

Материал поступил в редакцию: 13-01-2015

Материал принят к печати: 24-02-2015

УДК 616-006

Detection of Circulating Tumor cells by ISET and their molecular characterization for use as liquid biopsy

Ismailova G.¹, Laget S.², Paterlini-Bréchet P.³

¹JSC "National Scientific Medical Research Center", Astana, Kazakhstan

²INSERM/Rarecells Diagnostics team, Paris, France

³University Paris Descartes, INSERM, Paris, France

Currently, the detection of theranostic biomarkers is performed on samples of tumor tissue, after pathological analysis. Circulating Tumor Cells (CTC) are a non-invasive source of tumor material potentially highly relevant to guide therapeutic choices and for early detection of resistance to therapy. The ISET (Isolation by Size of Tumor / Trophoblastic cells) method allows cytopathological diagnosis of CTC and their molecular analysis for theranostic analysis aimed to guide the use of targeted therapies. In particular, ISET allows the isolation of CTC without loss and without bias of selection and their immune-molecular characterization, including detection of vimentin, indicating indication their increased metastatic potential, and extensive analysis of gene mutations, such as EGFR, KRAS, ALK, HER2 genes, predictive of response to therapy.

Key words: circulating tumor cells, ISET, cytopathology, oncogenetics

J Clin Med Kaz 2015; 1(35):15-20

Correspondence Author: Patrizia Paterlini-Bréchet, University Paris Descartes, INSERM Unit U1151, 14 Maria Helena, Vieira Da Silva str. - CS 61431, 75014 Paris, e-mail: patriziapaterlini@gmail.com.

ISET ТЕХНОЛОГИЯСЫНЫҢ КӨМЕГІМЕН ҚАН АЙНАЛЫМЫНДАҒЫ ІСІК ЖАСУШАЛАРЫН АНЫҚТАУ МЕН ОЛАРДЫҢ СҮЙЫҚТЫҚТЫҚ БИОПСИЯ КЕЗІНДЕГІ МОЛЕКУЛАЛЫҚ СИПАТТАМАСЫ

Исмаилова Г.¹, Лагет С.², Пательини-Брешот П.³

¹«Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ, Астана қ., Қазақстан

²INSERM/Сирек жасушаларды диагностикалау тобы, Париж, Франция

³Декарт Париж университеті, INSERM, Париж, Франция

Қазіргі таңда онкологиялық аурулардың кейбір түрлерімен ауыратын науқастарға жеке ем таңдауға мүмкіндік беретін биомаркерлер бар. Қан айналымындағы ісік жасушалары (ҚАІЖ) ем түрін таңдау мен резистенттілікті ерте анықтау кезінде аса маңыздысы ісік материалының инвазивті емес көзі болып табылады. ISET (Isolation by Size of Tumor / Trophoblastic cells) – ісік жасушаларын көлеміне қарай оқшаулау тәсілі. Ол таргетті емді таңдау мен реттеу үшін ҚАІЖ цитопатогенді диагностикалау мен молекулалық талдау жасуға мүмкіндік береді. ISET ешбір залалсыз ҚАІЖ үлгісіндегі барлық жасушаларды талдап, иммундық-молекулалық сипаттамасын, метастаздану мүмкіндігінің жоғарылығына нұсқайтын виментин экспрессиясын анықтайды. Сонымен қатар, EGFR, KRAS, ALK и HER2 секілді емге жауапты болжайтын гендердің мутациясының талдауын жасайды.

Маңызды сөздер: қан айналымындағы ісік жасушалары, ISET, цитопатология, онкогенетика.

