

**ANNEE 2019**

N°

**TITRE DE LA THESE**

**Apport de la recherche de cellules tumorales circulantes (technique ScreenCell®), couplées à l'ADN libre circulant pour le suivi des patients atteints de mélanome métastatique**

**THESE**  
Présentée

à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon  
Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le 20 septembre 2019

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par **BADRIGNANS Marine**

Née le 08/02/1992

A Saint-Etienne (42)



## **AVERTISSEMENT**

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à la disposition de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur.

Ceci implique une obligation de citation et de référencement dans la rédaction de vos travaux.

D'autre part, toutes contrefaçons, plagiats, reproductions illicites encourt une poursuite pénale.

De juridiction constante, en s'appropriant tout ou partie d'une œuvre pour l'intégrer dans son propre document, l'étudiant se rend coupable d'un délit de contrefaçon (au sens de l'article L.335.1 et suivants du code de la propriété intellectuelle). Ce délit est dès lors constitutif d'une fraude pouvant donner lieu à des poursuites pénales conformément à la loi du 23 décembre 1901 dite de répression des fraudes dans les examens et concours publics.

**ANNEE 2019**

N°

**TITRE DE LA THESE**

**Apport de la recherche de cellules tumorales circulantes (technique ScreenCell®), couplées à l'ADN libre circulant pour le suivi des patients atteints de mélanome métastatique**

**THESE**  
Présentée

à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon  
Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le 20 septembre 2019

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par **BADRIGNANS Marine**

Née le 08/02/1992

A Saint-Etienne (42)

Année Universitaire 2019-2020  
au 1<sup>er</sup> Septembre 2019

Doyen :  
Assesseurs :

**M. Marc MAYNADIÉ**  
M. Pablo ORTEGA-DEBALLON  
Mme Laurence DUVILLARD

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

		<b>Discipline</b>	
M.	Sylvain	<b>AUDIA</b>	Médecine interne
M.	Marc	<b>BARDOU</b>	Pharmacologie clinique
M.	Jean-Noël	<b>BASTIE</b>	Hématologie - transfusion
M.	Emmanuel	<b>BAULOT</b>	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Yannick	<b>BEJOT</b>	Neurologie
Mme	Christine	<b>BINQUET</b>	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M.	Philippe	<b>BONNIAUD</b>	Pneumologie
M.	Alain	<b>BONNIN</b>	Parasitologie et mycologie
M.	Bernard	<b>BONNOTTE</b>	Immunologie
M.	Olivier	<b>BOUCHOT</b>	Chirurgie cardiovasculaire et thoracique
M.	Belaïd	<b>BOUHEMAD</b>	Anesthésiologie - réanimation chirurgicale
M.	Alexis	<b>BOZORG-GRAYELI</b>	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	Alain	<b>BRON</b>	Ophthalmologie
M.	Laurent	<b>BRONDEL</b>	Physiologie
Mme	Mary	<b>CALLANAN</b>	Hématologie type biologique
M.	Patrick	<b>CALLIER</b>	Génétique
Mme	Catherine	<b>CHAMARD-NEUWIRTH</b>	Bactériologie - virologie; hygiène hospitalière
M.	Pierre-Emmanuel	<b>CHARLES</b>	Réanimation
M.	Jean-Christophe	<b>CHAUVET-GELINIER</b>	Psychiatrie d'adultes, Addictologie
M.	Nicolas	<b>CHEYNEL</b>	Anatomie
M.	Alexandre	<b>COCHET</b>	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Luc	<b>CORMIER</b>	Urologie
M.	Yves	<b>COTTIN</b>	Cardiologie
M.	Charles	<b>COUTANT</b>	Gynécologie-obstétrique
M.	Gilles	<b>CREHANGE</b>	Oncologie-radiothérapie
Mme	Catherine	<b>CREUZOT-GARCHER</b>	Ophthalmologie
M.	Frédéric	<b>DALLE</b>	Parasitologie et mycologie
M.	Alexis	<b>DE ROUGEMONT</b>	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
M.	Hervé	<b>DEVILLIERS</b>	Médecine interne
M.	Serge	<b>DOUVIER</b>	Gynécologie-obstétrique
Mme	Laurence	<b>DUVILLARD</b>	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Olivier	<b>FACY</b>	Chirurgie générale
Mme	Laurence	<b>FAIVRE-OLIVIER</b>	Génétique médicale
Mme	Patricia	<b>FAUQUE</b>	Biologie et Médecine du Développement
Mme	Irène	<b>FRANCOIS-PURSSELL</b>	Médecine légale et droit de la santé
M.	François	<b>GHIRINGHELLI</b>	Cancérologie
M.	Pierre Grégoire	<b>GUINOT</b>	Anesthésiologie – réanimation chirurgicale
M.	Frédéric	<b>HUET</b>	Pédiatrie
M.	Pierre	<b>JOUANNY</b>	Gériatrie
M.	Sylvain	<b>LADOIRE</b>	Histologie
M.	Gabriel	<b>LAURENT</b>	Cardiologie
M.	Côme	<b>LEPAGE</b>	Hépatogastroentérologie
M.	Romarc	<b>LOFFROY</b>	Radiologie et imagerie médicale
M.	Luc	<b>LORGIS</b>	Cardiologie

M.	Jean-Francis	<b>MAILLEFERT</b>	Rhumatologie
M.	Cyriaque Patrick	<b>MANCKOUNDIA</b>	Gériatrie
M.	Sylvain	<b>MANFREDI</b>	Hépatogastroentérologie
M.	Laurent	<b>MARTIN</b>	Anatomie et cytologie pathologiques
M.	David	<b>MASSON</b>	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Marc	<b>MAYNADIÉ</b>	Hématologie – transfusion
M.	Marco	<b>MIDULLA</b>	Radiologie et imagerie médicale
M.	Thibault	<b>MOREAU</b>	Neurologie
M.	Klaus Luc	<b>MOURIER</b>	Neurochirurgie
Mme	Christiane	<b>MOUSSON</b>	Néphrologie
M.	Paul	<b>ORNETTI</b>	Rhumatologie
M.	Pablo	<b>ORTEGA-DEBALLON</b>	Chirurgie Générale
M.	Pierre Benoit	<b>PAGES</b>	Chirurgie thoracique et vasculaire
M.	Jean-Michel	<b>PETIT</b>	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Christophe	<b>PHILIPPE</b>	Génétique
M.	Lionel	<b>PIROTH</b>	Maladies infectieuses
Mme	Catherine	<b>QUANTIN</b>	Biostatistiques, informatique médicale
M.	Jean-Pierre	<b>QUENOT</b>	Réanimation
M.	Patrick	<b>RAY</b>	Médecine d'urgence
M.	Patrick	<b>RAT</b>	Chirurgie générale
M.	Jean-Michel	<b>REBIBOU</b>	Néphrologie
M.	Frédéric	<b>RICOLFI</b>	Radiologie et imagerie médicale
M.	Paul	<b>SAGOT</b>	Gynécologie-obstétrique
M	Maxime	<b>SAMSON</b>	Médecine interne
M.	Emmanuel	<b>SAPIN</b>	Chirurgie Infantile
M.	Emmanuel	<b>SIMON</b>	Gynécologie-obstétrique
M.	Éric	<b>STEINMETZ</b>	Chirurgie vasculaire
Mme	Christel	<b>THAUVIN</b>	Génétique
M.	Benoit	<b>TROJAK</b>	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
M.	Pierre	<b>VABRES</b>	Dermato-vénérologie
M.	Bruno	<b>VERGÈS</b>	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Narcisse	<b>ZWETYENGA</b>	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

