvant être un filtre ou une lame.

20 Le support utilisé pour le dépôt de l'échantillon biologique peut être analysé dans un microscope, comme par exemple un microscope à fluorescence, un scanner, ou tout autre appareil permettant la lecture d'un support, que la lecture soit manuelle ou automatisée. Comme indiqué précédemment, le support peut être un filtre, une lame, ou tout autre support adapté au dépôt de l'échantillon et à la  
25 lecture des signaux dans un appareil approprié.

Les inventeurs ont ainsi mis au point une stratégie automatisée grâce à un scanner de lames (notamment le système ARIOL<sup>®</sup> de LEICA) qui consiste à trier les cellules récupérées après filtration (ou après enrichissement par sélection négative) en 2 fractions, l'une CD45(+) et l'autre CD45(-). La fraction CD45(-)  
30 contenant les différentes populations de CTC est ensuite extensivement analysées pour identifier les CTCs purement épithéliales, les CTCs mésenchymateuses, hybrides (épithéliales et mésenchymateuses) ainsi que d'autres populations qui n'exprimerait pas ces marqueurs. Après FISH, les signaux de FISH (réarrangement ALK/EML4) sont relocalisés dans ces

différentes populations. C'est ainsi que les CTCs peuvent être caractérisées phénotypiquement et génotypiquement dans leur globalité.

5 Dans la méthode selon l'invention, les cellules issues de l'échantillon biologique du patient sont recueillies lors de la filtration, pour le dépôt sur filtre, ou déposées sur lame après immuno-séparation magnétique, ou par toute méthode appropriée connue de l'homme du métier.

10 La méthode selon l'invention est maintenant plus particulièrement détaillée pour ce qui concerne l'étape a, c'est à dire l'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC, notamment du signal caractérisant la présence d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale.

15 Selon un aspect particulier, l'invention a pour objet une méthode dans laquelle l'étape d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC est réalisée au moyen d'un immunomarquage en fluorescence mettant en œuvre au moins un marqueur choisi dans l'un des groupes constitué par :

- i. un marqueur de la protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,
- ii. un marqueur de membrane nucléaire ou un marqueur nucléaire,
- 20 iii. un marqueur de cellules hématopoïétiques,
- iv. un marqueur de protéines choisi parmi le groupe constitué par : des marqueurs de protéines caractéristiques des cellules épithéliales et des marqueurs de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

25 Plus particulièrement, l'invention a pour objet une méthode dans laquelle l'étape d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC est réalisée au moyen d'un immunomarquage en fluorescence mettant en œuvre de façon combinée au moins deux marqueurs, chacun étant choisi dans l'un des groupes constitué par :

- 30 i. un marqueur de la protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,
- ii. un marqueur de membrane nucléaire ou un marqueur nucléaire,
- iii. un marqueur de cellules hématopoïétiques,

iv. un marqueur de protéines choisi parmi le groupe constitué par : des marqueurs de protéines caractéristiques des cellules épithéliales et des marqueurs de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

5    Encore plus particulièrement, l'invention a pour objet une méthode dans laquelle l'étape d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC met en œuvre de façon combinée au moins trois marqueurs, chacun étant choisi dans l'un des groupes constitué par :

- i. un marqueur de la protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,
- 10    ii. un marqueur de membrane nucléaire ou un marqueur nucléaire,
- iii. un marqueur de cellules hématopoïétiques,
- iv. un marqueur de protéines choisi parmi le groupe constitué par : des marqueurs de protéines caractéristiques des cellules épithéliales et des marqueurs de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

15

Selon un aspect encore plus particulier, l'invention a pour objet une méthode dans laquelle l'étape d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC met en œuvre de façon combinée quatre marqueurs, chacun étant choisi dans l'un des groupes constitué par :

- 20    i. un marqueur de la protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,
- ii. un marqueur de membrane nucléaire ou un marqueur nucléaire,
- iii. un marqueur de cellules hématopoïétiques,
- iv. un marqueur de protéines choisi parmi le groupe constitué par : des marqueurs de protéines caractéristiques des cellules épithéliales et des
- 25    marqueurs de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

Dans un autre aspect de l'invention en ce qui concerne l'étape a, l'invention a pour objet une méthode dans laquelle l'étape d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC est réalisée au moyen d'un

30    immunomarquage en fluorescence mettant en œuvre au moins un marqueur choisi dans l'un des groupes constitué par :

- i. un marqueur d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule, à l'exception d'un marqueur de la protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,

- ii. un marqueur de membrane nucléaire ou un marqueur nucléaire,
  - iii. un marqueur de cellules hématopoïétiques,
  - iv. un marqueur de protéines choisi parmi le groupe constitué par : les marqueurs de protéines caractéristiques des cellules épithéliales et les
- 5 marqueurs de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

Plus particulièrement, l'invention a pour objet une méthode dans laquelle l'étape d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC est réalisée au moyen d'un immunomarquage en fluorescence mettant en œuvre de façon

10 combinée au moins deux marqueurs, chacun étant choisi dans l'un des groupes constitué par :

- i. un marqueur d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule, à l'exception d'un marqueur de la protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,
- 15 ii. un marqueur de membrane nucléaire ou un marqueur nucléaire;
- iii. un marqueur de cellules hématopoïétiques,
- iv. un marqueur de protéines choisi parmi le groupe constitué par : des marqueurs de protéines caractéristiques des cellules épithéliales et des marqueurs de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

20

Encore plus particulièrement, l'invention a pour objet une méthode dans laquelle l'étape d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC met en œuvre de façon combinée au moins trois marqueurs, chacun étant choisi dans l'un des groupes constitué par :

- 25 i. un marqueur d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule, à l'exception d'un marqueur de la protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,
- ii. un marqueur de membrane nucléaire ou un marqueur nucléaire,
- iii. un marqueur de cellules hématopoïétiques,
- 30 iv. un marqueur de protéines choisi parmi le groupe constitué par : des marqueurs de protéines caractéristiques des cellules épithéliales et des marqueurs de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

Selon un aspect encore plus particulier, l'invention a pour objet une méthode dans laquelle l'étape d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC met en œuvre de façon combinée quatre marqueurs, chacun étant choisi dans l'un des groupes constitué par :

- 5 i. un marqueur d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule, à l'exception d'un marqueur de la protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,
- ii. un marqueur de membrane nucléaire ou un marqueur nucléaire,
- iii. un marqueur de cellules hématopoïétiques,
- 10 iv. un marqueur de protéines choisi parmi le groupe constitué par : des marqueurs de protéines caractéristiques des cellules épithéliales et des marqueurs de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

Selon un autre aspect particulier, l'invention a pour objet une méthode dans  
15 laquelle le marqueur spécifique de la protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK sont les clones 5A4 ou D5F3, commercialisés par les sociétés AbCam®, Cell Signaling Technology®.

Selon un autre aspect particulier, l'invention a pour objet une méthode dans  
20 laquelle le marqueur spécifique des protéines oncogéniques caractéristiques des CTC est choisi parmi les marqueurs des protéines codées par les gènes HER2, ERG et cMet.

Dans un autre aspect particulier, l'invention a pour objet une méthode dans  
25 laquelle le marqueur de membrane nucléaire utilisé est le marqueur Emerin.

Ainsi, l'émerine est utilisée en tant que marqueur de la membrane nucléaire des CTC pour identifier la nature tumorale des CTC en les différenciant des cellules hématopoïétiques et autres cellules normales. Il peut être utilisé pour les CTC provenant de tout type de tumeurs.

30 L'étape de caractérisation morphologique repose soit sur l'introduction d'un marqueur de la membrane nucléaire (comme l'émerine) dans le quadruple marquage fluorescent, soit sur la réalisation d'une étape de coloration des noyaux (comme l'hémaroxyline/éosine) après le marquage IF qui doit aussi être éliminée dans l'étape intermédiaire de lavage entre IF et FISH.

Selon un autre aspect particulier, l'invention a pour objet une méthode dans laquelle le marqueur nucléaire utilisé est choisi dans le groupe constitué par : le marqueur DAPI, les marqueurs Syto59, Sytox Orange, TOPRO 3, Hoescht 33342.

Selon un autre aspect particulier, l'invention a pour objet une méthode dans laquelle le marqueur de cellules hématopoïétiques est choisi dans le groupe constitué par : CD45 et CD31. Le marqueur utilisé est de préférence CD45.

Bien que très rares, les CTCs sont connues pour être hétérogènes et composées de différentes sous populations. L'approche selon la présente invention permet d'identifier et de caractériser les différentes sous populations de CTC, purement épithéliales, purement mésenchymateuses, hybrides (épithéliales et mésenchymateuses) ainsi que d'autres populations qui n'exprimeraient pas ces marqueurs. Seules les approches de filtration ou de sélection négative des CTCs par élimination des cellules hématopoïétiques peuvent donner accès à ces cellules.

Le fait d'analyser et de caractériser toutes les CTCs est un élément important du point de vue de l'application clinique à deux niveaux :

- plus de CTCs (en nombre) sont identifiées et il devient donc possible de les utiliser pour diagnostiquer une anomalie moléculaire et décider d'un traitement ciblé, puis suivre son efficacité ; les méthodes de l'art antérieur ne permettent de récupérer qu'une petite fraction des CTC (CTC épithéliales) et cette fraction trop rare n'est pas utilisable dans ce contexte clinique.

- l'émergence des sous populations très minoritaires, qui vont être porteuses de la résistance aux traitements ciblés et pourront être suivies dans les CTCs de façon à détecter précocement ces résistances, devient détectable ; le clinicien peut offrir ainsi plus tôt, un traitement plus adapté.

Selon un autre aspect particulier, l'invention a pour objet une méthode dans laquelle le marqueur de protéines caractéristiques des cellules épithéliales est choisi dans le groupe constitué par : les marqueurs de EpCAM, les marqueurs de pan-cytokératines et les marqueurs de la cadhérine épithéliale.

Selon un autre aspect particulier, l'invention a pour objet une méthode dans laquelle le marqueur de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses est choisi dans le groupe constitué par : les marqueurs de la vimentine et les marqueurs de la cadhérine neurale.

5

Une réalisation particulière de l'invention objet de l'invention comprend une étape d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC réalisée au moyen d'un immunomarquage en fluorescence mettant en œuvre :

- i. le marqueur de la protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK ou le
- 10 marqueur d'une protéine codée par un gène choisi parmi les gènes HER2, ERG et cMet,
- ii. le marqueur nucléaire DAPI,
- iii. le marqueur de cellules hématopoïétiques CD45,
- iv. un marqueur de pan-cytokératines.