ДИАГНОСТИКА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ ISET И ИХ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ

Исмаилова Г.¹, Лагет С.², Пательини-Брешот П.³

¹АО «Национальный научный медицинский центр», г.Астана, Казахстан

²INSERM/Группа диагностики редких клеток, г.Париж, Франция

³Парижский университет Декарта, INSERM, г.Париж, Франция

В настоящее время существует ряд биомаркеров, позволяющих индивидуализировать подбор лечения у больных с некоторыми формами онкологических заболеваний. Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) являются неинвазивным источником опухолевого материала, потенциально очень важного для руководства выбора лечения и раннего обнаружения резистентности к терапии. ISET (Isolation by Size of Tumor / Trophoblastic cells) – метод изоляции опухолевых клеток по их размеру, который позволяет цитопатологически диагностировать ЦОК и выполнить их молекулярный анализ с целью, в частности, подбора и коррекции таргетного лечения. ISET позволяет изолировать все содержащиеся в образце крови CTC без значимых потерь и погрешностей отбора и выполнить иммуно-молекулярную характеристику, включая определение экспрессии виментина, которая указывает на повышенный метастатический потенциал, а также выполнить обширный анализ генных мутаций, таких как EGFR, KRAS, ALK и HER2 генов, предсказывающих ответ на терапию.

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки, ISET, цитопатология, онкогенетика.

Биология ЦОК

Процесс выхода раковых клеток в кровотоки и их циркуляции в нем (т.е. формирование ЦОК) является первым признаком инвазивной стадии рака [1-3]. С цитопатологической точки зрения, популяция ЦОК состоит из разных типов опухолевых клеток, таких как эпителиальные опухолевые клетки, мезенхимальные опухолевые клетки, клетки с гибридным эпителиально-мезенхимальным фенотипом, стволовые опухолевые клетки и опухолевые микроэмболы (циркулирующие опухолевые микроэмболы, ЦОМ) [1].

Инвазию долго считали последним этапом в развитии опухоли. Дополнительные представления об инвазии, которые появились за последнее время вследствие генетических, эпидемиологических и экспериментальных исследований на животных, свидетельствуют о способности агрессивных раковых опухолей выделять ЦОК на очень ранней стадии, даже на стадии карциномы *in situ*, на моделях животных [4]. В любом случае, инвазия возникает до того, как опухоль и/или метастаз становятся обнаруживаемыми методами визуализации [1,4]. Кроме того, на животных моделях было продемонстрировано, что наиболее агрессивные клетки в 100 раз чаще встречаются среди ЦОК, чем в первичной опухоли [4]. Кроме того, ЦОК могут «обогащаться» агрессивными клетками и играть ключевую роль в метастатическом прогрессировании рака, а также формировать клон опухолевых клеток, устойчивых к терапии. Возможная решающая роль ЦОК в процессе метастазирования имеет чрезвычайно важное клиническое значение и отличает их от всех других маркеров крови, которые являются молекулами, а не клетками: циркулирующие свободные ДНК (ctDNA), маркеры РНК, маркеры белка, такие как PSA, AFP и другие.

Изоляция и обнаружение CTC Методологические соображения

С технической точки зрения выделение ЦОК характеризуется двумя основными проблемами: чувствительностью и специфичностью. ЦОК - чрезвычайно редкие клетки. В одном миллилитре крови содержится приблизительно

10 миллионов лейкоцитов, 5 миллиардов эритроцитов [1], и возможно, только одна или несколько ЦОК. На ранних этапах опухолевой инвазии ЦОК еще реже встречаются. Таким образом, в диагностике ключевым фактором является чувствительность метода обнаружения ЦОК. Специфичность также является важнейшим фактором, поскольку неопухолевые эпителиальные клетки (нормальные или просто атипичные), эндотелиальные клетки и не-опухолевые стволовые клетки могут циркулировать в кровотоке и имеют отличия от ЦОК. Как следует из вышеизложенного, диагностическая идентификация ЦОК является основой, для их клинического применения в качестве «жидкостной биопсии» [1,5].

Существует не менее сорока различных методов выделения CTC из крови и их идентификации [6], однако технические аспекты выполнения многих из них оказывают отрицательное влияние на чувствительность и специфичность метода обнаружения ЦОК. Принципиально, имеется два ведущих подхода к обнаружению и сбору ЦОК в крови пациента: «с или без» использования антител. Однако, принимая во внимание разнородность ЦОК и отсутствие ЦОК-специфических антител [1], их применение для сбора и/или идентификации ЦОК может привести к погрешностям выделения и/или, т.е. к ложноположительным/ ложноотрицательным результатам [1,6].