#### PROFESSEURS EN SURNOMBRE

M.	Alain	<b>BERNARD</b> (surnombre jusqu'au 31/08/2021)	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M.	Bernard	<b>BONIN</b> (Surnombre jusqu'au 31/08/2020)	Psychiatrie d'adultes
M.	Jean-Marie	<b>CASILLAS-GIL</b> (Surnombre jusqu'au 31/08/2020)	Médecine physique et réadaptation
M.	Pascal	<b>CHAVANET</b> (Surnombre jusqu'au 31/08/2021)	Maladies infectieuses

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES  
PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES MEDICALES**

			<b>Discipline Universitaire</b>
M.	Jean-Louis	<b>ALBERINI</b>	Biophysiques et médecine nucléaire
Mme	Lucie	<b>AMOUREUX BOYER</b>	Bactériologie
Mme	Shaliha	<b>BECHOUA</b>	Biologie et médecine du développement
M.	Mathieu	<b>BLOT</b>	Maladies infectieuses
M.	Benjamin	<b>BOUILLET</b>	Endocrinologie
Mme	Marie-Claude	<b>BRINDISI</b>	Nutrition
Mme	Marie-Lorraine	<b>CHRETIEN</b>	Hématologie
Mme	Vanessa	<b>COTTET</b>	Nutrition
M.	Damien	<b>DENIMAL</b>	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Ségolène	<b>GAMBERT-NICOT</b>	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Marjolaine	<b>GEORGES</b>	Pneumologie
Mme	Françoise	<b>GOIRAND</b>	Pharmacologie fondamentale
M.	Charles	<b>GUENANCIA</b>	Physiologie
Mme	Agnès	<b>JACQUIN</b>	Physiologie
M.	Alain	<b>LALANDE</b>	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Louis	<b>LEGRAND</b>	Biostatistiques, informatique médicale
Mme	Stéphanie	<b>LEMAIRE-EWING</b>	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Pierre	<b>MARTZ</b>	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Alain	<b>PUTOT</b>	Gériatrie
M.	Paul-Mickaël	<b>WALKER</b>	Biophysique et médecine nucléaire

**PROFESSEURS EMERITES**

M.	Laurent	<b>BEDENNE</b>	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	Jean-François	<b>BESANCENOT</b>	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	François	<b>BRUNOTTE</b>	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	Philippe	<b>CAMUS</b>	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Jean	<b>CUISENIER</b>	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Jean-Pierre	<b>DIDIER</b>	(01/11/2018 au 31/10/2021)
Mme	Monique	<b>DUMAS-MARION</b>	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Claude	<b>GIRARD</b>	(01/01/2019 au 31/12/2021)
M.	Maurice	<b>GIROUD</b>	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	François	<b>MARTIN</b>	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Henri-Jacques	<b>SMOLIK</b>	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Pierre	<b>TROUILLOUD</b>	(01/09/2017 au 31/08/2020)

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE**

M.	Jean-Noël	<b>BEIS</b>	Médecine Générale
----	-----------	-------------	-------------------

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE**

Mme	Katia	<b>MAZALOVIC</b>	Médecine Générale
-----	-------	------------------	-------------------

**PROFESSEURS ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE**

M.	Didier	<b>CANNET</b>	Médecine Générale
M.	François	<b>MORLON</b>	Médecine Générale

### **MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE**

M.	Clément	<b>CHARRA</b>	Médecine Générale
Mme	Anne	<b>COMBERNOUX -WALDNER</b>	Médecine Générale
M.	Benoit	<b>DAUTRICHE</b>	Médecine Générale
M.	Alexandre	<b>DELESVAUX</b>	Médecine Générale
M.	Rémi	<b>DURAND</b>	Médecine Générale
M.	Arnaud	<b>GOUGET</b>	Médecine Générale

### **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES**

Mme	Lucie	<b>BERNARD</b>	Anglais
M.	Didier	<b>CARNET</b>	Anglais
Mme	Catherine	<b>LEJEUNE</b>	Pôle Epidémiologie
M.	Gaëtan	<b>JEGO</b>	Biologie Cellulaire

### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Mme	Marianne	<b>ZELLER</b>	Physiologie
-----	----------	---------------	-------------

### **PROFESSEURS AGREGES de L'ENSEIGNEMENT SECONDAIRE**

Mme	Marceline	<b>EVRARD</b>	Anglais
Mme	Lucie	<b>MAILLARD</b>	Anglais

### **PROFESSEURS CERTIFIES**

Mme	Anaïs	<b>CARNET</b>	Anglais
M.	Philippe	<b>DE LA GRANGE</b>	Anglais
Mme	Virginie	<b>ROUXEL</b>	Anglais (Pharmacie)

### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES**

M.	Mathieu	<b>BOULIN</b>	Pharmacie clinique
M.	François	<b>GIRODON</b>	Sciences biologiques, fondamentales et cliniques
Mme	Evelyne	<b>KOHLI</b>	Immunologie

### **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES**

M.	Philippe	<b>FAGNONI</b>	Pharmacie clinique
M.	Frédéric	<b>LIRUSSI</b>	Toxicologie
M.	Marc	<b>SAUTOUR</b>	Botanique et cryptogamie
M.	Antonin	<b>SCHMITT</b>	Pharmacologie



L'UFR des Sciences de Santé de Dijon, Circonscription Médecine, déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

## **COMPOSITION DU JURY**

Président : Professeur MARTIN Laurent

Membres : Professeur ZWETYENGA Narcisse  
Professeur ORTONNE Nicolas  
Docteur WECHSLER Janine  
Docteur DALAC Sophie  
Docteur AUBRIOT-LORTON Marie-Hélène

# Remerciements

A mon président de thèse, Professeur Laurent Martin

Je vous remercie de votre confiance et votre soutien dans ce projet, et d'avoir accepté de présider ce jury.

Votre enseignement et votre disponibilité tout au long de ces années d'internat m'ont permis d'apprendre ce métier dans les meilleures conditions.

A ma directrice de thèse, Docteur Marie-Hélène Aubriot-Lorton

Pour m'avoir aussi bien guidée et soutenue dans ce projet. Merci pour votre enseignement, et pour m'avoir transmis une rigueur et une curiosité dans le travail qui me seront utiles tout au long de ma carrière. J'apprécie vraiment d'apprendre la dermatopathologie à vos côtés, merci pour votre soutien dans ce choix.