15

Un autre aspect particulier de l'invention a pour objet une méthode de type FISH comprenant les étapes successives suivantes :

- traitement enzymatique du support après fixation,
- hybridation sur le support en présence d'au moins une sonde,
- 20 - localisation de la sonde hybridée sur le support.

La méthode selon l'invention comprend un test de FISH réalisé selon un protocole particulier et avantageux, mis au point par les inventeurs, et utilisant des sondes spécifiques de remaniement ou d'amplification, et non des sondes centromériques. Cette méthode permet donc de détecter spécifiquement la

25 présence de gènes remaniés ou amplifiés dans les cellules.

Lors de la mise en œuvre sur des CTC de tests de FISH réalisés selon des protocoles standards de l'art antérieur, les cellules, qui sont très fragiles, ne

30 résistent pas aux tests, les résultats de ces tests ne sont donc pas utilisables.

Le couplage de l'immunofluorescence (IF) et de la FISH est en fait très délicat pour les raisons suivantes :

- les CTC sont par nature très fragiles du fait du détachement de la tumeur et il est communément admis qu'une très grande partie d'entre elles sont en apoptose,
- l'enchaînement IF plus FISH nécessite d'avoir des méthodes très douces à la fois pour l'IF et la FISH et d'avoir une étape intermédiaire d'élimination de la fluorescence avant la FISH. Si la fluorescence est mal éliminée, il s'en suit un bruit de fond important qui rend la FISH ininterprétable. Le photobleaching est très agressif vis-à-vis des cellules et ne peut en aucun cas être utilisé pour éliminer la fluorescence avant la FISH. Par ailleurs, il est notoire que la FISH est déjà par elle-même très délicate. Les inventeurs ont mis au point des lavages doux successifs qui respectent la fragilité des CTC et évitent les pertes cellulaires,
- compte tenu de la rareté des CTCs, il est important d'en conserver le plus grand nombre. Lors du travail sur filtre, il est indispensable de chauffer les filtres 5min à 98°C pour ancrer les cellules dans le filtre sinon les cellules sont perdues.

Selon un aspect particulier, la méthode selon l'invention est réalisée sur un échantillon sanguin d'un patient. Les échantillons biologiques nécessaires pour diagnostiquer la présence d'un remaniement des gènes ALK et décider d'un traitement ciblé anti-ALK dans les tests selon l'art antérieur sont nécessairement des biopsies tumorales, invasives et souvent de mauvaise qualité, notamment chez les patients atteints de certains cancers tels le CBNPC.

Un autre aspect concerne l'utilisation d'une méthode selon l'invention pour analyser un échantillon biologique provenant d'un patient atteint de cancer présentant le gène ALK transloqué pour le suivi de l'évolution tumorale, pour la prédiction d'un événement de type métastatique ou pour la mesure de l'efficacité d'un traitement anti-cancéreux.

Un autre aspect concerne l'utilisation d'une méthode selon l'invention pour analyser un échantillon biologique provenant d'un patient atteint de cancer présentant le gène ALK transloqué pour le diagnostic de l'indication d'un traitement tumoral contre la protéine ALK.

Plus particulièrement, l'invention a pour objet l'utilisation de la méthode décrite dans le cadre de patients atteints d'un cancer susceptible de conduire à la présence de métastases, notamment le cancer bronchique non à petites  
5 cellules, et tout autre cancer présentant un remaniement du gène ALK.

Une méthode selon l'invention entre donc dans le cadre de la médecine personnalisée avec thérapie antitumorale ciblée.

Selon un aspect particulier, la méthode selon l'invention est réalisée sur un  
10 échantillon sanguin d'un patient. Les échantillons biologiques nécessaires pour diagnostiquer la présence d'une anomalie moléculaire comme une translocation ou une amplification génique et décider d'un traitement ciblé dans les tests selon l'art antérieur sont nécessairement des biopsies tumorales, invasives et souvent de mauvaise qualité, notamment chez les patients atteints de certains cancers  
15 tels le CBNPC ou le cancer de la prostate.

Un autre aspect concerne l'utilisation d'une méthode selon l'invention pour analyser un échantillon biologique notamment un échantillon sanguin provenant d'un patient atteint de cancer présentant une anomalie moléculaire comme une  
20 translocation ou une amplification génique pour le suivi de l'évolution tumorale, pour la prédiction d'un événement de type métastatique ou pour la mesure de l'efficacité d'un traitement anti-cancéreux.

Un autre aspect concerne l'utilisation d'une méthode selon l'invention pour  
25 analyser un échantillon biologique provenant d'un patient atteint de cancer présentant une anomalie moléculaire comme une translocation ou une amplification génique pour le diagnostic de l'indication d'un traitement tumoral ciblant les protéines oncogéniques codée par ces gènes.

30 Plus particulièrement, l'invention a pour objet l'utilisation de la méthode décrite dans la cadre de patients atteints d'un cancer susceptible de conduire à la présence de métastases, notamment le cancer du poumon non à petites cellules, et tout autre cancer présentant un remaniement du gène ALK.

Une méthode selon l'invention entre donc dans le cadre de la médecine personnalisée avec thérapie antitumorale ciblée.

L'invention est maintenant décrite plus en détail à l'aide d'exemples et des figures qui les accompagnent.

### Légende des Figures

Figure 1 : Image de microscopie en fluorescence sur filtre ISET montrant le marquage obtenu sur la lignée H2228 (porteuse de la translocation EML4-ALK) avec l'anticorps monoclonal (5A4 ou D5F3) spécifique de la protéine ALK transloquée. 1A. Marquage obtenu avec le colorant nucléaire DAPI ; 1B. Marquage obtenu avec l'anticorps spécifique de la protéine ALK ; 1C. Marquage obtenu avec l'anticorps spécifique de la protéine ALK et le DAPI.

Figure 2 : Image de microscopie en fluorescence montrant une expérience de FISH sur filtre ISET réalisée sur les CTC d'un patient atteint de carcinome bronchique non à petites cellules. 2A. Exemple d'une cellule hématopoïétique retenue sur le filtre ne présentant pas de translocation; 2B et 2C. Exemple de deux CTCs présentant une translocation. Des sondes spécifiques du point de cassure 2p23 ont été utilisées.

Figure 3: Images de microscopie en fluorescence chez trois patients (P2, P6, P11) représentatifs montrant la détection par FISH du réarrangement ALK dans les CTC et la tumeur du même patient. Différents exemples de CTC sont présentés: CTCs individuelles porteuses uniquement du remaniement ALK (P2), CTCs individuelles porteuses à la fois d'un gain du gène ALK natif et du remaniement ALK (P6), CTC en clusters porteuses du remaniement ALK (P11).

Figure 4: Images de microscopie illustrant la méthode combinant marquage en immunofluorescence 4 couleurs (vimentine/cytokeratines/CD45/DAPI et N-cadherine/E-cadherine/CD45/DAPI) et FISH pour la détection de CTCs

porteuses du remaniement ALK. 4A: Exemple de deux patients montrant le phénotype mésenchymateux des CTC porteuses du réarrangement ALK; 4B: Contrôle positif des marquages en immunofluorescence sur la lignée de cancer bronchique A549.

5

Figure 5: Images de microscopie en fluorescence illustrant la possibilité de suivre par FISH la présence de CTC porteuses d'un remaniement ALK chez des patients atteints de CBNPC ALK positif et traités par un inhibiteur de ALK. Exemple de CTCs détectées chez un patient avant et à jour 30 d'un traitement par le crizotinib. L'utilisation de la méthode permet de mettre en évidence chez ce patient la diminution importante de la taille et du nombre de clusters de CTCs dont certaines portent le réarrangement ALK.

10

Figure 6 : Image de microscopie en fluorescence montrant la détection de l'amplification de HER2 sur filtre ISET. 6A. Exemple d'une expérience de FISH sur la lignée cellulaire SKBR3; 6B. Exemple d'une expérience de FISH sur les CTC d'une patiente porteuse de l'amplification HER2 ; 6C : Exemple de marquage en immunofluorescence avec l'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine HER2 sur les CTC d'une patiente porteuse de l'amplification HER2.

15

20

Figure 7: Image de microscopie en fluorescence montrant dans des lignées cellulaires et des patients atteints de cancer de la prostate ou du sein recueillies sur filtre ISET, la détection par FISH de diverses anomalies moléculaires. A: Détection de l'amplification du gène ERG dans la lignée cellulaire LnCAP; B: Détection du réarrangement du gène ERG dans la lignée cellulaire VCAP; C: Détection de l'amplification du gène AR dans la lignée cellulaire LnCAP; D: Détection de l'amplification du gène HER2 dans la lignée cellulaire SKBR3; E: Détection de l'amplification du gène ERG chez un patient atteint de cancer de la prostate; F: Détection de l'amplification du gène cMYC chez un patient atteint de cancer de la prostate; G: Détection de l'amplification du gène AR chez un patient atteint de cancer de la prostate; H: Détection de l'amplification du gène HER2 chez une patiente atteinte de cancer du sein.

25

30

Figure 8: Images de microscopie illustrant dans des lignées cellulaires (figure 8A) et des CTCs de patients atteints de cancer de la prostate (figure 8B) la méthode automatisée combinant sur filtre ISET le marquage en immunofluorescence 4 couleurs (vimentine/cytokeratines/CD45/DAPI) et FISH pour la détection de CTCs porteuses d'amplification des gènes ERG ou cMYC ou AR.

Figure 9: Images de microscopie illustrant dans la lignée cellulaire de cancer bronchique H1975 la méthode combinant sur filtre ISET le marquage en immunofluorescence (cMet/CD45/DAPI) et FISH; 9A: Détection en immunofluorescence 3 couleurs de la protéine cMET; 9B: Détection de l'amplification cMET; 9C: Méthode combinant marquage immunofluorescence et FISH.

## Exemples

### Exemple 1 : Préparation du support d'analyse

L'échantillon sanguin est enrichi en CTC par filtration basée sur la technique ISET (isolation by size of epithelial tumour cells). Les filtres sont soumis à filtration à très basse pression sur la machine ISET (7mBar), puis séchés sur platine chauffante à 45°C pendant 2 min.

Les filtres sont emballés dans du papier aluminium et ensuite congelés.