Метод ISET

Метод ISET (Isolation by Size of Tumor cells - Изоляция по размеру опухолевых клеток, Rarecells Diagnostics, Франция) основан на классических цитопатологических критериях: больший размер опухолевых клеток, происходящих из различных солидных опухолей (более 16 микрон в диаметре) по сравнению с клетками крови. Технология ISET позволяет быстро обработать образец крови на фильтре без использования антител. Это становится возможным благодаря удалению всех эритроцитов и большинства лейкоцитов и сохранению без потерь всех клеток размером более 8 микрон, включая все типы ЦОК всех типов рака [1].

Прибор и расходные материалы, необходимые для

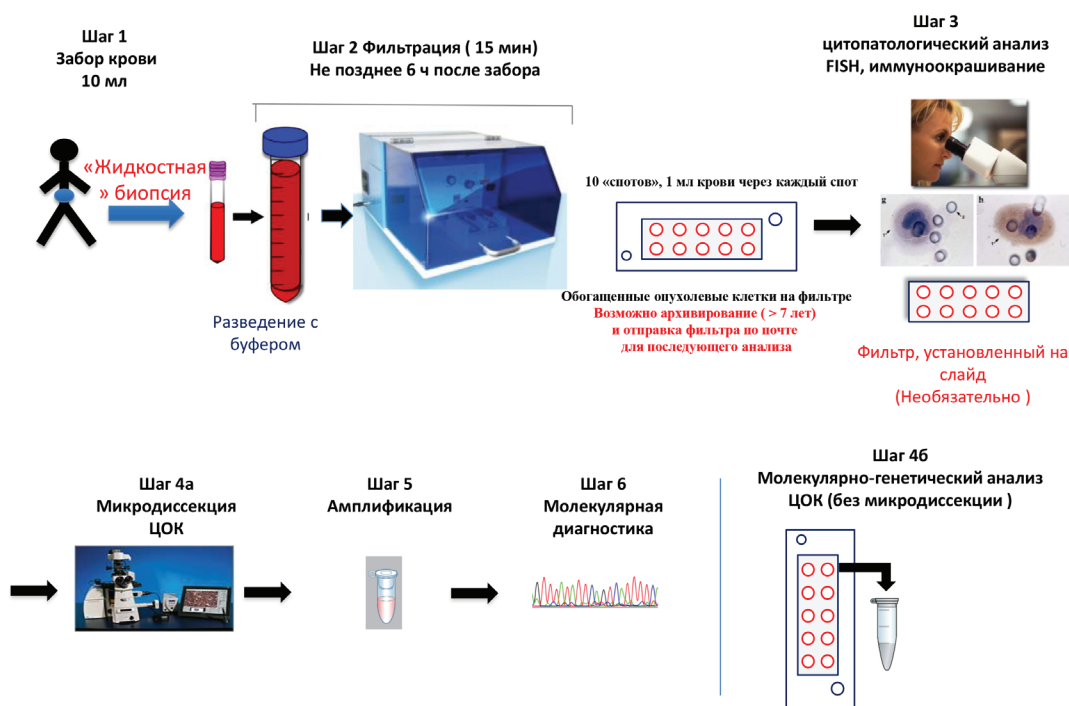


Рисунок 1. Сбор, идентификация и характеристика ЦОК методом ISET

методики ISET (буфер, блоки), недавно получили CE IVD маркировку. Они представляют собой уникальную комбинацию из 30 параметров и технологических процессов, которые являются основой беспрецедентной чувствительности ISET [1,7,8] и определяют способность изолировать неповрежденные ЦОК, что необходимо для их дальнейшего цитопатологического и иммуно-молекулярного исследования. Фактически, как показали исследования, ISET позволяет повторно изолировать одну и ту же опухолевую клетку, смешанную с 10 мл крови, с надежностью более 98%.