Au Docteur Sophie Dalac

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce travail et de ce jury. Les six mois passés dans votre service ont été des plus enrichissants sur le plan professionnel et humain.

Au Professeur Nicolas Ortonne

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger mon travail et de m'accueillir dans votre service au mois de novembre.

Au Docteur Janine Wechsler

Je vous remercie de nous avoir fait confiance pour mener à bien cette étude et de votre soutien tout au long de sa réalisation. C'est un honneur de vous avoir dans ce jury.

Au Professeur Narcisse Zwetyenga

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger mon travail.

A tous les médecins du service d'anapath :

Mathilde, apprendre à vos côtés est un plaisir, vous avez pris le temps de me transmettre des connaissances solides qui me seront précieuses pour les années à venir.

Catherine, même si nous n'avons pas encore pu trop travailler ensemble, discuter avec vous est toujours très enrichissant.

Haingo, pour ta bonne humeur dans le service et ta disponibilité

Alice, pour avoir toujours été là, co-interne puis assistante, quand j'avais du mal en macro, ou juste pour papoter ! On n'aura pas tellement eu le temps de travailler ensemble maintenant que tu es PH, mais c'est pour la bonne cause ...

Selim, pour tous ces moments à discuter de choses plus ou moins sérieuses, pour tes Starbucks, pour ton organisation à toute épreuve, mais surtout pour nous montrer tous les jours comme notre spé peut être passionnante !

Fara, Charly, Damien

Au service du CGFL,

Dr Laurent Arnould, merci pour votre enseignement, vous avez réussi à me faire aimer la gynécopathologie et pourtant ce n'était pas gagné ... J'ai vraiment apprécié les six mois passer dans votre service qui ont été très stimulant intellectuellement.

Céline, pour tous ces sarcomes ... Merci de m'avoir donné les cartes pour pouvoir me débrouiller avant de vous envoyer mes avis !

Françoise, pour les corrections de RE/RP et surtout de Ki67 qui ont égayé nos après-midis !

Émilie, ton rire dans les couloirs du labo me manque ! Ta bonne humeur et tes talents d'imitatrice ont rendu nos boîtes et nos fins de journée tellement plus cool !

Au service de Dermatologie du CHU,

Géraldine, merci pour ta bienveillance pendant mon semestre, et pour m'avoir aidé dans la réalisation de cette thèse. J'ai vraiment apprécié apprendre à tes côtés.

Docteur Collet, Jean-Charles, Justine, merci pour votre accueil.

Aux infirmières de consult, pour votre bonne humeur à presque toute épreuve...

Au service de dermatologie de Macon,

Vous m'avez tous accueilli avec beaucoup de gentillesse pour mon premier semestre.

Mr Mauduit, votre gentillesse et votre confiance m'ont beaucoup touchée et mon choix vers la dermatopathologie n'est pas étranger à mon passage dans votre service.

A tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail,

Benjamin, merci d'avoir été présent tout au long de ce travail, depuis les premières manip jusqu'à la dernière relecture. J'ai vraiment apprécié échanger avec toi sur ce sujet, et ton aide a été des plus précieuses !

Docteur D'ATHIS, Pour votre regard critique sur mes statistiques et surtout pour avoir pris le temps de m'expliquer comment interpréter mes résultats et me remettre sur le droit chemin.

A Damien, qui m'a épaulée dans mes nombreux tests d'immuno, aux filles de cyto qui ont coloré et monté mes lames, à Caroline et toute l'équipe de bio mol pour les techniques

A toute l'équipe du labo,

Pour vos sourires, votre dynamisme et cette bonne ambiance au travail qui rend nos journées en macro un peu plus agréables !

A mes parents,

Merci... Pour votre amour depuis toutes ces années et pour m'avoir toujours soutenue dans ces études longues, tantôt trop festives tantôt trop stressantes.

Merci... Pour être toujours là dans les bons et mauvais moments, pour m'épauler dans les situations difficiles, m'aider à faire les meilleurs choix possibles, et pour me chouchouter autant, même à distance.

A ma sœur et Charles

Minou, tu as toujours été un modèle pour moi professionnellement et personnellement. Tu m'as ouvert la voie (peut-être un peu trop bien...) pour que je puisse réussir au mieux dans la vie et dans ces études pour lesquelles tu as été un soutien indispensable.

Charles, t'avoir dans la famille est un plaisir. Merci pour avoir pris le temps de jouer les PU pour relire ma thèse !! Votre chonchon a vraiment de la chance de vous avoir !

Aux copains qui sont comme une famille,

Thierry et Martine, Tatie Chantale et Ded, Sylvie et Patrick, la famille Poncet, Loulou et Arlette. Merci d'avoir été là chacun à votre manière depuis toutes ces années. Que vous soyez là aujourd'hui représente beaucoup pour moi.

A mes co-internes d'anapath,

Aurél, Antho, Regis, Nadjla, Gilles, Nahina, Flo, Anne, Lisa, Ossama, Juliette, Pauline, Georges et les petits nouveaux Mathilde, Romain, Céline et Charles !

Parce que venir au labo tous les matins a toujours été un plaisir grâce à vous ! M

Aux filles de dermato,

Maud, pour m'avoir supportée pendant six mois avec une patiente exemplaire. Meryl, on n'a pas vraiment travaillé ensemble mais j'ai adoré partager ce stage avec toi !

A mes colloques chéries, ma petite famille Dijonnaise

Mel, pour notre complicité dès les premiers instants, et pour tout ce qu'on partage depuis 4 ans. Tu sais déjà à quel point tu es devenue importante pour moi, et je n'imagine pas que cela puisse changer...

Lulu... Merci d'être toujours là pour moi (même quand j'ai la tête), pour toutes nos soirées filles papotages, toutes les soirées guinchettes et les petits creux de 5h du mat !

*Vous avez été mes plus belles rencontres*

Clairette, pour tous ces fou-rires et ton attitude toujours positive, tu étais notre petit rayon de soleil. Pour nos godilles sur les pistes, les raclettes du soir, les montées à la frontale et toutes tes autres idées farfelues... Te voir devenir maman a été très émouvant, je suis vraiment heureuse pour vous trois !

Lolita, merci ma biche pour ta douceur, ta gentillesse. Tu as été une belle surprise, et j'ai adoré vivre ces quelques moi avec toi.

Aux copains de Macon (ou presque),

Charly, Antoine, Lucie, Thibaut, Billy. Merci Macon de m'avoir permis de vous rencontrer ! Pour tous les moments partagés, les week-ends skis, les soirées, les vacances, et pour tous les prochains à venir, j'espère vous avoir dans ma vie encore longtemps.

Et à tous les autres : Regis, Mélissa, Aulnay, Carole, Alizée, Camille, Chloé, Clément, Bastien...

Aux copains du labo (ou presque),

Céline, pour ton soutien, nos séances de TBC, tes coachings d'anglais, et tous ces petits moments qui rendent le quotidien tellement plus agréable, merci pour tout !