### Exemple 2 : Identification morphologique et phénotypique des CTC.

Les cellules sont identifiées par marquage immunofluorescent, sur filtre ISET, des noyaux, de la cytokératine, de CD45 et de la protéine ALK.

Le tampon EDTA 1X pH9 est préparé à partir d'EDTA 10X, puis réchauffé à 98°C.

#### Préparation des anticorps :

Les anticorps sont dilués dans du TBS-Triton à 0,2% et à un volume total de 100µl. Les différentes solutions d'anticorps sont préparées indépendamment puis mélangées.

Les anticorps anti-cytokératine (CK A1/A3 - DAKO) sont couplés au fluorochrome AF546 selon le protocole de couplage du kit Zenon IGAF546 (Invitrogen) .

30µl d'anticorps anti-CD45 APC (BD Biosciences) sont prélevés et seront ajoutés au mélange des différents anticorps.

Les anticorps anti-ALK (Novo-Castra) sont couplés au fluorochrome AF488 selon le protocole de couplage du kit Zenon IGAF488 (Invitrogen).

préparés de la façon suivante : 4 µl d'anticorps à coupler avec le kit de couplage Zenon IgAF488 « mouse » sont ajoutés à 5µl d'IgAF488 et incubés 5min à température ambiante. 5µl de bloquant AF488 sont ajoutés et incubés 5min à température ambiante. La solution d'anticorps est stable 30min.

Les différentes solutions d'anticorps sont rassemblées et leur volume complété à 100µl dans du TBS-Triton 0,4%.

#### Préparation des filtres :

Les filtres sont sortis du congélateur et placés à température ambiante pendant environ 15 min. Les filtres sont fixés sur la lame en utilisant du ruban adhésif résistant aux hautes températures, celui-ci permet également d'identifier les filtres. Les filtres sont ensuite réhydratés dans du TBS pendant 5 mn puis égouttés.

#### Démasquage et immunomarquage :

Les lames sont immergées 5min dans le tampon EDTA 1X pH 9 chauffé au bain-marie à 98°C, elles sont ensuite rincées pendant 2 min dans du TBS et pendant 1min à l'eau distillée puis égoutées. Sur le filtre, les spots (8 mm de

diamètre) sont entourés en utilisant le DakoPen (hydrophobe). Des chambres humides sont préparées à l'aide d'un papier absorbant préalablement passé sous l'eau du robinet. Sur chaque spot, 100µl de la solution préparée d'anticorps sont déposés, puis chaque spot est recouvert avec une lamelle  
5 ronde 12mm de diamètre. Le tout incube pendant une nuit en chambre humide à 4°C et à l'obscurité.

Après incubation, les chambres sont placées à température ambiante pendant 15 min puis rincées dans du TBS-Tween à 0,05% pendant 2 min et égouttées,  
10 rincées dans de l'eau distillée puis égouttées.

100 µl de solution de montage DAPI préalablement diluée sont déposés sur chaque lame, le tout incube pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité. Les lames sont ensuite rincées dans du TBS-Tween à 0,05% pendant 2 min puis égouttées, puis rincées dans de l'eau distillée et égouttées.

15 Les lames et lamelles sont ensuite montées au fluoromount, après 1 h à température ambiante et à l'obscurité, elles sont scellées, avant d'être stockées à 4°C.

La lecture est effectuée au microscope le lendemain, les CTC sont identifiées. et leurs positions sont mémorisées.

### **Exemple 3 : Test de détection du gène de fusion EML4-ALK par la technique de FISH**

25 Ce test est réalisé après le marquage en immunofluorescence.

#### **A. Fixation du matériel**

Après l'analyse des résultats en immunofluorescence, le système lame et  
30 lamelle est démonté et le filtre est lavé dans une solution de PBS 1X avant d'être fixé avec une solution de méthanol/ acide acétique (9 :1) pendant 2 heures à température ambiante.

#### **B. Traitement du filtre immobilisé sur la lame**

Préparation de la pepsine 10% :

Peser 1g à dissoudre dans 10 ml H<sub>2</sub>O, sous agitation magnétique, dans un Erlen. Une fois bien dissous, placer l'Erlen dans de la glace. Aliquoter par 100µl puis les conserver à -20°C).

Une solution de 80 ml de HCl à 0,01N (8 ml HCl 0.1N + 72 ml H<sub>2</sub>O) est préchauffée dans un bain-marie à 37°C.

- 10 Les lames conservées à +4°C sont incubées 5 min dans un bain de 4xSSCT.

- 15 Une aliquote de pepsine est ajoutée au HCl 0,01N, à 37°C. Le filtre est incubé pendant quelques min dans la solution de pepsine, en l'agitant toutes les deux minutes.

Une solution de fixation, formaldéhyde de concentration finale 1%, est préparée de façon extemporanée.

La solution obtenue est stable pendant une journée.

- 20 Les lames sont lavées dans un bac de PBS 1X pendant 5 min sans humidifier le ruban adhésif et sans agitation. Les lames sont ensuite fixées par trempage pendant 2 mn dans la solution de fixation, sans humidifier le ruban adhésif. Les lames sont ensuite déshydratées successivement pendant deux minutes à 70%, 85% et 100% éthanol, sans laisser sécher les lames entre les alcools. L'envers de la lame est essuyé délicatement, le filtre sèche ensuite quelques minutes, et au maximum pendant une heure, sur une plaque à 37°C, ou bien sèche à température ambiante.

**C. Dénaturation des lames et hybridation (J1)**

30

Dans l'obscurité, une boîte hermétique est placée sur la platine allumée à 37°C, cette boîte permettra le transport éventuel de la lame. L'appareil permettant l'hybridation, ou « hybridizer », est mis en marche et programmé afin d'obtenir une température à 37°C. Les lames sont insérées, dans leurs

places respectives, dans l' « hybridizer ». Les deux barrettes se trouvant sur le capot sont humidifiées avec de l'eau, puis replacées sur le couvercle de l'hybridizer afin de minimiser l'évaporation de la sonde. La lame est placée sur la platine à 37°C. Sur chaque spot (8 mm de diamètre) sont déposés

5 10µl de mélange d'hybridation sonde ALK (Vysis) (pour chaque spot sont déposés 7µl de tampon, 2 µl d'eau, 1 µl de sonde). Une petite lamelle ronde (12 mm de diamètre) est posée délicatement sur les spots. La zone d'intérêt est scellée avec de la colle placée autour, afin d'isoler entièrement cette zone. Le séchage de la colle est assuré par dépôt de la lame sur la platine à

10 37°C pendant environ 5 min. La lame est ensuite immédiatement placée dans l'hybridizer afin de ne pas modifier la température de la sonde.

Le programme de dénaturation est démarré à 85°C pendant 10 min, puis l'hybridation a lieu classiquement à 44°C pendant toute une nuit (12 heures)

15 à 44°C. Cette hybridation peut être effectuée dans l'hybridizer ou dans une étuve placée à 44°C. Dans ce dernier cas, après l'étape à 85°C, la lame est très rapidement placée dans la boîte déjà à 37°C sur la platine, puis transférée dans la boîte noire spéciale humide mise à l'avance dans l'étuve à 44°C.

20 L'hybridizer, lorsqu'il est refroidi à 37°C, est arrêté.

#### **D. Lavage et montage (J2)**

Le bain marie est branché à 65°C et la plaque à 37°C, le tampon Wash

25 Buffer 1X Dako est préparé extemporanément.

Le tampon est ensuite préchauffé, en plaçant la moitié du tampon dans un bac en porcelaine qui est placé dans le bain-marie à 65°C sans que la température ne soit atteinte (pour éviter les chocs thermiques), la

30 température est atteinte au bout d'environ 30 min.

L'autre moitié du tampon est placée dans un bac à lames, à température ambiante. La lame est extraite de l'hybridizer ou de l'étuve et transportée si nécessaire dans une boîte noire spéciale pour protéger la lame de la lumière.

Sans lumière, la colle est enlevée très délicatement avec une pince, sans détériorer le filtre. La lame est lavée pendant environ 7 min dans le tampon Stringent Wash Buffer à température ambiante sans agitation. La lame est lavée 5 min dans le tampon préchauffé à 65°C, puis 5 min dans un tampon de lavage Wash Buffer 1X DAKO à température ambiante.

La lame est déshydratée pendant 2 min avec successivement 70%, 85% 100% éthanol, sans laisser sécher entre les alcools.

Le dos de la lame est essuyé délicatement avec du papier absorbant, puis laissée sécher pendant quelques minutes sur la plaque à 37°C, en vérifiant qu'il ne reste pas d'alcool entre la lame et le filtre.

En cas de bruit de fond, les lames peuvent être re-lavées à 70°C pendant 1-5 min.

De 15 à 20 µl d'une solution « antiFad+DAPI » sont déposés sur le filtre et répartis en plusieurs gouttes sur la surface du filtre.

Les lames sont couvertes par une lamelle de 22x22 ou 24x40, le tout est scellé d'un côté de la lamelle, du côté opposé au spot.

La lame est séchée sur la platine chauffante à 37°C pendant environ 5 min.

La lame est transportée dans une boîte noire jusqu'au microscope, et observée en utilisant successivement les grossissements x20, pour repérer le spot, puis x100, avec de l'huile à immersion.

La lame peut être conservée dans l'obscurité pendant 1 semaine à température ambiante ou pendant 1 an à -20°C.

La lecture s'effectue au microscope à fluorescence ou scanner. Les CTC sont relocalisées à partir des positions déjà identifiées lors de l'immunomarquage.

#### **Exemple 4 : Test de détection du gène HER-2 par la technique de FISH**

Ce test est réalisé après le marquage en immunofluorescence.

##### **A. Fixation du matériel**

Après l'analyse des résultats en immunofluorescence, le système lame et lamelle est démonté et le filtre est lavé dans une solution de PBS 1X avant d'être fixé avec une solution de méthanol/ acide acétique (9 :1) pendant 2 heures à température ambiante.

5

## **B. Traitement du filtre immobilisé sur la lame**

### Préparation de la pepsine 10% :

Peser 1g à dissoudre dans 10 ml H<sub>2</sub>O, sous agitation magnétique, dans un Erlen. Une fois bien dissous, placer l'Erlen dans de la glace. Aliquoter par 100µl puis les conserver à -20°C).

Une solution de 80 ml de HCl à 0,01N (8 ml HCl 0.1N + 72 ml H<sub>2</sub>O) est préchauffée dans un bain-marie à 37°C pendant au moins 30 min.