Насколько нам известно, такие результаты никогда ранее не достигались другими методами, включая альтернативные методики, также основанные на фильтрации крови. Фактически, фильтрация крови позволяет изолировать циркулирующие редкие клетки. Выделение опухолевых или эмбриональных клеток является очень сложной областью из-за огромного разрыва между количеством клеток, которые должны быть элиминированы (100 миллионов лейкоцитов и 50 миллиардов эритроцитов в 10 мл крови) и количеством клеток, которые должны быть добыты путем фильтрации (небольшое количество). Кроме того, ЦОК являются очень хрупкими клетками и должны быть сохранены неповрежденными, чтобы провести их дальнейшее цитопатологическое и иммуно-молекулярное исследование. Наконец, кровь является разнородной биологической жидкостью и склонна к сворачиванию, что создает препятствия для фильтрации. Таким образом, фильтрация крови является реальной проблемой, которая подразумевает необходимость рассматриваемой методики, справится со всеми биофизическими и биологическими аспектами проблемы.

Очень высокая чувствительность ISET была продемонстрирована: 1) в тестах на чувствительность, выполненных нашей командой и другими независимыми командами [1,7]; 2) в клинических исследованиях, посвященных сравнительному изучению метода ISET и методики CellSearch, утвержденной FDA для мониторинга метастатических пациентов. Исследования показали намного более высокую чувствительность ISET по сравнению с CellSearch [7,9,10,11,29,12]; 3) в исследованиях, которые подтвердили, что ISET до сих пор является единственным подходом для изоляции очень редких циркулирующих трофобластных клеток плода из материнской крови [13,14,15,16].

Ма и др. недавно обобщили различные преимущества ISET и результаты нескольких исследований, проводимых с ISET [8]: ЦОК обнаруживаются с помощью метода ISET у пациентов с опухолями эпителиальной природы, включая рак печени, молочной железы, простаты, почки, головы-шеи, поджелудочной железы, легких (немелкоклеточный рак легкого и мелкоклеточный рак легкого), ободочной и прямой кишки, а также у больных с саркомами и меланомами, включая увеальную меланому [8,17].

Фундаментальные исследования, посвященные применению ISET в моделях на животных, также показали возможность изучения ЦОК у крыс [8] и мышей (неопубликованные данные).

Циркулирующие опухолевые клетки (СТС) и циркулирующие раковые клетки (ССС)

Методика ISET, позволяющая выделять неповрежденные ЦОК, является единственным клинически проверенным методом для цитопатологической диагностики ЦОК/ЦОМ по обычным цитопатологическим критериям, которые применяются врачами-цитологами при оценке мазка по Папаниколу или тонкоигольной биопсии [18]. Эта особенность ISET подтверждена в исследовании с участием десяти цитопатологов, которые вслепую проанализировали кровь 770 пациентов, обработанную ISET методом, включая 569 больных разными типами рака и 201 субъекта без рака [18]. Кроме того, ISET имеет намного более высокую чувствительность, чем другие методы изоляции опухолевых микроэмболов (ЦОМ) или кластеров, состоящих из нескольких ЦОК. Полагают, что присутствие ЦОМ коррелирует с плохим прогнозом [7,19,9]. Сама способность ISET выделять и количественно оценивать ЦОК и ЦОМ крови позволила ввести в практику термин «Циркулирующие опухолевые микроэмболы».

Ошибки при выделении ЦОК могут иметь драматические последствия, в особенности, если они дают онкологу неверную информацию об ответе пациента на терапию [20]. Поэтому обнаружение и количественный подсчет ЦОК в сочетании с их применением для молекулярных исследований предоставляют онкологу наиболее достоверную информацию для терапевтического выбора.