Thomas, tu as été une très belle rencontre, j'espère que nous continuerons quand même à partager pleins d'autres bons « moments » quand tu seras dans les îles !

*La vie au labo n'aurait pas été la même sans vous !*

Camille, ça a commencé par des PowerPoint d'hémato et ça finit par des éléphants jaunes et des soirées sushis sur le canapé le dimanche soir, merci d'être là en toutes circonstances !

Didier, merci d'avoir été là en cytogenet, pour prendre le café, jouer au tennis ou regarder Roland Garros !

Et Jéjé, Marion, Juliette, Antho

Enfin...

A mes amis de lycée et plus encore,

Inès, Claire, Jonathan, Thibaut, Mela, Mathias, Ben, Coralie, Quentin, malgré le temps et la distance, j'apprécie toujours autant les moments que l'on arrive à partager.

A mes acolytes de fac,

Helo et Tweet, mes bichôns, pour tous ces moments partagés, ces soirées, ces canôns mais aussi toutes ses heures à la BU... j'aurais vraiment aimé vous avoir à mes côtés aujourd'hui mais on se rattrapera à Paris !

## SERMENT D'HIPPOCRATE

*"Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.*

*Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.*

*Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.*

*J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.*

*Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.*

*J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.*

*Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.*

*Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.*

*Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.*

*Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.*

*Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.*

*Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.*

*J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.*

*Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque."*



# Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>18</b>
1) <i>Généralités et données épidémiologiques du mélanome .....</i>	18
2) <i>Prise en charge.....</i>	19
3) <i>Suivi thérapeutique .....</i>	22
4) <i>Biopsie liquide .....</i>	23
a. <i>Définition .....</i>	23
b. <i>ADN libre circulant .....</i>	24
c. <i>Cellules tumorales circulantes (CTC).....</i>	26
<b>Objectifs.....</b>	<b>30</b>
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>30</b>
1) <i>Sélection et suivi des patients.....</i>	30
2) <i>Isolement et caractérisation des CTC.....</i>	31
3) <i>Isolement de l'ADN circulant plasmatique et recherche de mutation BRAF .....</i>	32
4) <i>Analyses statistiques.....</i>	33
<b>Résultats .....</b>	<b>34</b>
1) <i>Patients inclus .....</i>	34
2) <i>Technique ScreenCell®.....</i>	35
3) <i>Profils évolutifs des patients .....</i>	43
<b>Discussion .....</b>	<b>47</b>
1) <i>Technique ScreenCell®.....</i>	47
2) <i>Comparaison CTC, [ADNlc] et réponse radiologique.....</i>	54
3) <i>Limites et perspectives.....</i>	58
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>59</b>

## ***Annexes***

<b>Annexe 1.</b> Stades du mélanome selon la dernière classification AJCC 2018	<b>67</b>
<b>Annexe 2.</b> Stratégies thérapeutiques de 1 <sup>ère</sup> et 2 <sup>ème</sup> ligne du mélanome avancé stade III inopérable et stade IV	<b>68</b>
<b>Annexe 3.</b> Tableau de comparaison du nombre de CTC par lame et du nombre de CTC par lame additionné au nombre de CTC sur les filtres correspondants	<b>69</b>
<b>Annexe 4.</b> Comparaison du compte de CTC sur lame versus sur lames + filtre pour chaque filtration, par rapport au seuil de positivité (5 CTC / filtration)	<b>71</b>
<b>Annexe 5.</b> Tableau de comparaison des moyennes de CTC par filtration et les erreurs types associées des deux observateurs, sur l'ensemble des points de suivi des cinq patients	<b>72</b>
<b>Annexe 6.</b> Tableau de comparaison des moyennes de CTC par filtration et les erreurs types associées des deux comptes d'un même observateur, sur l'ensemble des points de suivi des cinq patients	<b>73</b>
<b>Annexe 7.</b> Tableau récapitulatif de la revue de la littérature des 7 études s'étant intéressées à l'évolution de l'ADN tumoral circulant en fonction de la réponse tumorale sous immunothérapie	<b>74</b>

## *Table des tableaux et figures*

<b>Tableau 1.</b> Caractéristiques cliniques des patients inclus	<b>35</b>
<b>Figure 1.</b> Mécanismes d'action des thérapies ciblées anti-BRAF et anti-MEK	<b>20</b>
<b>Figure 2.</b> Mécanismes d'action des anti-CTLA4 et anti-PDL1	<b>21</b>
<b>Figure 3.</b> Aspect des cellules d'accompagnement sur filtres et lames	<b>37</b>
<b>Figure 4.</b> Aspect des CTC et UMC sur filtre et lame	<b>38</b>
<b>Figure 5.</b> Courbe de corrélation entre le compte des CTC sur lames et le compte des CTC sur lames additionné au compte de CTC sur filtres, par l'observateur 1	<b>39</b>
<b>Figure 6.</b> Cellules mimant des CTC sur lames du patient témoin	<b>39</b>
<b>Figure 7.</b> Technique d'ICC sur lames	<b>40</b>
<b>Figure 8.</b> Courbes de corrélation inter et intra observateurs	<b>41</b>
<b>Figure 9.</b> Courbes d'évolution des CTC dans le temps par patient selon les comptes des deux observateurs et des deux comptes du même observateur	<b>42</b>
<b>Figure 10.</b> Évolution dans le temps du compte de CTC, de la [ADN]lc et des lésions radiologiques par patient	<b>46</b>
<b>Figure 11.</b> Images de CAML et clusters sur lames	<b>47</b>
<b>Figure 12.</b> Illustrations des difficultés de lecture selon la qualité des lames	<b>50</b>

## *Liste des abréviations*

INCa	Institut National du Cancer
AJCC	American Joint Committee
LDH	Lactate Deshydrogénase
FDA	Food and Drug Administration
PFS	Progression-Free Survival (survie sans progression)
OS	Overall Survival (survie globale)
SFD	Société Française de dermatologie
TDM TAP	Scanner Thoraco-Abdomino-Pelvien
TEP-TDM scanner	Tomographie par Emission de Positrons au Fluoro-déoxy-glucose couplé au scanner
[ADNlc]	concentration d'ADN libre circulant
dPCR	digital Polymerase Chain Reaction
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
NGS	Séquençage Nouvelle Génération
[ADNtc]	concentration d'ADN tumoral circulant
CTC	Cellules Tumorales Circulantes
RT-PCR	Reverse Transcriptase and Polymerase Chain Reaction
CAML	Circulating cancer-Associated Macrophage-like Cell
FISH	Hybridation par Fluorescence In Situ
MGG	May-Grunwald-Giemsa
ICC	Immuncytochimie
UMC	Uncertain Malignancy Cell (cellule de malignité incertaine)
PS	Performans Statut
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

## ***Introduction***

### 1) Généralités et données épidémiologiques du mélanome

Le mélanome est un cancer agressif, qui se développe aux dépens des mélanocytes épidermiques ou plus rarement muqueux. Il représente 3,7% de l'ensemble des cancers et 1,2 % des décès par cancer et par an en France. Il survient chez des sujets adultes, avec un âge moyen au diagnostic de 58 ans chez l'homme et 56 ans chez la femme. Il se situe au 10<sup>e</sup> rang des décès par cancer chez l'homme et au 13<sup>e</sup> rang chez la femme. (1)

L'incidence du mélanome est en augmentation depuis 1980, avec cependant un ralentissement de cette croissance depuis 2005 (+ 2,9 % chez l'homme et + 1,7% chez la femme entre 2005 et 2012). Plus de 14300 nouveaux cas ont été estimés en 2015 dont 51 % survenant chez la femme. L'évolution de la mortalité est relativement semblable à celle de l'incidence, avec un ralentissement de la croissance depuis 2005. 1 773 décès de mélanome se sont produits en 2015 dont 58 % survenant chez l'homme (1). Les données projetées de l'Institut Nationale du Cancer (INCa) ont évalué à 15404 nouveaux cas et 1783 décès en 2017, avec une survie à 5ans de 91% tous stades confondus.