15

Les lames conservées à +4°C sont incubées successivement 5 min dans un bain de 4xSSCT pour décoller la lamelle, si nécessaire la lamelle peut être décollée à l'aide d'une pince, le milieu de montage est éliminé puis le filtre est rincé dans un bain de PBS 1X.

20

Une aliquote de pepsine est ajoutée au HCl 0,01N, à 37°C, le tout est soigneusement mélangé. Le filtre est incubé pendant 6 min dans la solution de pepsine, en l'agitant toutes les deux minutes.

Une solution de fixation contenant 1% de formaldéhyde est préparée de façon extemporanée.

25

Les lames sont lavées dans un bac de PBS1x pendant 5 min sans humidifier le ruban adhésif et sans agitation. Les lames sont ensuite fixées par trempage pendant 2 mn dans la solution de fixation, sans humidifier le ruban adhésif. Les lames sont ensuite déshydratées successivement pendant deux minutes à 70%, 85% et 100% éthanol, sans laisser sécher les lames entre les alcools.. L'envers de la lame est essuyé délicatement, le filtre sèche ensuite quelques minutes, et au maximum pendant une heure, sur une plaque à 37°C, ou bien il sèche à température ambiante.

30

### C. Dénaturation des lames et hybridation (J1)

Dans l'obscurité, une boîte hermétique est placée sur la platine allumée à 37°C, cette boîte permettra le transport éventuel de la lame.

L'appareil permettant l'hybridation, ou « hybridizer » est mis en marche et programmé afin d'obtenir une température à 37°C. Les lames sont insérées, dans leurs places respectives, dans l'« hybridizer ». Les deux barrettes se trouvant sur le capot sont humidifiées avec de l'eau, puis replacées sur le couvercle de l'hybridizer afin de minimiser l'évaporation de la sonde. La lame est placée sur la platine à 37°C. Sur chaque spot (8 mm de diamètre) sont déposés 6 µl de sonde HER-2 (Dako).

Une petite lamelle ronde (12 mm de diamètre) est posée délicatement sur les spots. Les bulles éventuelles sont poussées délicatement en dehors de la surface de la lamelle, par exemple avec un cône. La zone d'intérêt est scellée avec de la colle placée autour, telle du « Rubber-cement », afin d'isoler entièrement cette zone. Le séchage de la colle est assuré par dépôt de la lame sur la platine à 37°C pendant environ 5 min, la qualité parfaite du collage sur les bords est vérifiée. La lame est ensuite immédiatement placée dans l'hybridizer afin de ne pas modifier la température de la sonde.

Le programme de dénaturation est démarré à 85°C pendant 10 min, puis l'hybridation a lieu à 44°C pendant toute une nuit (12 heures) à 44°C. Cette hybridation peut être effectuée dans l'hybridizer ou dans une étuve placée à 44°C. Dans ce dernier cas, après l'étape à 85°C, la lame est très rapidement placée dans la boîte déjà à 37°C sur la platine, puis transférée dans la boîte noire spéciale humide mise à l'avance dans l'étuve à 44°C.

L'hybridizer, lorsqu'il est refroidi à 37°C, est arrêté.

### D. Lavage et montage (J2)

Le bain marie est branché à 65°C et la plaque à 37°C, le tampon Wash Buffer 1X Dako est préparé extemporanément.

Le tampon est ensuite préchauffé, en plaçant la moitié du tampon dans un bac en porcelaine qui est placé dans le bain-marie à 65°C sans que la température ne soit atteinte (pour éviter les chocs thermiques), la température est atteinte au bout d'environ 30 min.

- 5 L'autre moitié du tampon est placée dans un bac à lames, à température ambiante. La lame est extraite de l'hybridizer ou de l'étuve et transportée si nécessaire dans une boîte noire spéciale pour protéger la lame de la lumière. Sans lumière, la colle est enlevée très délicatement avec une pince, sans détériorer le filtre. La lame est lavée pendant environ 7 min dans le tampon
- 10 Stringent Wash Buffer à température ambiante sans agitation. La lame est lavée 5 min la lame dans le tampon préchauffé à 65°C, puis 5 min dans un tampon de lavage Wash Buffer 1X DAKO à température ambiante.  
La lame est déshydratée pendant 2 min avec successivement 70%, 85% 100% éthanol, sans laisser sécher entre les alcools.
- 15 Le dos de la lame est essuyé délicatement avec du papier absorbant, puis laissée sécher pendant quelques minutes sur la plaque à 37°C, en vérifiant qu'il ne reste pas d'alcool entre la lame et le filtre.  
En cas de bruit de fond, les lames peuvent être re-lavées à 70°C pendant 1-5 min.
- 20 Selon la surface de la lamelle, 10 à 15 µL de la solution « antiFad+DAPI » sont déposés sur le filtre et répartis en plusieurs gouttes sur la surface du filtre.  
Les lames sont couvertes par une lamelle de 22x22 ou 24x40, le tout est scellé d'un côté de la lamelle, du côté opposé au spot.
- 25 La lame est séchée sur la platine chauffante à 37°C pendant environ 5 min.  
La lame est transportée dans une boîte noire jusqu'au microscope, et observée en utilisant successivement les grossissements x20, pour repérer le spot, puis x100, avec de l'huile à immersion.  
La lame peut être conservée dans l'obscurité pendant 1 semaine à
- 30 température ambiante ou pendant 1 an à -20°C.  
La lecture s'effectue au microscope à fluorescence ou scanner. Les CTC sont relocalisées à partir des positions déjà identifiées lors de l'immunomarquage.

**Exemple 5 : Test de détection du gène c-MET par la technique de FISH**

- La technique de FISH est mise en œuvre de la même façon que décrit dans l'exemple 4, en utilisant une sonde spécifique de c-MET.

**Exemple 6 : Test de détection du gène Erg par la technique de FISH**

- La technique de FISH est mise en œuvre de la même façon que décrit dans l'exemple 4, en utilisant une sonde spécifique de Erg.

**Références**

- A Lecharpentier et al, "Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-smallcell lung cancer » British Journal of Cancer, 2011, 1–4

## Revendications

1. Méthode d'identification, dans un échantillon biologique, notamment un échantillon sanguin, de cellules tumorales circulantes (CTC) porteuses d'au moins un marqueur caractéristique de la nature tumorale de la cellule, ledit marqueur étant choisi dans les groupes constitués par :
- les protéines oncogéniques caractéristiques des CTC, à l'exception d'une protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK, et
  - les marqueurs tumoraux,
- ladite méthode comprenant les étapes suivantes :
- a. Identification, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, d'au moins un signal témoin de la présence de CTC, notamment du signal caractérisant la présence d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale des CTC, à l'exception d'une protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,
  - b. Détection, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon biologique, à l'aide d'une technique de type FISH utilisant des sondes spécifiques de remaniement ou d'amplification, du signal associé à la présence d'un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule, à l'exception du gène de fusion EML4-ALK,
  - c. Comparaison de la localisation sur le support des signaux obtenus dans les étapes a et b et identification des CTC.
2. Méthode d'identification, selon la revendication 1, dans laquelle les cellules tumorales circulantes (CTC) sont d'origine épithéliale et mésenchymateuse.
3. Méthode d'identification, selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle les cellules provenant de l'échantillon biologique servant à l'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC et à la détection du signal associé à la présence d'un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule, à

l'exception du gène de fusion EML4-ALK, sont isolées selon leur taille qui varie de 8  $\mu\text{m}$  à au moins 40  $\mu\text{m}$ .

4. Méthode d'identification, selon l'une des revendications 1 à 3, ladite  
5 méthode comprenant les étapes suivantes :

a. Identification, sur un support comprenant les cellules provenant de  
l'échantillon biologique, d'au moins un signal témoin de la présence de CTC,  
notamment du signal caractérisant la présence d'une protéine codée par un  
10 gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule, à l'exception d'une  
protéine codée par le gène de fusion EML4-ALK,

b. Détection, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon  
biologique, à l'aide d'une technique de type FISH utilisant des sondes  
15 spécifiques de remaniement ou d'amplification, du signal associé à la présence  
du gène codant pour la susdite protéine,

c. Comparaison de la localisation sur le support des signaux obtenus dans les  
étapes a et b et identification des CTC.

20 5. Méthode d'identification, selon l'une des revendications 1 à 4, ladite  
méthode comprenant les étapes suivantes :

a. Identification, sur un support comprenant les cellules provenant de  
25 l'échantillon biologique, d'au moins un signal témoin de la présence de CTC,  
notamment du signal caractérisant la présence d'un marqueur tumoral,

b. Détection, sur un support comprenant les cellules provenant de l'échantillon  
biologique, à l'aide d'une technique de type FISH utilisant des sondes  
30 spécifiques de remaniement ou d'amplification, du signal associé à la présence  
d'un gène codant pour une protéine oncogénique caractéristique des CTC, à  
l'exception des protéines codées par le gène de fusion EML4-ALK, et

c. Comparaison de la localisation sur le support des signaux obtenus dans les étapes a et b et identification des CTC.

6. Méthode selon l'une des revendications 1 à 5, comportant une étape d'enrichissement de l'échantillon biologique en CTC, préalable ou inhérente aux étapes d'identification des différents signaux, le facteur d'enrichissement des cellules en CTC étant compris d'environ 1/100 à environ 1/100.000.

7. Méthode selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle le dépôt des cellules provenant de l'échantillon biologique du patient est réalisé sur un support approprié pouvant être analysé à l'aide d'un appareil de type microscope à fluorescence ou scanner, ledit support pouvant être un filtre ou une lame.

8. Méthode selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle les cellules sont recueillies sur le support par filtration ou déposées sur le support après immuno-séparation magnétique.

