

CELLULES TUMORALES CIRCULANTES : détection, caractérisation et intérêts cliniques

CH. GILLES (1), J. COLLIGNON (2), A. NOËL (1), G. JERUSALEM (2), J-M. FOIDART (1)

RESUME : Le processus métastatique génère des cellules tumorales circulantes (CTCs) et des cellules disséminées (DTCs) dans la moelle osseuse et d'autres organes qui peuvent rester dans un état de dormance et de métastases occultes. Différentes méthodes et systèmes ont été développés pour permettre l'isolement et l'identification de ces cellules, mais des limitations techniques importantes subsistent. La recherche sur les CTCs subit néanmoins un essor grandissant tant leurs applications cliniques potentielles sont importantes. Les CTCs véhiculent, en effet, une information prédictive pour le développement de métastases et les récurrences ainsi qu'une information pronostique pour l'espérance de vie. L'énumération des CTCs pourrait également servir à suivre l'efficacité de traitements adjuvants. De plus, alimentant nos connaissances fondamentales sur le processus métastatique, des données récentes suggèrent que les CTCs, et plus particulièrement les DTCs, contiendraient des sous-populations des cellules à caractère souche qui seraient à l'origine des récurrences.

MOTS-CLÉS : *Cellules Tumorales Circulantes (CTCs) - Cellules Tumorales Disséminées (DTCs) - Cancer du sein*

CIRCULATING TUMOR CELLS : DETECTION, CHARACTERIZATION AND CLINICAL IMPACT

SUMMARY : The metastatic process generates circulating tumor cells (CTCs) and disseminated tumor cells (DTCs) in bone marrow and other organs which can remain as occult metastases. Various methods and systems have been developed to allow the isolation and identification of those cells but major technical limitations still exist. Research on CTCs is a nevertheless tremendously growing field of cancer research because of their potential clinical applications. CTCs indeed convey predictive information for the development of metastasis and recurrence, and prognostic information regarding patient survival. CTCs enumeration could also be used to monitor the effectiveness of adjuvant treatments. Moreover, enhancing our basic understanding of the metastatic process, CTCs, and DTCs in particular, are thought to contain subpopulations of cells with stem cells properties that would be responsible for relapses.

KEYWORDS : *Circulating Tumor Cells (CTCs) - Disseminated Tumor Cells (DTCs) - Breast cancer*

INTRODUCTION

La formation de métastases à partir de tumeurs épithéliales se déroule en une cascade d'événements impliquant l'invasion des tissus sous-jacents à la tumeur, l'intravasation et la survie des cellules tumorales dans la circulation sanguine ou lymphatique, l'extravasation de ces cellules et leur croissance dans des organes secondaires. Tout au long de cette cascade, des modifications phénotypiques, régulées dans l'espace et dans le temps, se produisent au sein des cellules tumorales épithéliales, conférant à quelques-unes d'entre elles la capacité à franchir ces barrières successives et de développer des métastases.

Ainsi, le processus métastatique génère différentes entités cellulaires tumorales à différents endroits du corps. On distingue 1) les cellules de la tumeur primaire, 2) les cellules tumorales circulantes (CTCs), 3) les cellules tumorales disséminées (DTCs) dans la moelle osseuse et d'autres organes qui peuvent demeurer dorman-

tes et rester sous forme de métastases occultes et 4) les cellules formant des métastases cliniquement détectables (Fig. 1).

Les DTCs et les CTCs représentent aujourd'hui une nouvelle fenêtre d'étude sur le processus métastatique, élargissant les connaissances sur ce processus jusqu'à présent essentiellement limitées aux étapes précoces (tumeurs primaires) et aux étapes tardives (métastases).

L'étude des CTCs a pris un essor faramineux depuis une dizaine d'années. En effet, contrairement à l'étude des DTCs nécessitant un prélèvement invasif et douloureux de moelle osseuse, les CTCs sont disponibles à partir d'un simple prélèvement sanguin. L'intérêt clinique potentiel des CTCs comme facteur pronostique, prédictif ou thérapeutique en fait aujourd'hui un axe primordial de la recherche en cancérologie.