La classification TNM des mélanomes cutanés a été réactualisée en 2017 par l'American Joint Committee (AJCC) (Annexe 1) (2). Le stade des mélanomes repose sur des critères cliniques et morphologiques permettant de définir 4 stades de I à IV, divisés en sous-groupes, chacun corrélé à une survie différente. Les stades I et II correspondent à des mélanomes localisés dont l'épaisseur varie de moins de 0,8mm sans ulcération à plus de 4 mm avec ulcération, mais sans envahissement ganglionnaire ni viscéral. Les stades III A/B/C/D correspondent aux mélanomes de toute épaisseur avec un envahissement ganglionnaire, et les stades IV avec un envahissement viscéral à distance. L'AJCC a montré, avec cette mise à jour, une amélioration globale de la survie à 5ans. A un stade localisé, le pronostic est excellent avec une survie de 98% à 5 ans au stade I et 90% au stade II. A un stade avancé métastatique ganglionnaire, la survie à 5 ans est variable en fonction de la sous-catégorie : un stade IIIa a une survie moyenne à 5 ans de 93%, alors qu'un stade IIId seulement de 32%. Il n'y a pas de données de survie récentes concernant les stades IV (métastase viscérale). Une étude internationale est en cours pour obtenir de nouvelles données de survie à 5 ans, mais en 2008, elle oscillait entre 62% pour les patients M1a, 33% pour les

M1c, voire 18% à 2 ans pour un stade IIIc avec un taux de Lactate Déshydrogénase (LDH) élevé (3).

Le pronostic repose sur la détection précoce des lésions pigmentées suspectes, basée sur des critères cliniques : asymétrie, bordure irrégulière, polychromie, plus de 6mm de grand axe et évolutivité. Ces critères « ABCDE » cliniques présentent une bonne reproductibilité lorsqu'ils sont réalisés par un clinicien expérimenté (4). Malgré tout, leurs performances présentent certaines limites en termes de spécificité et de sensibilité. En effet, l'étude de Maley and Rhodes en 2015 a montré que 51,5% des lésions suspectes pigmentées analysées étaient de petite taille (inférieure à 6mm). Parmi ces lésions, 4,2% étaient des mélanomes *in situ* ou invasifs. Elle a également mis en lumière le fait qu'un des sous-types, particulièrement agressif, le mélanome nodulaire, ne répond pas aux critères puisqu'il est le plus souvent régulier, homogène, non pigmenté, symétrique, et au départ de petite taille (5). D'autres critères, tels que l'intensité pigmentaire très forte de tout ou une partie de la lésion et le caractère surélevé d'une lésion pigmentée, doivent donc également être pris en considération lors de l'examen clinique.

Le diagnostic de certitude est posé sur l'analyse histologique de la totalité de la lésion. Il repose sur un faisceau d'arguments architecturaux (asymétrie lésionnelle, absence de maturation des mélanocytes dermiques en profondeur, comblement du derme papillaire, envahissement de l'hypoderme) et cytologiques (atypies cyto-nucléaires épidermiques et dermiques, mitoses dermiques, surtout profondes et atypiques, ascensions pagétoïdes mélanocytaires épidermiques...). Le pathologiste évalue l'épaisseur de la lésion ou indice de Breslow, indispensable à la classification AJCC (2).

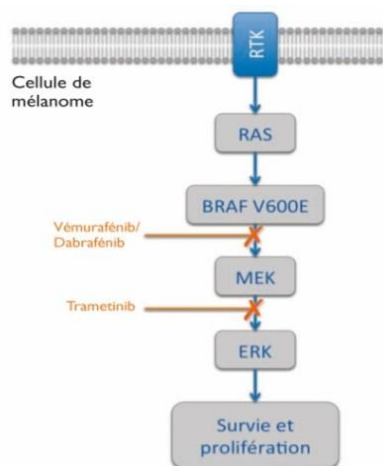
## 2) Prise en charge

Avant 2011, le traitement des mélanomes au stade IV reposait principalement sur des lignes successives de chimiothérapies sans preuve tangible de leur efficacité, comme le suggère les données de survie de l'époque avec une survie inférieure à un an en moyenne (6). La dacarbazine était la seule chimiothérapie approuvée par la Food and Drug Administration (FDA), avec une durée de réponse médiane de 5 à 6 mois. (7)

En 2002, des mutations somatiques ont été identifiées dans les cellules mélanocytaires malignes. Il s'agit principalement de mutations touchant le codon V600 du gène *BRAF*

(mutation V600E ou plus rarement V600K), retrouvées dans un peu plus de 40% des mélanomes (8). D'autres mutations affectant les gènes *NRAS* et *c-KIT* ont également été identifiées, à une fréquence plus faible. Le gène *BRAF* code pour une sérine-thréonine kinase impliquée dans la voie des MAP-kinases. Celle-ci est activée en aval de la protéine RAS mais en amont de la protéine MEK (figure 1). Les mutations du codon V600 entraînent un état activé de la protéine, ce qui engendre une activation constitutive de la voie et donc une survie et une prolifération accrues des cellules tumorales. Ces données ont permis de nouvelles perspectives thérapeutiques après la mise en évidence *in vitro* d'une prolifération tumorale freinée par un blocage de cette voie MAP-kinase.