9. Méthode selon l'une des revendications 1 à 8, dans laquelle l'étape d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC est réalisée au moyen d'un immunomarquage en fluorescence mettant en œuvre au moins un marqueur choisi dans l'un des groupes constitué par :

i. un marqueur d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule,

ii. un marqueur de membrane nucléaire ou un marqueur nucléaire,

iii. un marqueur de cellules hématopoïétiques,

iv. un marqueur de protéines choisi parmi le groupe constitué par : les marqueurs de protéines caractéristiques des cellules épithéliales et les marqueurs de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

10. Méthode selon la revendication 9, dans laquelle l'étape d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC est réalisée au moyen d'un immunomarquage en fluorescence mettant en œuvre de façon combinée au moins deux marqueurs, chacun étant choisi dans l'un des groupes constitué par :

- i. un marqueur d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule,
- ii. un marqueur de membrane nucléaire ou un marqueur nucléaire,
- iii. un marqueur de cellules hématopoïétiques,
- 5 iv. un marqueur de protéines choisi parmi le groupe constitué par : les marqueurs de protéines caractéristiques des cellules épithéliales et les marqueurs de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

11. Méthode selon l'une des revendications 9 ou 10, dans laquelle l'étape  
10 d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC met en œuvre de façon combinée au moins trois marqueurs, chacun étant choisi dans l'un des groupes constitué par :

- i. un marqueur d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule,
- 15 ii. un marqueur de membrane nucléaire ou un marqueur nucléaire,
- iii. un marqueur de cellules hématopoïétiques,
- iv. un marqueur de protéines choisi parmi le groupe constitué par : les marqueurs de protéines caractéristiques des cellules épithéliales et les marqueurs de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

20

12. Méthode selon l'une des revendications 9 à 11, dans laquelle l'étape  
d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC met en œuvre de façon combinée quatre marqueurs, chacun étant choisi dans l'un des groupes constitué par :

- 25 i. un marqueur d'une protéine codée par un gène caractéristique de la nature tumorale de la cellule,
- ii. un marqueur de membrane nucléaire ou un marqueur nucléaire,
- iii. un marqueur de cellules hématopoïétiques,
- iv. un marqueur de protéines choisi parmi le groupe constitué par : les
- 30 marqueurs de protéines caractéristiques des cellules épithéliales et les marqueurs de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses.

13. Méthode selon l'une des revendications 1 à 12, dans laquelle le marqueur spécifique d'une protéine codée par un gène caractéristique de la

nature tumorale de la cellule, est choisi dans le groupe constitué par : HER2, Erg et c-Met.

14. Méthode selon l'une des revendications 9 à 13, dans laquelle le marqueur  
5 de membrane nucléaire utilisé est le marqueur Emerin.

15. Méthode selon l'une des revendications 9 à 14, dans laquelle le marqueur  
nucléaire utilisé est choisi dans le groupe constitué par : le marqueur DAPI, les  
marqueurs Syto59, Sytox Orange, TOPRO 3, Hoescht 33342.

10

16. Méthode selon l'une des revendications 9 à 15, dans laquelle le marqueur  
de cellules hématopoïétiques est choisi dans le groupe constitué par : CD45 et  
CD31.

15 17. Méthode selon l'une des revendications 9 à 16, dans laquelle le marqueur  
de protéines caractéristiques des cellules épithéliales est choisi dans le groupe  
constitué par : les marqueurs de EpCAM, les marqueurs de pan-cytokératines,  
les marqueurs de la cadhérine épithéliale.

20 18. Méthode selon l'une des revendications 9 à 17, dans laquelle le marqueur  
de protéines caractéristiques des cellules mésenchymateuses est choisi dans le  
groupe constitué par : les marqueurs de la vimentine et les marqueurs de la  
cadhérine neurale.

25 19. Méthode selon l'une des revendications 9 à 18, dans laquelle l'étape  
d'identification d'au moins un signal témoin de la présence de CTC est réalisée  
au moyen d'un immunomarquage en fluorescence mettant en œuvre :

i. le marqueur de la protéine codée par HER2,

ii. le marqueur nucléaire DAPI,

30 iii. le marqueur de cellules hématopoïétiques CD45,

iv. un marqueur de pan-cytokératines.

20. Méthode selon l'une des revendications 1 à 19, dans laquelle la méthode  
de type FISH comprend les étapes successives suivantes :

- traitement enzymatique du support après fixation,
- hybridation sur le support en présence d'au moins une sonde,
- localisation de la sonde hybridée sur le support.

5    21.    Méthode selon l'une des revendications 1 à 20, dans laquelle l'échantillon biologique provenant d'un patient est du sang.

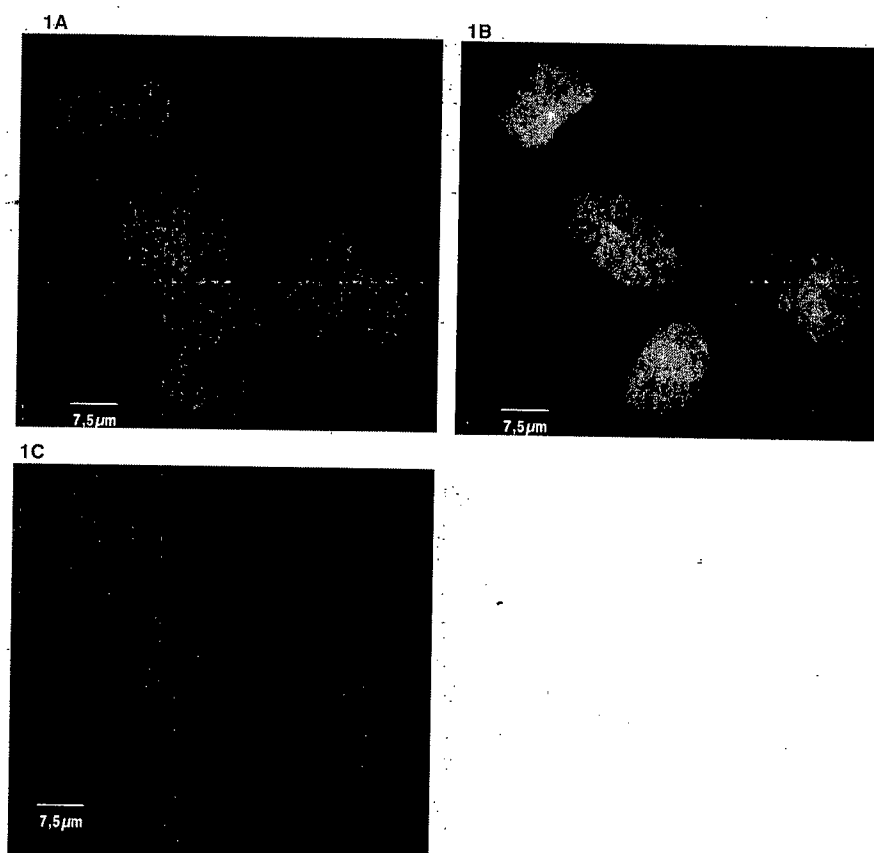
10    22.    Utilisation d'une méthode selon l'une des revendications 1 à 21, pour analyser un échantillon biologique, et notamment un échantillon sanguin, provenant d'un patient atteint de cancer, pour diagnostiquer dans les CTC la présence d'une anomalie moléculaire, notamment une translocation ou une amplification génique, et pour décider de la mise en œuvre, pour ledit patient, d'un traitement spécifique.

15    23.    Utilisation d'une méthode selon l'une des revendications 1 à 21, pour analyser un échantillon biologique, et notamment un échantillon sanguin, provenant d'un patient atteint d'un cancer présentant une anomalie moléculaire, notamment une translocation ou une amplification génique, pour le suivi de l'évolution tumorale, pour la prédiction d'un événement de type métastatique ou  
20    pour la mesure de l'efficacité d'un traitement anti-cancéreux.

24.    Utilisation selon l'une des revendications 22 ou 23, dans laquelle le patient est atteint d'un cancer susceptible de conduire à la présence de métastases, notamment le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer  
25    de la prostate, le cancer du sein.