DÉTECTION DES CTCs

Le secteur de recherches sur les CTCs souffre de limitations techniques importantes concernant la détection et l'isolement des CTCs, qu'il est primordial d'évoquer tant elles sont au centre de la compréhension des données actuelles sur les CTCs. En conséquence de ces limitations, l'identification, l'énumération et la caractérisa-

(1) Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement, GIGA-Cancer, Université de Liège, CHU de Liège.

(2) Service d'Oncologie Médicale, Université de Liège, CHU de Liège.

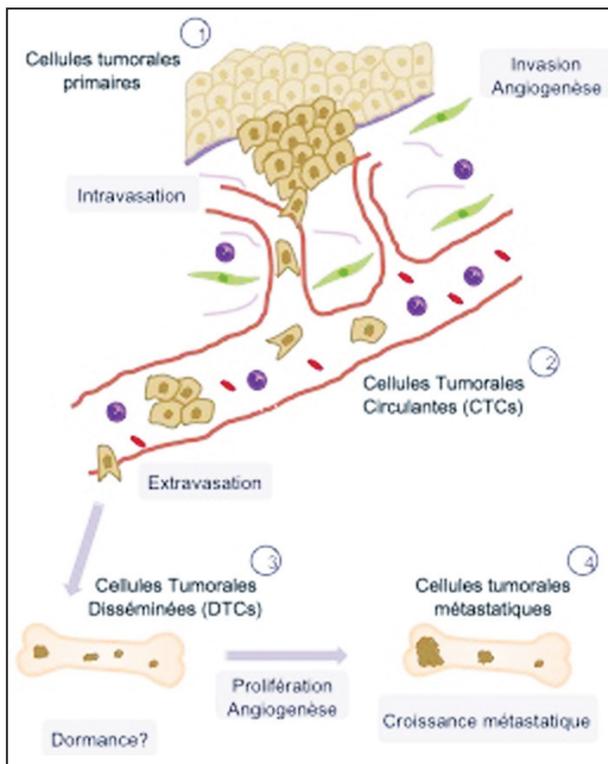


Figure 1. Schéma de la progression métastatique et des différentes entités cellulaires tumorales générées au cours de ce processus.

Certaines cellules de la tumeur primaire (entités cellulaires n° 1) vont gagner la circulation par intravasation et générer ainsi des Cellules Tumorales Circulantes (CTCs : entités cellulaires n°2). Un nombre probablement très limité de ces cellules vont survivre dans la circulation et coloniser la moelle osseuse et d'autres organes, sans nécessairement développer des métastases cliniquement détectables. Selon la théorie actuelle, ces cellules disséminées (DTCs : entités cellulaires tumorales n°3) peuvent rester dormantes et constituer un «réservoir» de cellules tumorales à caractère souche qui seraient impliquées dans les récurrences. Dans certaines conditions, certaines DTCs peuvent proliférer et ainsi développer des métastases (entités cellulaires tumorales n° 4).

tion subséquentes des CTCs sont, en effet, très ardues (1-3).

Etant donné la rareté des CTCs, il est nécessaire de les enrichir et de les purifier afin de pouvoir les identifier, les énumérer et les caractériser. Différentes méthodes d'enrichissement et de purification ont été développées. On distingue ainsi essentiellement 3 grands types de techniques de purification: des techniques de filtration reposant sur des critères de taille, des techniques de centrifugation sur gradient de FICOLL reposant sur des critères de densité des CTCs et des techniques d'immunopurification reposant sur l'expression de marqueurs particuliers (1-3).