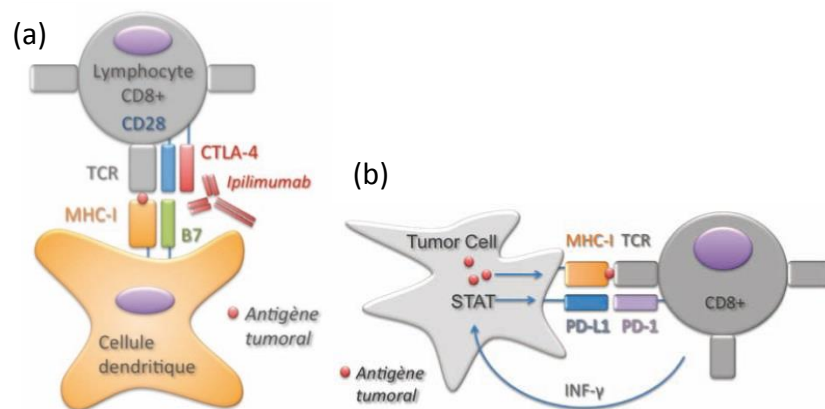
Suite à cette découverte *in vitro*, des thérapies ciblées contre les protéines Braf et Mek ont donc été mises au point et testées *in vivo*. Des premières études ont montré un gain de survie sans progression significatif (Progression-Free survival, PFS) et de survie globale (Overall Survival, OS) avec une thérapie ciblée anti-Braf (vemurafenib) versus chimiothérapie standard (dacarbazine). Dans les premiers résultats de l'étude BRIM-3 de Chapman *et al*, l'OS à 6 mois était de 84% dans le groupe vemurafenib versus 64% dans le groupe dacarbazine (9). Ils ont été confirmés par les données finales de l'étude sur les deux premières années de suivi, avec des OS à 30% versus 24% (10). Plus récemment, il a été prouvé l'intérêt d'ajouter une thérapie ciblée anti-Mek à une thérapie ciblée anti-Braf, avec une OS à 12 mois de 72% pour la combinaison trametinib + dabrafenib versus 65% pour la monothérapie par vemurafenib (11).



**Figure 1.** Mécanismes d'action des thérapies ciblées anti-BRAF et anti-MEK

Extrait de l'article « nouvelles armes thérapeutiques contre le mélanome de stade IV », publié en 2013 par E. Tzika et B. Moura

En 2010, une nouvelle approche thérapeutique basée sur l'immunothérapie s'est également développée dans de nombreux cancers. Il s'agit de molécules stimulant le système immunitaire en ciblant des antigènes des lymphocytes ou leurs récepteurs. En effet, afin d'avoir une réponse immunitaire au niveau cellulaire, deux signaux doivent être activés entre les lymphocytes T via le TCR et CD28 et la cellule présentatrice d'antigène via le CMH et complexe B7. Des mécanismes d'action permettent de réguler la réponse immunitaire notamment via les cellules tumorales. Par exemple, le récepteur CTLA4 des cellules malignes peut se lier au complexe B7 à la place du CD28, empêchant ainsi le signal de déclencher une réponse immunitaire anti-tumorale (figure 2). Les thérapies anti-CTLA4 permettent ainsi de lever le frein de la réponse immunitaire. Les traitements anti-PD-L1 et anti-PD1 fonctionnent également sur ce même principe. Le récepteur PD1 est un inhibiteur de l'activation présent à la surface des lymphocytes T et peut interagir directement avec le ligand PD-L1 des cellules tumorales. Cette interaction empêche alors la cytotoxicité de la cellule T pour la tumeur (figure 2). Les immunothérapies anti-PD-L1 se fixent de manière compétitive à la place du PD1 des lymphocytes sur les ligands des cellules tumorales, permettant une réaction immunitaire des lymphocytes T.



**Figure 2.** Mécanismes d'action des anti-CTLA4 (a) et anti-PDL1 (b)

Extrait de l'article « nouvelles armes thérapeutiques contre le mélanome de stade IV », publié en 2013 par E. Tzika et B. Moura

En 2010, les premières études testant l'ipilimumab, un anti-CTLA4, dans le mélanome ont démontré une nette amélioration de l'OS et la PFS des patients métastatiques, *BRAF* muté ou non, traités par ipilimumab *versus* chimiothérapie (12). L'OS à 1 an était de 47,3% dans le groupe ipilimumab + chimiothérapie *versus* 36,3% dans le groupe chimiothérapie seule. Les études avec les anti-PDL1 avaient des résultats similaires, avec une médiane de survie de 16mois pour le groupe nivolumab *versus* 14 mois pour le groupe chimiothérapie (13).



Ces traitements ont donc permis une amélioration du pronostic pour les mélanomes stade IV, avec une OS à 3 ans de 44 % sous combinaison de thérapies ciblées (14) et 58% sous combinaison ipilimumab et nivolumab (15).

En 2017, la société française de dermatologie (SFD) a mis à jour ses recommandations relatives aux stratégies thérapeutiques du mélanome cutané métastatique (16). Avant toute décision de traitement adjuvant, il est indispensable de rechercher la mutation de BRAF V600 par génotypage des échantillons tumoraux analysés selon le programme d'assurance qualité des 28 plateformes de génétique moléculaire agréées. L'INCa a publié en septembre 2018 une fiche de bon usage du médicament récapitulant l'ensemble des stratégies thérapeutiques en fonction du statut mutationnel et des localisations des métastases (annexe 2). Les thérapies ciblées et l'immunothérapie sont désormais prescrites en première ligne pour le traitement des patients métastatiques.

La découverte de ces nouvelles thérapeutiques est associée à une révolution dans la prise en charge des mélanomes stade III, c'est-à-dire avec métastases ganglionnaires. Avant 2017, ces patients recevaient un traitement adjuvant par interféron alpha qui n'avait pas montré de gain en terme d'OS *versus* surveillance simple, mais seulement en terme de survie sans progression (17). Deux études, parues dans le New England Journal of Medicine en 2017, se sont intéressées aux bénéfices du traitement adjuvant des mélanomes stade III par les thérapies ciblées et immunothérapies. L'étude de Long *et al.* a comparé 870 patients stade III opérés et mutés *BRAF*. Ils ont reçu pendant un an soit une combinaison dabrafenib plus trametinib soit un placebo. Les taux de survie à 3 ans étaient de 86% dans le groupe traité et 77% dans le groupe placebo (18). L'étude de Weber *et al.* comparait nivolumab *versus* ipilimumab chez 906 patients dont 80% avec un mélanome stade IIIB/C opéré, avec ou sans mutation du gène *BRAF*. Le taux de survie sans récurrence était plus élevé avec le nivolumab, 70,5%, versus 60,8% avec l'ipilimumab (19). Ces deux études ont ainsi montré qu'il était possible d'améliorer la survie des mélanomes stade III, opérables ou non, avec un traitement adjuvant au même titre que les mélanomes métastatiques stade IV.

### 3) Suivi thérapeutique

Le bilan d'extension initial et le suivi dépendent du stade de l'AJCC, 8<sup>e</sup> édition (2). La SFD a actualisé en 2016 ses recommandations pour la prise en charge des mélanomes de stades III (20). Ils bénéficient d'un examen clinique tous les trois mois pendant 3 ans puis

deux fois par an pendant 2 ans, puis une fois par an à vie. Ce suivi clinique est à adapter en cas de traitement adjuvant.

Sur le plan radiologique, une échographie locorégionale de la zone de drainage ganglionnaire est recommandée tous les 3 à 6 mois pendant 3 ans. Un scanner thoraco-abdomino-pelvien (TDM TAP) ou une tomographie par émission de positrons au Fluoro-déoxy-glucose couplé au scanner (TEP-TDM) peuvent être réalisés tous les 6 mois pendant 3 ans.