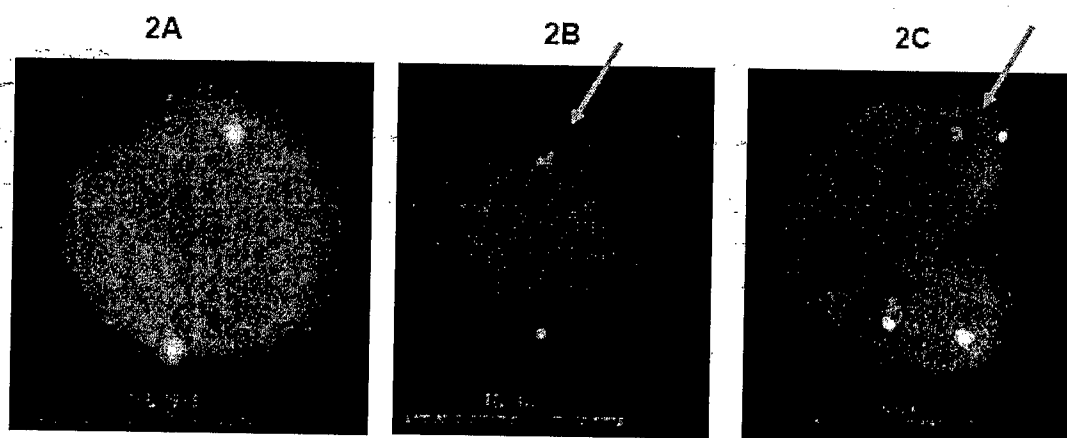
1/15

Figure 1



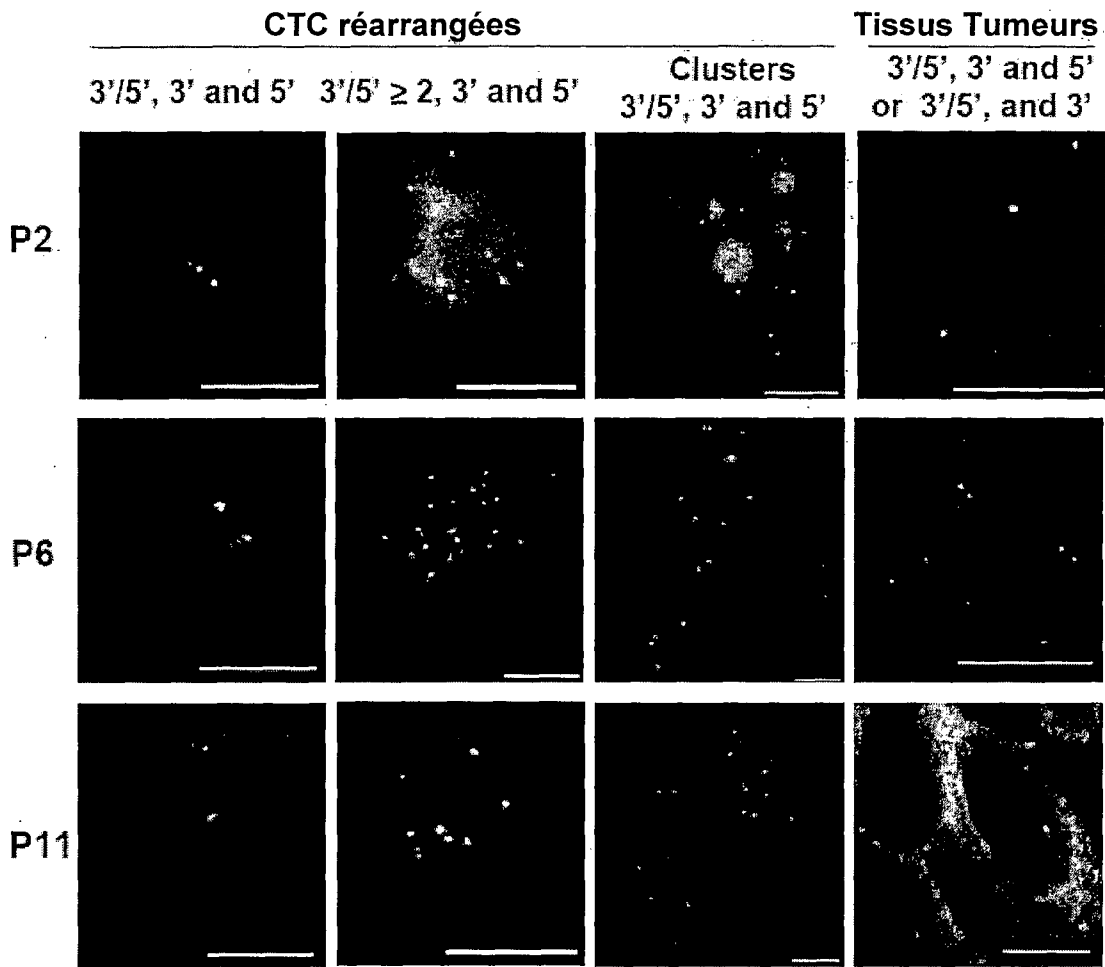
2/15

**Figure 2**



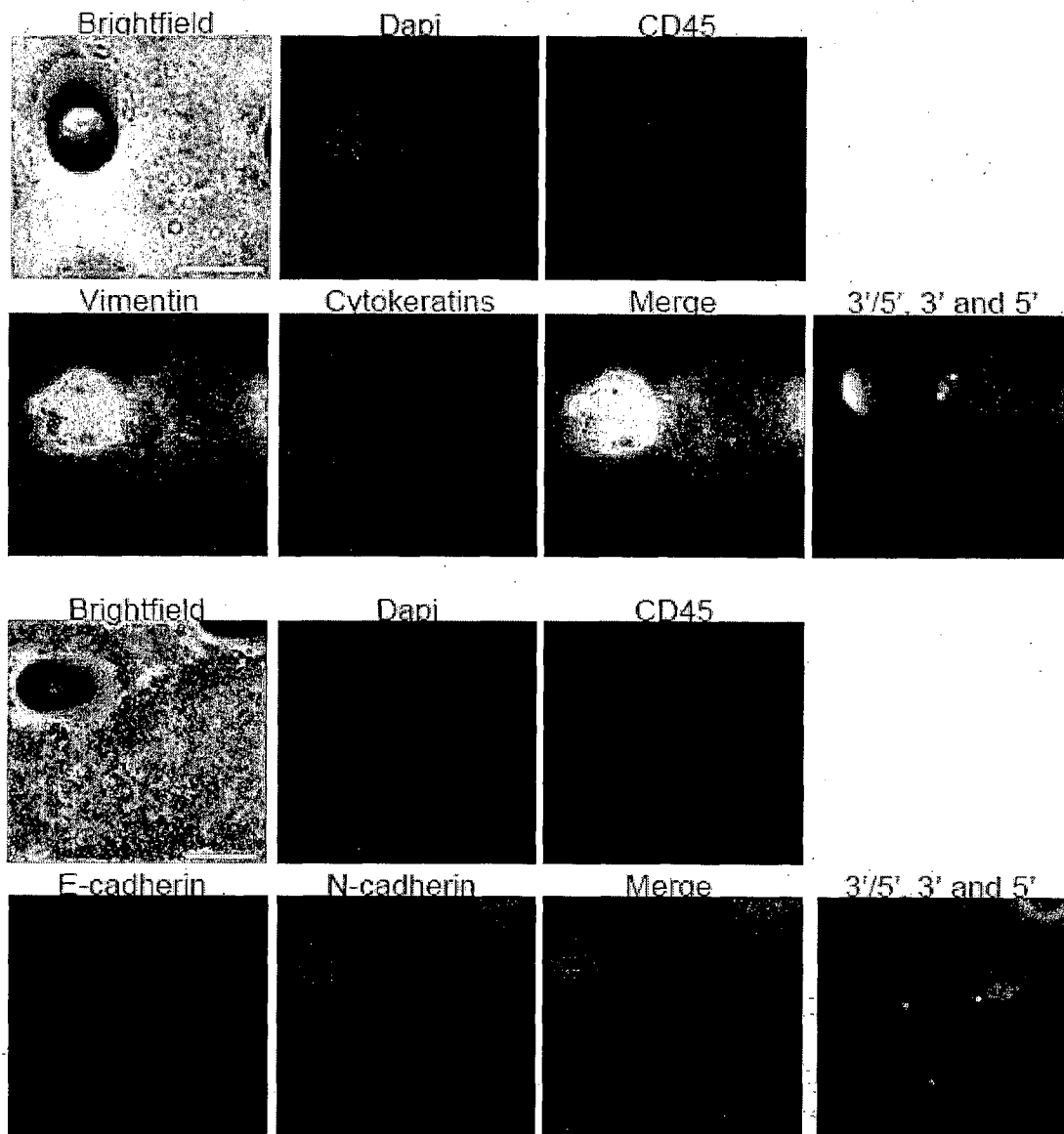
3/15

Figure 3



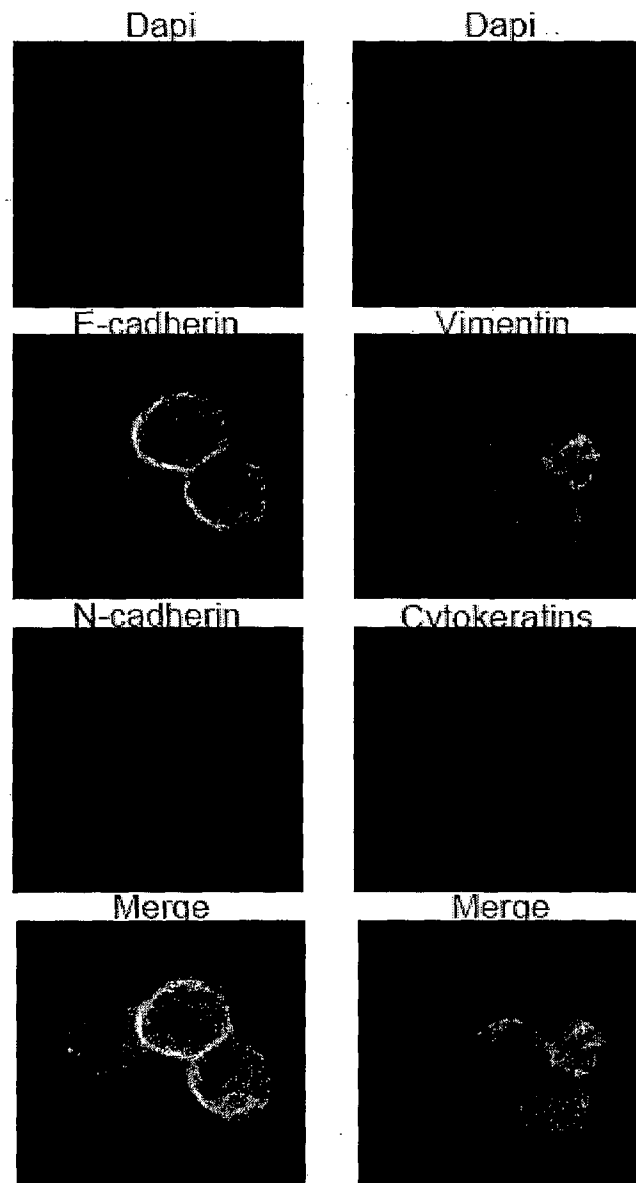
4/15

Figure 4-A



5/15

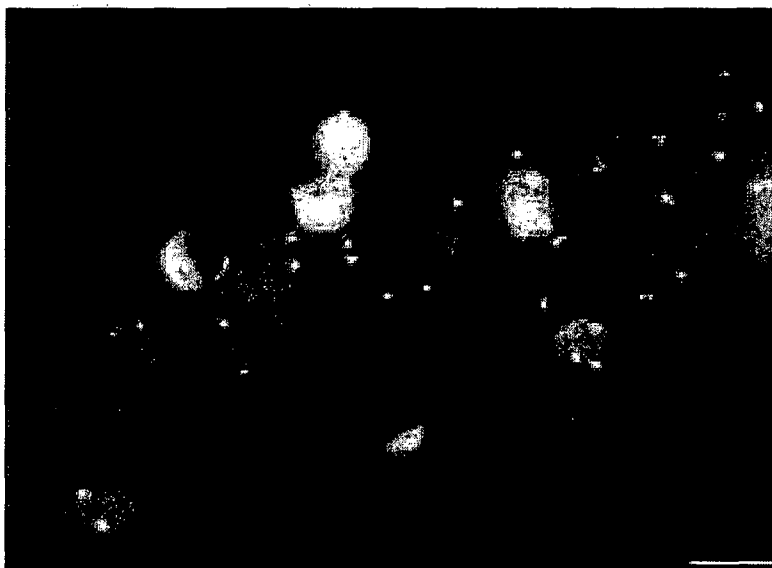
Figure 4-B



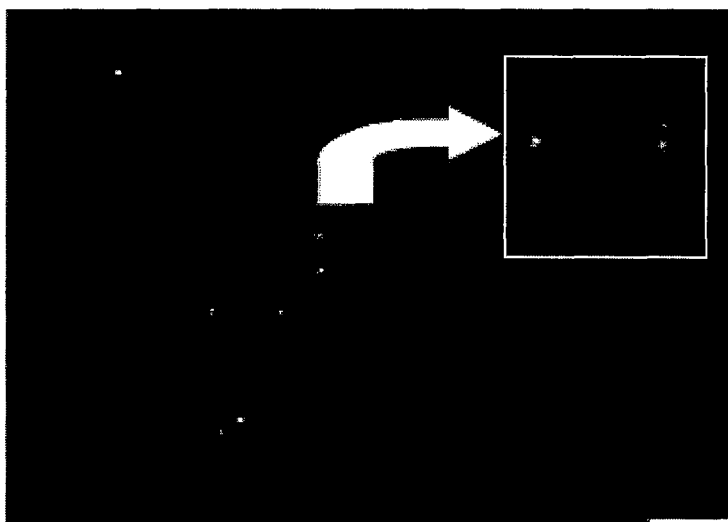
6/15