Les techniques d'immunopurification sont les plus répandues. Elles peuvent être positives ou négatives. Les immunopurifications positives se font, le plus fréquemment, à l'aide d'un anticorps reconnaissant un marqueur membranaire épithélial EpCAM. Les purifications négatives consistent, quant à elles, à déléter les pré-

vements sanguins d'une grande partie des cellules sanguines en utilisant le plus souvent un anticorps dirigé contre le marqueur leucocytaire CD45. Les anticorps utilisés sont soit couplés à des substrats magnétiques (MACS : Magnetic Activated Cell Sorting), soit à d'autres types de supports solides.

Quelle que soit la technique d'isolement utilisée, les CTCs sont ensuite «identifiées» à l'aide de marqueurs moléculaires détectés le plus souvent par RT-PCR ou par immunomarquage. Or, il n'existe aucun marqueur spécifique des CTCs. Si certaines études ont utilisé des marqueurs tissulaires afin d'identifier les CTCs (PSA notamment pour les CTCs isolées des cancers de la prostate), la plupart des travaux recherchent des marqueurs épithéliaux, le plus souvent les kératines. Une détection de CD45 est également fréquemment effectuée en parallèle. Il est important de noter que l'origine tumorale des cellules isolées à partir du sang n'est jamais directement établie. Seules les techniques de détections «directes» (FISH pour amplification de HER2, CGH-Comparative Genomic Hybridization), caractérisant des aberrations chromosomiques ou des mutations, peuvent attester directement de l'origine tumorale des cellules. Ces techniques sont néanmoins plus lourdes et sont plus difficiles à combiner à d'autres caractérisations subséquentes.

Ainsi, dans la plupart des études, une CTC est principalement, et bien souvent uniquement, définie comme une cellule arrondie exprimant des kératines (CK+) et n'exprimant pas le CD45 (CD45-).

Or, des données de la littérature ont rapporté la présence dans le sang de rares cellules épithéliales non tumorales, de cellules non épithéliales exprimant des kératines ou encore d'ARN circulant de kératines. Les cellules épithéliales non tumorales dans le sang peuvent également provenir de la prise de sang en elle-même au travers de la peau (le premier tube de sang collecté étant aujourd'hui le plus souvent écarté pour des études subséquentes sur les CTCs) ou encore de la chirurgie. Une augmentation de 1.000 fois des cellules épithéliales dans le sang a ainsi été rapportée pendant les 3 jours suivant une chirurgie (4). Lorsqu'aucune méthode directe d'identification tumorale n'est réalisée, d'aucuns préfèrent utiliser le terme de CEPCs «Circulating Epithelial Cells» que celui de CTCs (1).

Les limitations techniques associées au manque de marqueurs spécifiques des CTCs et à la rareté des CTCs génèrent un contexte de recherche où le risque de faux positifs et de faux

négatifs associé à l'identification des CTCs est extrêmement élevé. Malgré ces limitations, la recherche sur les CTCs représente aujourd'hui un secteur phare de la recherche en cancérologie tant leur intérêt clinique potentiel est important.

De nombreuses firmes se sont intéressées à ce secteur et certains systèmes de purification et d'identification de CTCs sont aujourd'hui commercialement disponibles. Par exemple, un système de filtration au travers d'une membrane poreuse a été développé (ISET : Isolation by Size of Epithelial Tumor cells). La firme Veridex a répondu à la demande de la plupart des études sur les CTCs qui utilisaient des systèmes de purification immunomagnétique en développant le système CellSearch. Ce système utilise une purification immunomagnétique sur base d'une sélection à l'aide d'un anticorps anti-EpCAM, suivi d'une identification des CTCs par immunohistochimie de kératines et de CD45. Comme les systèmes « artisanaux » développés dans de nombreux laboratoires par séparation immunomagnétique (MACS), le CellSearch identifie, dès lors, une CTC comme une cellule EpCAM+/CK+/CD45-. Si cet appareil n'exclut donc pas la possibilité d'isoler des sous-populations de CTCs ou des cellules épithéliales non tumorales, il présente l'énorme avantage d'être standardisé et automatisé, limitant ainsi les problèmes d'interprétation et de reproductibilité. D'autres systèmes commerciaux apparaissent de plus en plus sur le marché; ils ne feront pas l'objet de cette revue et ont été détaillés dans d'autres manuscrits (2, 5). Il est important de prendre en considération qu'une variabilité parfois importante (de 10 à 100%) existe quant à l'énumération des CTCs en fonction de la technique et du système de détection utilisé. A ce jour, le système CellSearch est l'appareil commercialisé le plus utilisé et le seul approuvé par la FDA pour l'énumération des CTCs chez les patients atteints de cancers du sein, de la prostate et du côlon (6-10).