Pour les stades IV, les dernières recommandations de l'INCa datent de 2017 (16). La fréquence du suivi clinique et radiologique est adaptée par le clinicien en fonction de l'état du patient, et du traitement en cours, avec au minimum le même suivi que les stades IIIc.

Sur le plan biologique, deux marqueurs ont une valeur pronostique, le taux de LDH plasmatique et la concentration sérique de la protéine S100, dans les stades IV. Mais la SFD, après analyse des dernières études, ne recommande pas le dosage de ces marqueurs dans le suivi des patients stades I à III (20). Pour les stades IV, un taux élevé de LDH au diagnostic est associé significativement à une moins bonne réponse aux thérapeutiques, à une diminution de l'OS et PFS, que ce soit sous immunothérapies ou thérapies ciblées (21). L'étude de Abusaif *et al.* en 2013 a montré une corrélation entre la réponse radiologique initiale et la diminution du taux de LDH, s'il était élevé au diagnostic (22). En pratique courante, la LDH est dosée dans le suivi des patients stades IV afin de détecter une éventuelle progression tumorale par une élévation importante du taux plasmatique. Mais elle ne peut pas être une alternative aux examens radiologiques.

C'est dans ce contexte qu'ont été développés de nouveaux paramètres biologiques et / ou biomarqueurs, détectés à partir d'une simple prise de sang, dans la prise en charge du mélanome métastatique.

#### 4) Biopsie liquide

##### a. Définition

Selon l'INCa, la biopsie liquide est un « test effectué sur un échantillon de sang pour la recherche de cellules cancéreuses ou de fragments d'ADN provenant d'une tumeur et circulant dans le sang ». Elle ne s'applique que dans le cadre de l'oncologie, et n'est pas

limitée au sang. Les études sur la biopsie liquide se sont multipliées au cours des dix dernières années, générant un intérêt croissant en oncologie pour ce matériel tumoral viable et facilement accessible.

#### *b. ADN libre circulant*

### Historique

En 1948, Mandel et Metais ont mis en évidence la présence de faible quantité ( $< 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) d'ADN libre circulant ([ADNlc]) dans le sang, à la fois chez des patients sains et malades (23).

Pendant de nombreuses années, des travaux divers ont été réalisés mais il faudra attendre 1977 pour que l'article de Leon *et al.* démontre que la [ADNlc] est plus élevée chez les patients avec un cancer que chez les sujets sains et que plus le cancer est à un stade évolué, plus la [ADNlc] est élevée (24).

Nous savons depuis les années 2000, grâce notamment aux travaux de Giacona *et al.* (25) que l'apoptose et la nécrose cellulaire jouent un rôle important dans la quantité d'ADN libre circulant. L'apoptose physiologique des cellules des tissus normaux ou la destruction d'un foyer inflammatoire explique la présence d'ADN chez les sujets sains. Les tumeurs malignes sont souvent le siège d'abondants remaniements nécrotiques et ont un index mitotique élevé pour assurer la prolifération des cellules tumorales, libérant ainsi des quantités élevées d'ADN.

En parallèle des travaux effectués sur les patients atteints de cancer, d'autres études ont démontré un intérêt de la [ADNlc] dans d'autres pathologies non tumorales. Lo *et al.* en 1997 découvraient la présence d'ADN fœtal circulant chez la mère (26).

La [ADNlc] peut également être augmentée dans de nombreuses situations non carcinomateuses, comme en cas de grossesse, sepsis (27), de pathologies inflammatoires systémiques (exemple du lupus systémique) ou plus localisées (par exemple dans les infections chroniques respiratoires), d'infarctus du myocarde, d'atteinte musculaire ou même secondairement à un traumatisme cérébral (28).

Dans les années 1990, l'avènement des nouvelles technologies de biologie moléculaire, avec la découverte d'altérations génétiques somatiques, a permis de déterminer

de façon plus fiable l'origine néoplasique de l'élévation de la [ADNlc]. Les travaux de Tada *et al.* en 1993 (29), de Nawroz *et al.* en 1996 (30) ont permis la détection d'un ADN tumoral circulant ([ADNtc]) grâce à des mutations comme celle du gène RS dans les cancers pancréatiques, non retrouvées chez les sujets sains. Lecomte *et al.* ont corroboré ces premiers résultats dans les cancers colo-rectaux (31).

## Techniques

Actuellement, la quantification d'ADNlc se fait principalement par PCR (Polymerase Chain Reaction) digitale (dPCR). Cette méthode permet la détection et la quantification de variants génétiques rares et en faible quantité, avec une excellente sensibilité (jusqu'à 0,01%). Elle est basée sur le fractionnement des échantillons d'ADN en dizaine de milliers (20000 en moyenne) de micro-compartiments (par émulsion eau-huile ou systèmes de micro-fluidique), au sein desquels se trouve ou non un fragment d'ADN seul. Puis les fragments d'ADN présents dans chaque micro-compartiment individuel sont amplifiés par PCR. Un système de sondes fluorescentes ou d'intercalant de l'ADN est utilisé pour visualiser les micro-compartiments dans lesquels sont présents les variants recherchés. Cette méthode se rapproche d'une quantification absolue. En s'appuyant sur la loi statistique de Poisson, le nombre de copies d'ADN mutées par microlitre de l'échantillon analysé peut être calculé. Cette technique présente de nombreux avantages par rapport à une technique classique de PCR quantitative ou en temps réel (qPCR). Elle permet une quantification absolue en nombre de copie par  $\mu\text{l}$ , sans courbe standard à établir, elle est plus sensible et plus précise. Cependant, comme les techniques de qPCR, elle ne détecte seulement que les mutations déjà connues.

Pour pallier à cette limite, le séquençage nouvelle génération (NGS) ou séquençage haut débit, apparu en 2005, permet de séquencer tout ou une partie de l'ADN ou de l'ARN, de façon précise et rapide. De nouvelles stratégies d'analyses du génome ont ainsi été mises en place. Soit l'analyse d'un panel de gènes connus, soit l'analyse d'exome (ensemble du génome codant) ou du génome dans son intégralité à la recherche de nouvelles mutations. Ces nouvelles technologies ont un coût élevé et la PCR digitale (dPCR) reste encore largement utilisée en routine dans les laboratoires de pathologie moléculaire, et l'analyse d'exome réservée aux cas par cas.

La recherche de mutations au sein de l'ADNlc dans le mélanome au stade métastatique est devenue systématique dans la prise en charge des patients, car elle présente un impact thérapeutique majeur. La présence d'une mutation du codon V600 du gène *BRAF* change radicalement la prise en charge thérapeutique des patients.

Les techniques actuelles permettent de quantifier plus spécifiquement la part d'allèles mutés, appelée [ADNtc], grâce à la présence de mutations des gènes *BRAF*, *NRAS* et *KIT*. Ainsi, il est possible de suivre l'évolution de la charge tumorale en fonction de la décroissance de la population mutée, en parallèle de la [ADNlc] totale. Si la population mutée diminue mais que la [ADNlc] augmente, la présence d'un clone tumoral non porteur de la mutation recherchée doit être identifié par d'autres analyses.