**Figure 5**

**Avant traitement inhibiteur ALK**

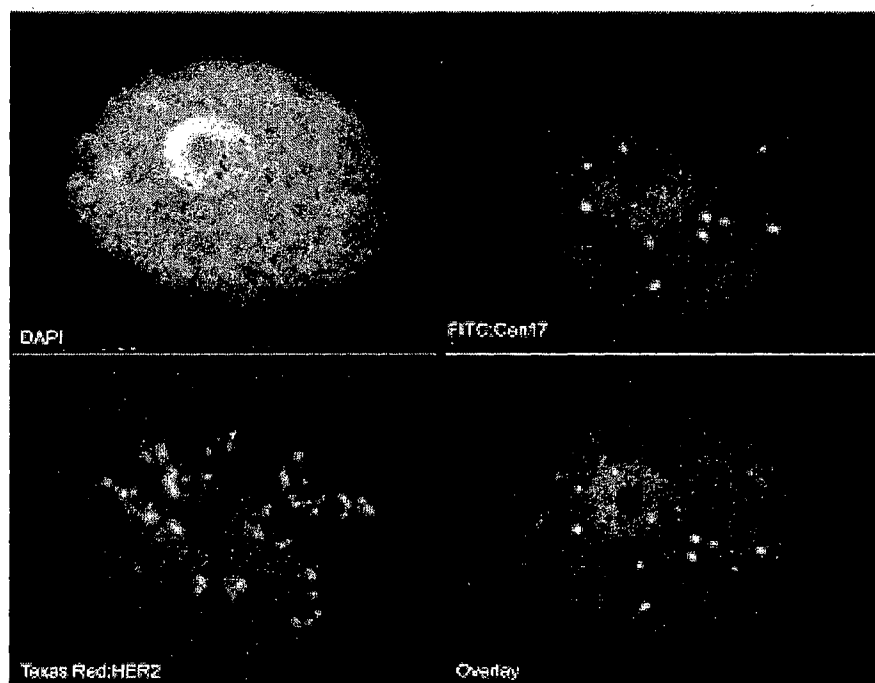


**30 jours après traitement inhibiteur ALK**



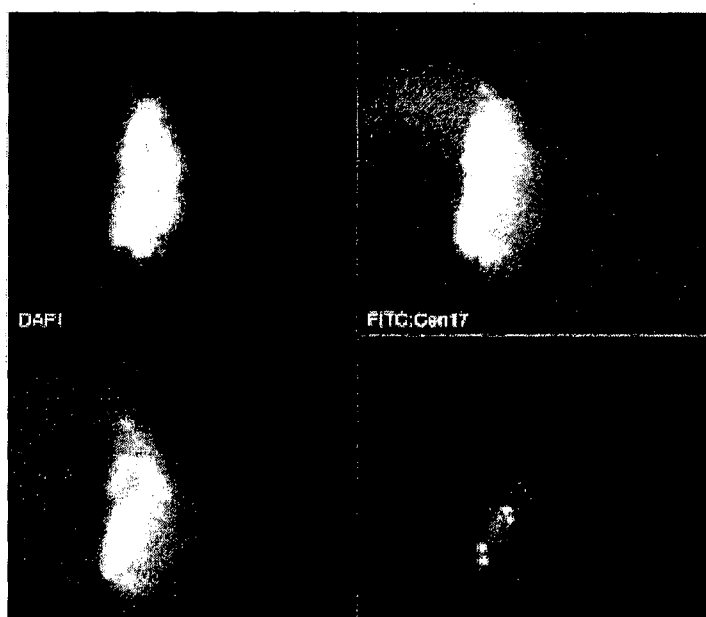
7/15

Figure 6-A



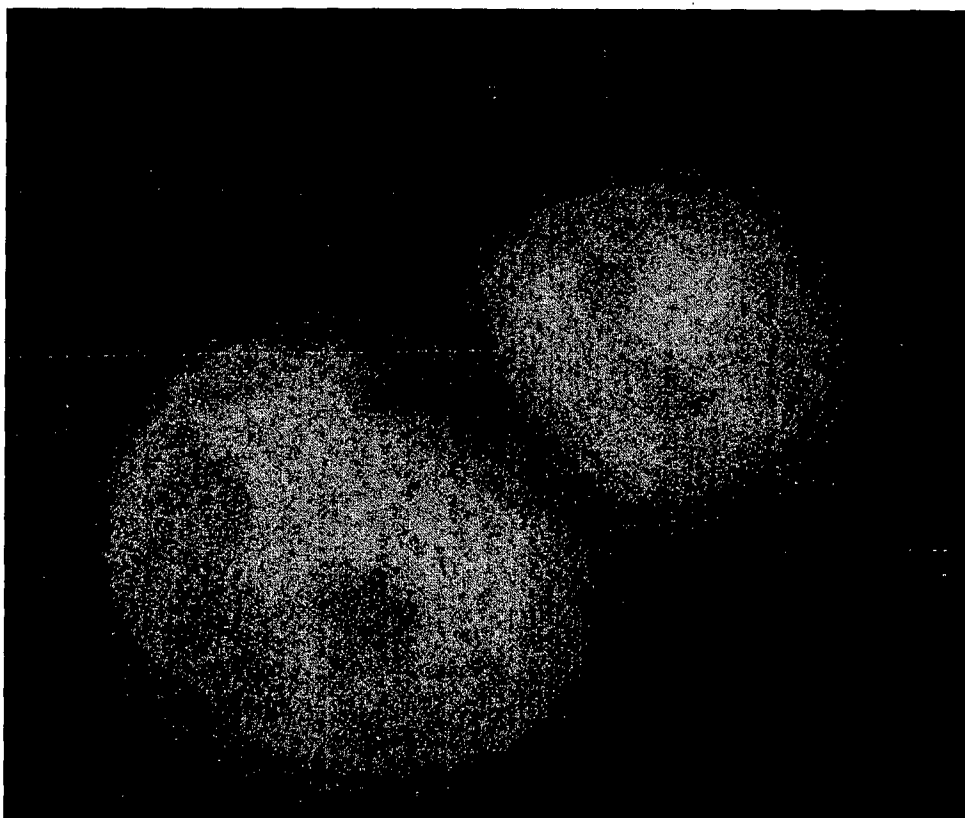
8/15

Figure 6-B



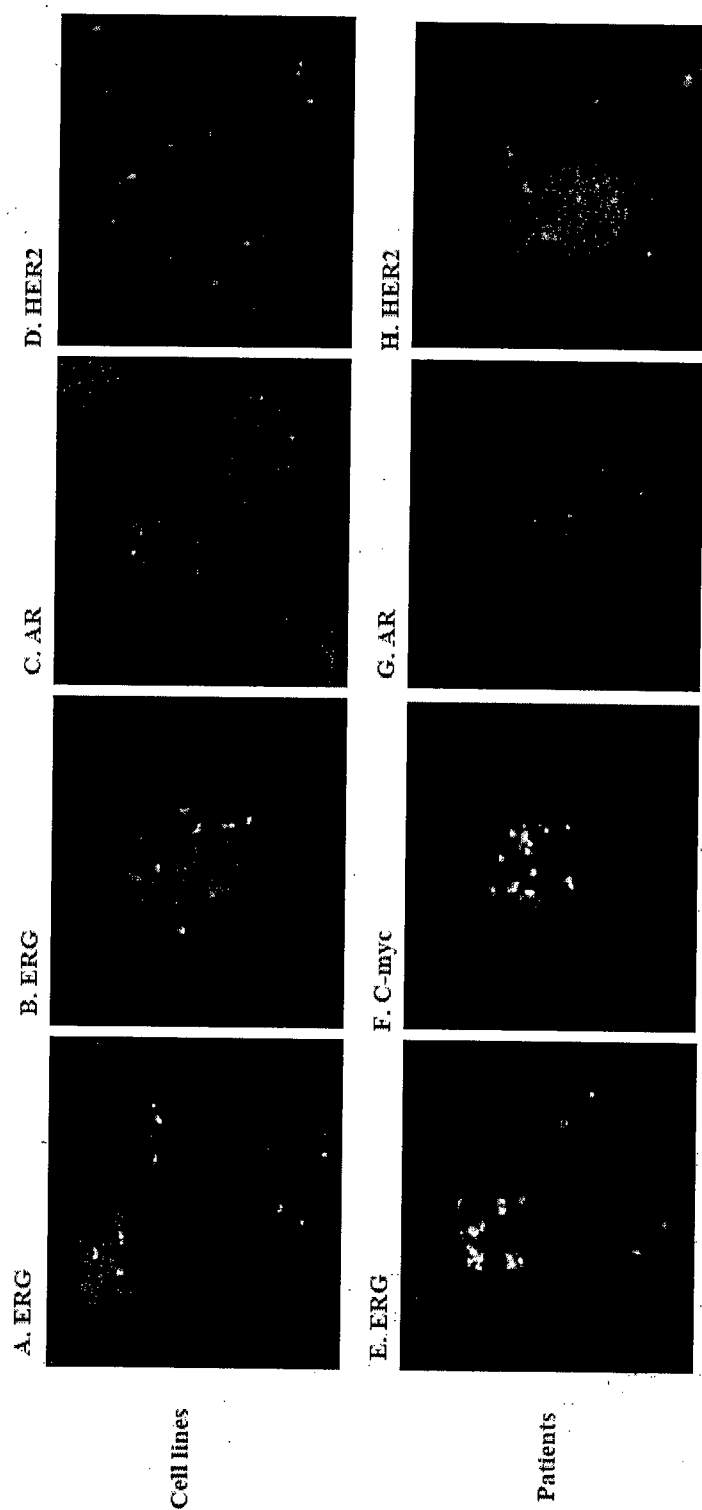
9/15

**Figure 6-C**



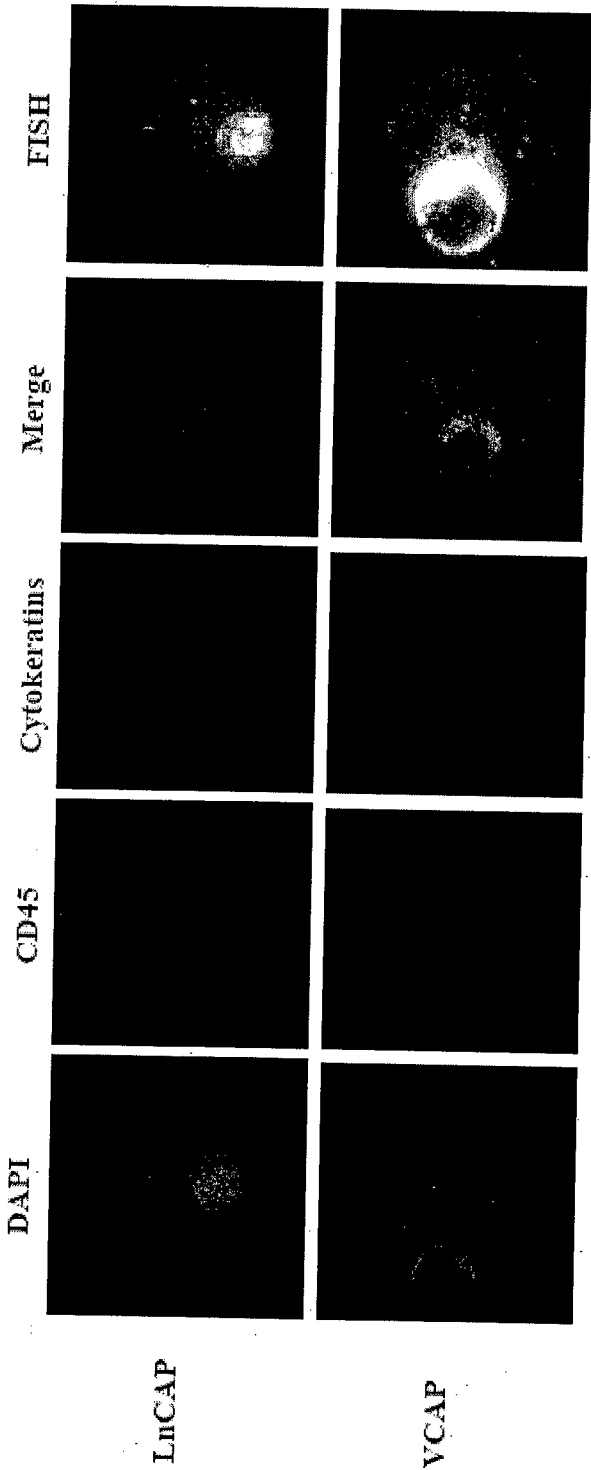
10/15