INTÉRÊTS CLINIQUES DES CTCs

Malgré les difficultés techniques mentionnées ci-dessus, de nombreuses équipes tentent aujourd'hui d'établir la signification clinique des CTCs dans différents types de cancers. Les données concernant les cancers mammaires feront plus particulièrement l'objet de cette revue.

INTÉRÊT PRONOSTIQUE DES CTCs

La signification pronostique des CTCs fait l'objet d'une recherche très active aujourd'hui, mais n'est toujours pas clairement établie. La lit-

térature actuelle sur les CTCs tend néanmoins à montrer une augmentation du nombre de CTCs en association avec un pronostic défavorable et un risque de récurrence élevé chez les patients atteints de cancers du sein, du côlon ou de la prostate (2, 3, 11). Ainsi, dans le cas de patientes atteintes de cancers mammaires métastatiques, un comptage, réalisé avant traitement, de plus de 5 CTCs par 7,5 ml de sang (quantité d'échantillons utilisée par le système CellSearch) a été associé à une survie globale plus courte (6, 12, 13). Le nombre de CTCs est également un facteur prédictif indépendant pour la survie des patients atteints de cancers de la prostate résistant à la castration chimique (8, 14) et des cancers colorectaux (9).

D'autres études se sont intéressées à la signification clinique des CTCs dans les stades plus précoces de la maladie. Selon les études et selon la technique utilisée, entre 10 et 100% des patients atteints de cancers sans signe clinique de métastases présentent des CTCs. Ainsi, la détection d'une seule CTC par 7.5ml de sang est un facteur pronostique indépendant prédisant un risque accru de développement métastatique et une survie plus courte chez les patientes atteintes de cancers mammaires ne présentant aucun signe de métastases au moment de la numération (15).

Néanmoins, des études multicentriques à large échelle, utilisant une technologie de détection fiable et reproductible des CTCs, sont toujours, à ce jour, inexistantes. De telles données sont nécessaires pour permettre d'envisager un éventuel futur pour la détection des CTCs dans le suivi clinique de patients cancéreux.

INTÉRÊT DES CTCs POUR L'ÉVALUATION DE LA RÉPONSE À UN TRAITEMENT

L'énumération des CTCs afin d'évaluer une réponse à un traitement fait également l'objet de nombreuses études. Ainsi, la diminution du nombre de CTCs suite à une thérapie adjuvante a été observée chez des patientes atteintes de cancer du sein non métastaté (16-19), mais aussi des patientes atteintes de cancers du sein métastatiques (7).

De nombreuses études cliniques à large échelle sont aujourd'hui en cours pour étudier l'influence potentielle de la variation du nombre de CTCs suite à des traitements adjuvants sur la survie des patientes («SUCCESS» trial, «GEPARQuattro» trial, «GEPARQuinto trial, www.germanbreastgroup.de).

Néanmoins, la persistance des CTCs après traitement de patientes atteintes de cancers

mammaires a également été rapportée et a été associée à un taux de récurrence plus élevé et à une espérance de vie réduite.

INTÉRÊT THÉRAPEUTIQUE DES CTCs : CARACTÉRISATION DES CTCs

Outre l'énumération des CTCs, leur caractérisation moléculaire revêt un intérêt particulier.