Сравнение методов ISET и CellSearch

CellSearch (Veridex, США) является наиболее распространенным методом определения ЦОК. Он основан на захвате эпителиальных клеток антителами, направленными против мембранного эпителиального антигена EpCAM. CellSearch является специфичным для циркулирующих эпителиальных клеток, но, строго говоря, не позволяет судить об опухолевой природе выделенных клеток [9]. Эта технология была объектом исследований, которые продемонстрировали ее прогностическое значение, и имеет разрешение FDA США (Управление по контролю за продуктами и лекарствами) для использования у пациентов с метастатическим раком молочной железы, простаты или колоректальным раком [6]. Однако клиническая польза этого теста все еще является спорной, так как тест не показал большую клиническую выгоду, чем классические сывороточные маркеры опухоли [21], что мешает широкому распространению CellSearch в рутинной клинической практике.

Несколько независимых команд сравнили ISET с CellSearch у пациентов с немелкоклеточным раком легкого, раком молочной железы, раком простаты, меланомой и раком поджелудочной железы [7,9,10,11,12,22] и показали, что ISET значительно более чувствительный метод, чем CellSearch.

Таблица 1. Сравнительное исследование чувствительности методов ISET и CellSearch

Тип рака	Количество пациентов	ISET, % Пациенты С ЦОК	CellSearch, % пациентов С ЦОК (порог)	ISET, Среднее число С ЦОК 7,5 мл крови	CellSearch Среднее Количество эпителиальных клеток в 7,5 мл крови	Ссылка
Немелкоклеточный рак легкого	210 (неметастатический и метастатический)	50%	39%(≥ 1) 21%(≥ 2)	Не указано	Не указано	Hofman, 2010 In J of cancer
	20 (метастатический)	100%	45%(≥ 1) 25%(≥ 2)	5	0	Farace, 2011, Bri J of Cancer
	40 (IIIА - IV)	80%	23%(≥ 2)	23	0	Krebs 2012, JTO
	32 (метастатический)	100%	33%(≥ 1)	128	1	Pailler 2013, JCO
Рак простаты	20 (метастатический)	100%	90%(≥ 1) 60%(≥ 5)	17	8	Farace 2011 Bri J of Cancer
Рак молочной железы	20 (метастатический)	85%	75%(≥ 1) 40%(≥ 5)	2	2	Farace 2011 Bri J of Cancer
Рак поджелудочной железы	54 (неметастатический и метастатический)	93%	40%(≥ 1)	9	0	Khoja, 2011 Bri J of Cancer

Ограничения применения ЦОК и новые разработки

В целом, изучение ЦОК затруднено, поскольку сами ЦОК недостаточно стабильны в крови. Никакой фиксатор или буфер не позволяет сохранить в целости размер и морфологию этих редких клеток в течение нескольких часов, вынуждая исследователей обработать кровь в день сбора, чтобы избежать потери ЦОК. Однако несколько команд в настоящее время вовлечены в научное исследование, направленное на решение этой проблемы.

Несмотря на то, что продолжительность обработки крови при использовании системы ISET составляет всего около 15 минут, сама методика является только частично автоматизированной. Однако есть возможность использования сканирования и программного обеспечения для анализа изображений и автоматизированного чтения фильтров [7,12]. ISET фильтр, обработанный стандартным красителем или другим способом (иммуноокрашивание, FISH и т.д.), можно разместить между стеклом и покровным стеклом и заархивировать, как обычный слайд. Фильтр также имеет преимущество в отношении возможности выполнить микродиссекцию и таргетный молекулярный анализ ЦОК и циркулирующих эмбриональных клеток [13].

Возможности изучения ЦОК ограничиваются применением формальдегида, используемого в методике ISET. Специально для транскриптомного анализа разработан вариант методики ISET для сбора нефиксированных ЦОК, который объединен с ручной или автоматизированной системой микроманипуляции.

Часто обсуждаемой проблемой является гипотетическая потеря «маленьких» ЦОК через поры размером 8 микрон. Нужно отметить, что до сегодняшнего дня минимальный размер ЦОК, диагностированных с помощью различных методик, составлял более 8 микрон. Кроме того, ISET позволяет выделять в крови клетки линий стволовых клеток с такой же чувствительностью, как ЦОК.