### Figure 7



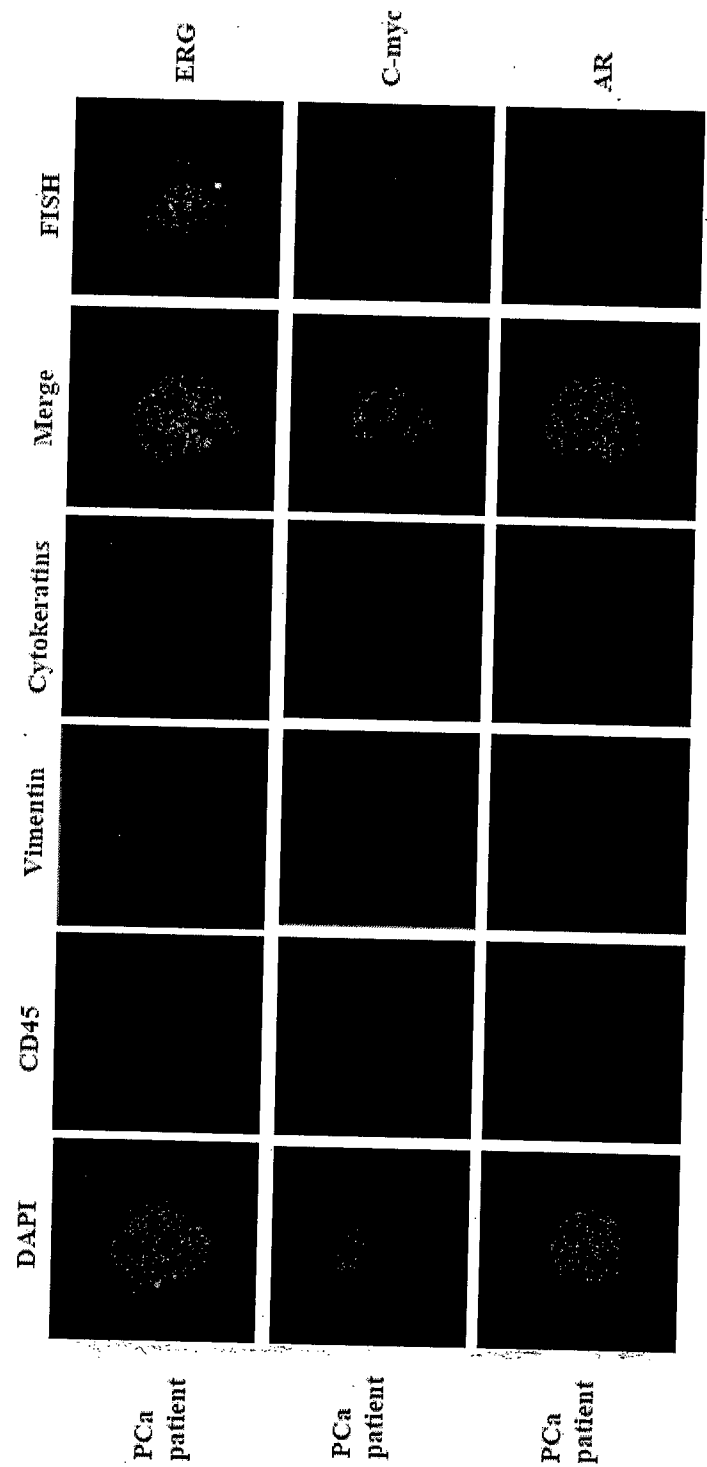
11/15

Figure 8-A



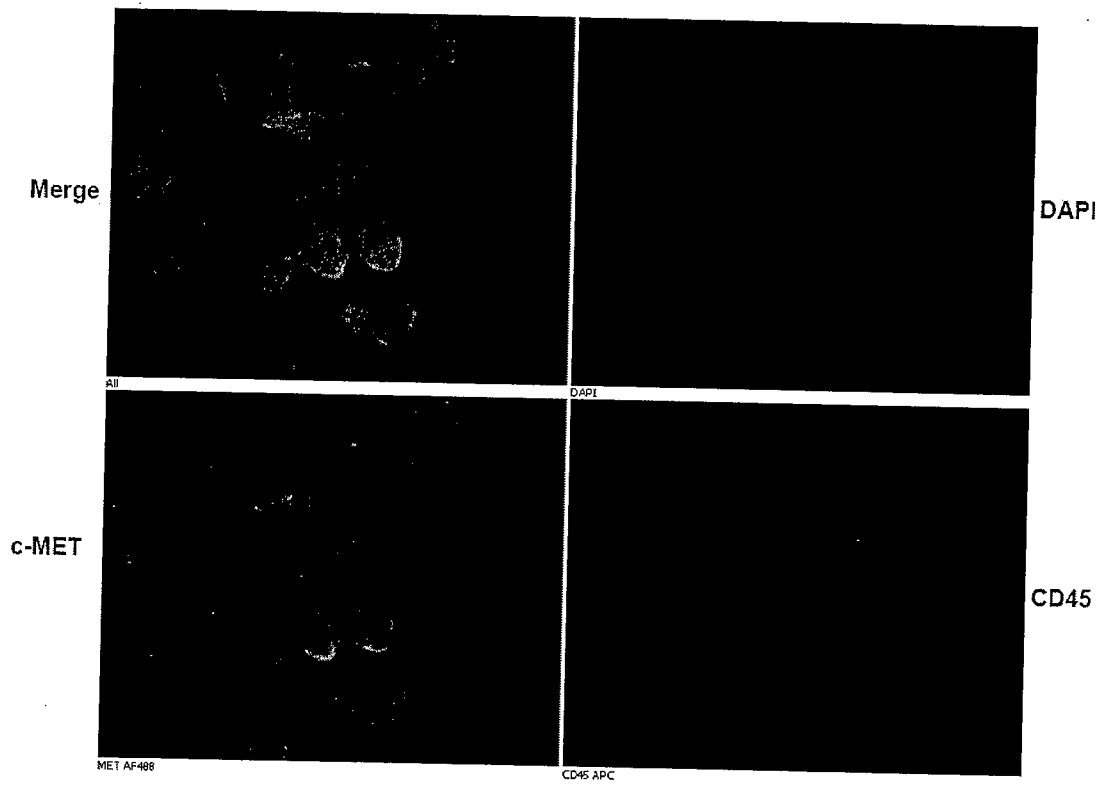
12/15

Figure 8-B



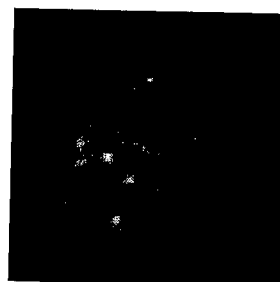
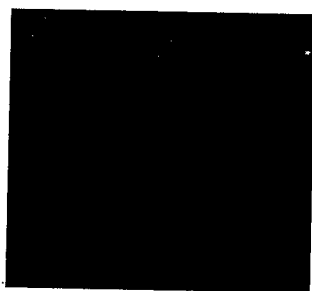
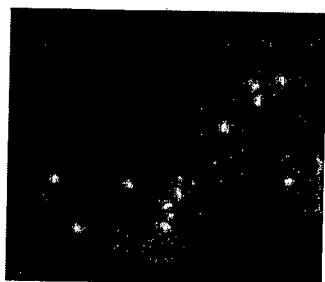
13/15

Figure 9-A



14/15

**Figure 9-B**



15/15

Figure 9-C

IF: CD45/DAPI/cMET



FISH: cMET