En effet, la plupart des données de la littérature tendent à démontrer que les CTCs ont un potentiel prolifératif faible, ce qui les rendrait relativement insensibles à la chimiothérapie (2, 20). L'identification de cible moléculaire sur les CTCs, qui permettrait de prédire la réponse à un traitement adjuvant existant ou d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, est donc aujourd'hui un important challenge.

Dans le contexte du cancer du sein, l'expression de HER2 dans les CTCs fait aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches. De manière intéressante, la présence de CTCs exprimant HER2 a été rapportée chez des patientes (jusqu'à 47 % des patientes selon les études et les techniques utilisées) présentant une tumeur négative pour HER2 (21-24). De plus, certaines de ces patientes se sont avérées sensibles à un traitement au trastuzumab (21, 25). D'une manière très générale, ce type de données amène à considérer soit qu'une sous-population de cellules exprimant HER2 dans la tumeur primaire qui n'aurait pas été détectée, présentent des capacités de dissémination plus importante, soit que des modifications génétiques peuvent être acquises dans les CTCs, parallèlement et de manière indépendante à l'évolution de la tumeur primaire. Ces données démontrent, en outre, que la caractérisation des CTCs peut être d'un intérêt clinique pour établir la sélection des patients à une thérapie ciblée.

D'autres données ont également rapporté l'expression de marqueurs de processus de Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) dans les CTCs (vimentin, twist) (26, 27). Ces processus de TEM traduisent une perte de caractéristiques épithéliales et une expression accrue de marqueurs mésenchymateux. Ils contribuent à l'expression d'un potentiel invasif élevé (28, 29) et seraient impliqués dans l'intravasation et la génération des CTCs (30). Il est à noter que ces processus de TEM ajouteraient également à la complexité de purifier les CTCs. Les techniques actuelles de purification et d'identification des CTCs, basées sur l'expression de marqueurs épithéliaux, aboutiraient, en effet, à la sélection de certaines populations de CTCs, qui, de plus, ne seraient pas les plus agressives (1, 2). Cela pourrait expliquer qu'aucune CTC n'est détec-

tée dans une fraction importante des patientes (jusqu'à 35% selon les études) atteintes de cancers du sein métastatisés (2, 10).

Par ailleurs, l'expression de marqueurs de TEM sur les CTCs a également été associée à l'expression de marqueurs de cellules souches (26, 27) chez les patientes atteintes de cancers de sein métastatiques. Ainsi, si de nombreuses CTCs sont vouées à entrer en apoptose, certaines CTCs pourraient être dotées de capacités invasives élevées et assimilées à des cellules souches cancéreuses.

CONCLUSION

Les applications cliniques potentielles de l'énumération des CTCs et de leur caractérisation se situent à plusieurs niveaux. Leur détection à des stades précoces du développement tumoral pourrait servir de marqueur prédictif à la dissémination métastatique. Aussi, l'énumération périodique des CTCs après chirurgie ou après traitement pourrait servir à identifier les patients chez qui l'ablation tumorale n'a pas été curative, à évaluer la réponse des patients à un traitement et à prédire les récurrences. Cela pourrait être le cas chez les patientes avec cancer du sein. Néanmoins, des études multi-variées à large échelle sont encore nécessaires afin d'établir clairement la valeur prédictive et pronostique des CTCs. Aussi, le rapport coût/bénéfice vis-à-vis de l'utilisation d'autres marqueurs pronostiques et prédictifs apparaît élevé. L'énumération systématique des CTCs dans la prise en charge et le suivi des patients cancéreux apparaît finalement peu envisageable aujourd'hui. Dès lors, la caractérisation moléculaire des CTCs, permettant d'identifier des cibles de thérapies ciblées existantes ou de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, constitue aujourd'hui la voie de recherche sur les CTCs la plus attractive et probablement la plus potentiellement applicable à la clinique dans le futur.