Диагностическое и терапевтическое применение ЦОК

Образцы опухолевой ткани, полученные инвазивными хирургическими или полу-хирургическими методами, обычно перед проведением специальных иммунных или молекулярно-генетических тестов подвергаются патоморфологической оценке [23]. Молекулярная характеристика ЦОК, изолированных методом ISET, может проводиться также после того, как опухолевая природа клеток будет подтверждена цитопатологически. Это важно, поскольку позволяет избежать погрешностей и грубых, потенциально драматичных терапевтические ошибки.

Ограниченное количество доступной ДНК опухоли от ЦОК является основным препятствием для анализа мутаций BRAF, KRAS и EGFR и других генов, которые важны для назначения таргетных препаратов при раке легкого, колоректальном раке, меланоме и других формах рака. Несмотря на это, различные коллективы авторов, включая нашу группу, опубликовали данные, свидетельствующие о возможности рутинной диагностики KRAS и EGFR мутаций в ограниченном количестве полученных опухолевых [24]. Эти работы подтверждают возможность молекулярных исследований ЦОК, изолированных с помощью ISET.

У нашей команды имеется обширный опыт исследований ДНК единичных клеток, изолированных с помощью ISET [13,25,14,15,16]. В частности, после цитопатологической диагностики были изучены случайные мутации в гене beta-caténin ЦОК, выделенных от пациентов с раком печени [25]. Кроме того, у 7 пациентов с раком молочной железы методом количественной ПЦР изучена амплификация HER2 гена в ЦОК и ткани первичных опухолей. В этом исследовании ДНК была выделена из ЦОК с помощью микродиссекции после иммуно-окрашивания с анти-цитокератиновыми антителами [26]. Новые молекулярные методы, разработанные на сегодняшний день, позволяют выполнить анализ групп мультионкогенов и полное геномное исследование ЦОК с применением секвенирования следующего поколения (неопубликованные данные).

У пациентов с метастатической меланомой V600E мутация BRAF гена является предиктором ответа на вемурафениб. Хофман и др. с помощью исследовали присутствие мутации BRAF в ткани опухоли и в ЦОК у 98 пациентов [27]. В этом исследовании у половины пациентов выявлена опухоль с мутацией BRAF. Результаты, полученные на ткани опухоли, в основном совместимы с результатами, полученными на ЦОК. Однако среди 87 пациентов, у которых обнаружены ЦОК, в 8 случаях мутация BRAF выявлена в ЦОК при отсутствии ее в первичной опухоли. Этот феномен несоответствия может быть связан с внутриопухолевой генетической разнородностью [28] или с изменением мутационного статуса во время развития болезни и подчеркивает важность персонифицированной диагностики и лечения [28].

Присутствие EML4-ALK рекомбинации, предикторный маркер ответа на кризотиниб, было обнаружено на ЦОК, изолированных ISET из образцов крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого [12,23]. Группа профессора Пауля Хофмана первоначально провела цитопатологический анализ ЦОК у группы пациентов с раком легкого [18]. В 2012 г. та же группа опубликовала результаты иммуноокрашивания и ALK-специфичного анализа FISH, выполненных на ISET фильтрах, ранее полученных от пациентов с раком легкого и в последующем заархивированных [23]. Слепой анализ ЦОК и соответствующей ткани опухоли у 87 пациентов показал идеальное соответствие: у 5 пациентов найдены положительные результаты и в ЦОК, и в опухоли, а у 82 пациентов отрицательные результаты обоих тестов.