Sur un plan plus fondamental, l'étude des CTCs a permis d'ouvrir une fenêtre sur la compréhension du processus métastatique. La génération de CTCs apparaît être un événement précoce dans la progression métastatique et ne concerne pas uniquement les phases tardives du développement tumoral. Ainsi, des CTCs, génétiquement et phénotypiquement hétérogènes, seraient libérées des tumeurs primaires à toutes les étapes de la croissance tumorale et celles-ci pourraient évoluer génétiquement de manière indépendante de la tumeur primaire. Ces données sont en accord avec le modèle de « progression tumorale parallèle » entre la tumeur primaire

et les métastases, qui est aujourd'hui de plus en plus accepté (31).

Si une grande partie de la recherche s'oriente aujourd'hui sur les CTCs, étant donné leur accessibilité aisée à partir d'une prise de sang, la recherche sur les DTCs apparaît tout aussi attractive et primordiale. Sur le plan clinique, les DTCs, comme les CTCs, véhiculent une information pronostique et prédictive évidente, comme cela a clairement été établi pour les cancers du sein (1-3, 32-34). Une étude multi-variée à large échelle a ainsi examiné 4.703 patientes chez qui la présence de DTCs dans la moëlle osseuse a été identifiée dans 30% des cas et corrélée à la présence de métastases (dans les os et d'autres organes) et une réduction de la survie à 10 ans (35). Les DTCs se sont également avérées être de bons marqueurs pour suivre la réponse à des traitements adjuvants. La lourdeur du prélèvement de moëlle, associée au coût de la détection des DTCs, discrédite, cependant, l'applicabilité potentielle de leur énumération dans le suivi de patients développant des tumeurs solides. C'est, en effet, sur un plan fondamental que la recherche sur les DTCs revêt un intérêt particulier, pour la compréhension de la biologie du processus métastatique. La détection des DTCs dans la moëlle osseuse de patientes atteintes de cancers mammaires a, ainsi, été associée à un taux de récurrence élevé (36). De plus, la caractérisation moléculaire des DTCs a également démontré leur faible index prolifératif et l'expression de marqueurs de cellules souches (37). D'aucuns pensent donc aujourd'hui que les DTCs dans la moëlle osseuse, et peut-être dans les organes, pourraient constituer un «réservoir» ou des «niches» de cellules tumorales «dormantes» avec des caractéristiques de cellules souches qui seraient à l'origine de la recirculation de cellules tumorales et des récurrences après ablation de la tumeur primaire (2, 38). De nombreuses voies de recherches s'orientent aujourd'hui vers la compréhension des mécanismes impliqués dans la dormance des DTCs, dans l'expression du caractère «souche» et dans les interactions entre le microenvironnement de la moëlle osseuse et les cellules tumorales qui favoriseraient la formation de ces niches de cellules fondatrices de métastases, comme discuté dans l'article précédent (39).

BIBLIOGRAPHIE

1. Paterlini-Brechot P, Benali NL.— Circulating tumor cells (CTC) detection : clinical impact and future directions. *Cancer Lett*, 2007, **253**, 180-204.
2. Pantel K, Alix-Panabieres C.— Circulating tumour cells in cancer patients : challenges and perspectives. *Trends Mol Med*, 2010, **16**, 398-406
3. Yu M, Stott S, Toner M, et al.— Circulating tumor cells : approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol*, 2011, **192**, 373-382.
4. Pachmann K.— Longtime recirculating tumor cells in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**, 5657-5658.
5. Ross JS, Slodkowska EA.— Circulating and disseminated tumor cells in the management of breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 2009, **132**, 237-245.
6. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al.— Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 2004, **351**, 781-791.
7. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, et al.— Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res*, 2006, **12**, 4218-4224.
8. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al.— Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**, 6302-6309.
9. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al.— Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2008, **26**, 3213-3221.
10. Riethdorf S, Fritsche H, Muller V, et al.— Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer : a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**, 920- 928.
11. Miller, M. C., Doyle, G. V., and Terstappen, L. W. - Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol*, 2010, ID: 617421.
12. Cristofanilli M, Reuben J, Uhr J.— Circulating tumor cells in breast cancer : fiction or reality? *J Clin Oncol*, 2008, **26**, 3656-3657.
13. Botteri E, Sandri MT, Bagnardi V, et al.— Modeling the relationship between circulating tumour cells number and prognosis of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, **122**, 211-217.
14. Danila DC, Heller G, Gignac GA, et al.— Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**, 7053-7058.
15. Bidard FC, Mathiot C, Delaloge S, et al.— Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Ann Oncol*, 2010, **21**, 729- 733.
16. Muller V, Stahmann N, Riethdorf S, 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**, 3678-3685.
17. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, et al.— Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer : a new tool for therapy monitoring. *Breast Cancer Res*, 2005, **7**, R975-R979.
18. Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, 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**, 7004-7010.

19. Riethdorf S, Muller V, Zhang L, et al.— Detection and HER2 expression of circulating tumor cells : prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res*, 2010, **16**, 2634-2645.
20. Muller SL, Portwich M, Schmidt A, et al.— The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J Biol Chem*, 2005, **280**, 3747-3756.
21. Meng S, Tripathy D, Shete S, et al.— HER2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**, 9393-9398.
22. Wulfing P, Borchard J, Buerger H, et al.— HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2006, **12**, 1715-1720.
23. Muller V, Pantel K.— HER2 as marker for the detection of circulating tumor cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, **117**, 535-537.
24. Fehm T, Muller V, Aktas B, et al.— HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer : a prospective, multicenter trial. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, **124**, 403-412.
25. Hayes DF, Walker TM, Singh B, et al.— Monitoring expression of HER2 on circulating epithelial cells in patients with advanced breast cancer. *Int J Oncol*, 2002, **21**, 1111-1117.
26. Aktas B, Tewes M, Fehm T, et al.— Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 2009, **11**, R46.
27. Raimondi C, Gradilone A, Naso G, et al.— Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, Feb 5 (Epub ahead of print).
28. Yang J, Weinberg RA.— Epithelial-mesenchymal transition : at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, 2008, **14**, 818-829.
29. Kalluri R, Weinberg RA.— The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 2009, **119**, 1420-1428.
30. Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, et al.— Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, **15**, 261-273.
31. Klein CA.— Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*, 2009, **9**, 302-312.
32. 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**, 140-148.
33. Alix-Panabieres C, Riethdorf S, Pantel K.— Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**, 5013-5021.
34. Braun S, Auer D, Marth C.— The prognostic impact of bone marrow micrometastases in women with breast cancer. *Cancer Invest*, 2009, **27**, 598-603.
35. Braun S, Vogl FD, Naume B, et al.— A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*, 2005, **353**, 793-802.
36. Bidard FC, Vincent-Salomon A, Gomme S, et al.— Disseminated tumor cells of breast cancer patients : a strong prognostic factor for distant and local relapse. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**, 3306-3311.
37. Balic M, Dandachi N, Lin, H, and Datar RH.— Cancer metastasis : advances in the detection and characterization of disseminated tumour cells facilitate clinical translation. *Natl Med J India*, 2005, **18**, 250-255.
38. Muller V, Alix-Panabieres C, Pantel K.— Insights into minimal residual disease in cancer patients : implications for anti-cancer therapies. *Eur J Cancer*, 2010, **46**, 1189-1197.
39. Noël A, Gilles Ch, Foidart J-M.— Invasion et dissémination métastatiques dans le cancer du sein : mécanismes. *Rev Med Liège*, 2011, **66**, 274-278.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Dr C. Gilles, Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement, Université de Liège, GIGA-Cancer, CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique
E-mail : cgilles@ulg.ac.be