Paillet и др. [12] из Института Гюстава Русси изучили экспрессию маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) методом многоцветной иммуофлюоресценции, а также присутствие ALK-рекомбинации с помощью FISH на выделенных с помощью ISET клетках пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Анализ показал, что у ЦОК с ALK рекомбинацией имеет место однородный мезен-

химальный фенотип (все клетки показали экспрессию виментинном), что контрастирует с гетерогенной экспрессией мезенхимальных маркеров в первичной опухоли. Это исследование включало 18 пациентов с ALK рекомбинацией гена в опухоли и 12 пациентов без ALK рекомбинации, при этом анализ показал полное соответствие статуса ALK в ткани опухоли и ЦОК. Отмечено, что у 4 пациентов из 18 с ALK рекомбинацией гена в первичной опухоли потребовалась повторная биопсия, чтобы определить, больше ли процент клеток с ALK рекомбинацией, чем 15% (требуемый порог для назначения кризотиниба). Напротив, анализ, выполненный на ISET фильтрах, позволил правильно определить статус ALK во всех 18 случаях, обнаружив, по крайней мере, 4 ЦОК с ALK рекомбинацией в 1 мл крови. Нужно также отметить, что у всех 18 пациентов метод ISET позволил выделить ЦОК, тогда как CellSearch позволил выделить ЦОК только у 6 пациентов. При этом количество выделенных с помощью ISET ЦОК было значительно большим.

Выводы

Изучение ЦОК, вероятно, принесет значительную клиническую и экономическую пользу благодаря возможности неинвазивной диагностики по крови у пациентов, которым требуется таргетная терапия. Однако необходимо помнить, что новые диагностические методики могут служить источниками терапевтических ошибок и ненужных затрат. Метод ISET разработан специально для диагностического выявления ЦОК и их последующего анализа. В этом контексте мы должны подчеркнуть, что выделение ЦОК, возможно, позволит неинвазивно определять рецидивы рака на ранней стадии. Применение методик с высокой пропускной способностью и возможностью характеризовать выделенные в кровотоке ЦОК должно позволить внедрить неинвазивные биомаркеры для более персонифицированной и эффективной медицинской помощи в ближайшем будущем.

Литература

1. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions, *Cancer Lett*, 2007, No.18;253(2), pp.180-204.
2. Wittekind C, Neid M. Cancer invasion and metastasis, *Oncology*, 2005, No. 69 Suppl 1, pp.14-16.
3. Gupta PB, Mani S, Yang J, Hartwell K, Weinberg RA. The evolving portrait of cancer metastasis, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005, No.70, pp.291-297.
4. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation, *Cell*, 2012, No.20;148(1-2), pp.349-361.
5. Paterlini Bréchet P. Organ-specific markers in circulating tumor cell screening: an early indicator of metastasis-capable malignancy, *Future Oncology*, 2011, No.7(5), pp. 849-871.
6. Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG, Compton C, Cristofanilli M, Deisseroth A, et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use, *J Transl Med*, 2012, No.10, p.138.
7. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches, *J Thorac Oncol*, 2012, No.7(2), pp.306-315.
8. Ma YC, Wang L, Yu FL. Recent Advances and Prospects in the Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells (ISET) Methodology, *Technol Cancer Res Treat*, 2012, No. 12(4), pp.295-309.
9. Hofman V, Ilie MI, Long E, Selva E, Bonnetaud C, Molina T, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small cell lung carcinoma: Comparison of the efficacy of the CellSearch Assay and the isolation by size of epithelial tumor cell method, *Int J Cancer*, 2010, No.2, p.2011.
10. Farace F, Massard C, Vimond N, Drusch F, Jacques N, Billiot F, et al. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas, *Br J Cancer*, 2011, No. 105(6), pp.847-853.
11. Khoja L, Backen A, Sloane R, Menasce L, Ryder D, Krebs M, et al. A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker, *Br J Cancer*, 2012, No.31;106 (3), pp.508-516.
12. Paillet, Emma, Adam J, Barthelemy A, Oulhen M et al. Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK

- rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 2013, No.31.18, pp.2273-2281.
13. Mouawia H, Saker A, Jais JP, Benachi A, Bussieres L, Lacour B, et al. Circulating trophoblastic cells provide genetic diagnosis in 63 fetuses at risk for cystic fibrosis or spinal muscular atrophy, *Reprod Biomed Online*, 2012, No.25(5), pp.508-520.
 14. Vona G, Bérout C, Benachi A, Quenette JP, Bonnefont Y, Dumez Y, Lacour B, Paterlini-Bréchet, P. Enrichment and genetic analyses of fetal cells circulating in the maternal blood by the ISET technique and single cell microdissection : a non-invasive tool for early prenatal diagnosis, *Am J Pathol*, 2002, No.160, pp.51-58.
 15. Bérout C, Karliova M, Bonnefont JP, Benachi A, Munnich A, Dumez Y, Lacour B, Paterlini-Bréchet P. Prenatal diagnosis of Spinal Muscular Atrophy (SMA) by genetic analysis of circulating fetal cells, *The Lancet*, 2003, No.361, pp.1013-1014.
 16. Saker A, Benachi A, Bonnefont JP, Munnich A, Dumez Y, Lacour B, Paterlini-Brechot P. Genetic characterization of circulating fetal cells allows non invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis, *Prenat Diagn*, 2006, No.26, pp.906-916.
 17. Lelievre L, Paterlini-Brechot P, Cammatte S, Tartour E, Aggerbeck M, Vilde F, Lecuru F. Effect of laparoscopy versus laparotomy on circulating tumor cells using isolation by size of epithelial tumor cells, *Int J Gynecol Cancer*, 2004, No.14, pp.229-233.
 18. Hofman VJ, Ilie MI, Bonnetaud C, Selva E, Long E, Molina T, et al. Cytopathologic detection of circulating tumor cells using the isolation by size of epithelial tumor cell method: promises and pitfalls, *Am J Clin Pathol*, 2011, No.135(1), pp.146-156.
 19. Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, Swain RK, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer, *J Clin Oncol*. 2012, No.30(5), pp.525-532.
 20. Chinen L, De Carvalho F, Rocha B, Aguiar C, Abdallah E, Campanha D, Mingues N, De Oliveira T, Maciel M, Cervantes G, Dettino A, Soares F, Paterlini-Brechot P, Fanelli M. Cytokeratin-based CTC counting unrelated to clinical follow up, *Journal of thoracic disease*, 2013, No.5.5, pp.593.
 21. Bidard FC, Hajage D, Bachelot T, Delaloge S, Brain E, et al. Assessment of circulating tumor cells and serum markers for progression-free survival prediction in metastatic breast cancer: a prospective observational study, *Breast Cancer Res*, 2012, No.14.1, pp.29.
 22. Khoja, L., Shenjere, P., Hodgson, C., Hodgetts, J., et al. Prevalence and heterogeneity of circulating tumour cells in metastatic cutaneous melanoma, *Melanoma research*, 2014, No.24(1), pp.40-46.
 23. Ilie M, Long E, Butori C, Hofman V, Coelle C, Mauro V, et al. ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma, *Ann Oncol*. 2012, No.23(11), pp.2907-2913.
 24. Malapelle U, de Rosa N, Rocco D, Bellevicine C, Crispino C, Illiano A, et al. EGFR and KRAS mutations detection on lung cancer liquid-based cytology: a pilot study, *J Clin Pathol*, 2011, No.65(1), pp.87-91.
 25. Vona G, Estepa L, Beroud C, Damotte D, Capron F, Nalpas B, et al. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer, *Hepatology*, 2004, No.39(3), pp.792-797.
 26. Pinzani P, Salvadori B, Simi L, Bianchi S, Distante V, Cataliotti L, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection, *Hum Pathol*. 2006, No.37(6), pp.711-718.
 27. Hofman V, Ilie M, Long-Mira E, Giacchero D, Butori C, Dadone B, et al. Usefulness of immunocytochemistry for the detection of the BRAF(V600E) mutation in circulating tumor cells from metastatic melanoma patients, *J Invest Dermatol*, 2012, No.133(5), pp.1378-1381.
 28. Bidard FC, Pierga JY, Soria JC, Thiery JP. Translating metastasis-related biomarkers to the clinic--progress and pitfalls, *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 , No.10(3), pp.169-179.