De nombreux travaux ont corroboré ces hypothèses, comme l'étude de Chang *et al.* en 2016 (32) ou l'étude de Gray *et al.* en 2015 (33) qui montrent qu'une [ADNtc] basse avant la première ligne de traitement chez des patients mutés *BRAF* et *NRAS* est liée à une meilleure réponse aux thérapies ciblées. Ils montrent également une diminution significative de la [ADNtc] chez les patients traités par thérapies ciblées en accord avec la réponse thérapeutique. Chez les patients ne répondant pas aux thérapies anti-Braf, une mutation de *NRAS* était retrouvée dans l'ADN tumoral circulant, connue pour conférer une résistance au traitement. Keller *et al.* en 2019 ont également démontré l'intérêt de cette [ADNtc] dans l'évaluation de la réponse thérapeutique chez des patients mutés *BRAF* et *NRAS* et traités par immunothérapie (34).

Pour résumer, la [ADNlc], si elle est liée à une mutation spécifique d'un cancer, comme la mutation *BRAF* V600E dans le mélanome, peut être un biomarqueur très utile dans le suivi des patients, pour prédire et évaluer leur réponse thérapeutique. Cependant, elle reste peu spécifique chez des patients au phénotype sauvage, puisqu'il est impossible de faire la part des choses de manière robuste entre une origine néoplasique et inflammatoire.

### c. Cellules tumorales circulantes (CTC)

En parallèle a été développée dans le suivi de cancers solides, la recherche de cellules tumorales circulantes qui correspondent à des cellules vivantes, issues d'un cancer primitif ou d'une métastase, quelle que soit sa lignée de différenciation, et qui se retrouvent dans la

circulation sanguine. En effet, dès le stade invasif les cellules tumorales primitives franchissent la barrière épithélio-mésenchymateuse et peuvent ainsi traverser la paroi des capillaires ou autres vaisseaux de plus gros calibre, pour ensuite circuler, mêlées aux autres éléments hématologiques.

Elles présentent des caractéristiques cytologiques particulières, mais des données phénotypiques et moléculaires identiques à la tumeur initiale ou à la métastase d'origine. Elles donnent donc accès à un matériel cellulaire tumoral intact et de façon peu invasive, par une simple prise de sang veineux périphérique.

## Historique

Les CTC ont été décrites pour la première fois en 1869, par Ashworth, qui avait trouvé dans le sang d'un patient décédé d'un cancer des cellules circulantes semblables à celles de la tumeur (35).

La découverte de CTC ne signe pas le diagnostic de cancer. En effet, la présence d'un petit nombre d'éléments atypiques dans la circulation périphérique est possible chez le sujet sain, et a fortiori chez un patient porteur de dysplasie (36). De rares cellules naeviques bénignes peuvent également être retrouvées dans la circulation veineuse périphérique (37).

De même, toutes les CTC ne vont pas avoir le même potentiel d'agressivité en terme notamment de pronostic. En effet, certaines d'entre elles vont entrer en apoptose une fois dans la circulation et donc ne jouer aucun rôle dans le développement de métastases à distance. Certaines études ont identifié des cellules dites « dormantes » (38) et d'autres plus agressives (39) qu'il n'est pas possible de différencier sur le plan morphologique. Les CTC dites dormantes n'auraient pas un rôle métastatique agressif à court terme, et pourraient rester dans la circulation périphérique et la moelle osseuse pendant un temps plus ou moins long. Elles garderaient malgré tout un potentiel agressif à plus long terme, de façon imprévisible.

Nous savons que les CTC sont présentes en quantité plus élevée chez les sujets atteints de cancer, de façon croissante avec le stade de la maladie. L'étude de Mellado *et al.*, menée en 1996, retrouvait des CTC chez 36% des patients avec un mélanome stades I et II, 45% chez les stades III et 94% chez les stades métastatiques IV. En analyse multivariée, avoir des CTC à un stade non-métastatique II ou III serait un facteur pronostic indépendant de récurrence (40).

Depuis, de nombreuses études comme celles de De Bono *et al.* en 2008 dans le cancer de la prostate (41), de Hofman *et al.* en 2015 dans le cancer bronchique non à petites cellules (42) et de Li *et al.* en 2018 dans le mélanome (43), ont toutes montré qu'un nombre élevé de CTC au diagnostic, avant la chirurgie ou un autre traitement, était un facteur indépendant de mauvais pronostic, associé à une diminution de l'OS et la PFS, ainsi qu'un risque de récurrence plus élevé.

En dépit des nombreux travaux réalisés sur les variations du nombre de CTC (44), il n'y a pas encore eu d'études assez robustes ayant démontré que cette variation reflète la réponse thérapeutique. L'équipe de Fei *et al.* a publié en 2014 une méta-analyse dans les cancers du sein à un stade localement avancé, traités par chimiothérapie néo-adjuvante, qui n'a pas mis en évidence de corrélation entre la variation du nombre de CTC et la réponse au traitement (45).

En résumé, malgré l'absence de lien démontrée entre la présence de CTC, la réponse thérapeutique et l'évolution de la masse tumorale, la détection de CTC reste un facteur pronostic indépendant en termes d'OS et PFS. C'est pourquoi depuis plusieurs années, de nombreuses techniques ont été développées pour la détection des CTC, sans pour autant être standardisées et évaluées pour une utilisation de routine.

## Techniques

La première technique ayant permis la détection de CTC chez des patients métastatiques était la « reverse transcriptase and polymerase chain reaction » (RT-PCR), avec l'étude de Smith *et al.* en 1991 dans le mélanome (46). L'ARN messager circulant est transformé en ADN complémentaire grâce à la technique de reverse transcriptase, puis la polymerase chain reaction permet d'amplifier un gène seulement transcrit par des tissus précis, comme par exemple le gène de la tyrosinase, un gène spécifique tissulaire des mélanocytes. Il s'agit d'une technique indirecte qui permet de déduire que le transcrit détecté provient de CTC. Mais il faut l'interpréter avec prudence, car il peut également s'agir d'exosomes.

La technique CellSearch® est une technique plus récente, dont la première utilisation dans l'étude de Allard *et al.* date de 2004 (36). Elle est développée à partir des propriétés immunologiques cellulaires. Elle se base sur le principe qu'il n'y a pas de cellules de nature épithéliale dans la circulation sanguine chez un patient indemne de pathologie

carcinomateuse. Les cellules exprimant les molécules d'adhésion cellulaire épithéliales sont enrichies immuno-magnétiquement, puis reconnues avec des anticorps monoclonaux soit spécifique des lymphocytes (CD45-Allophycocyan), soit des cellules épithéliales carcinomateuses (cytokératines 8/18/19). Grâce à un système semi-automatisé, une reconstruction d'image permet d'identifier la présence anormale de cellules épithéliales dans la circulation périphérique. Vingt-huit études prospectives et indépendantes incluant plus de 4700 patients ont validé les performances cliniques de cette technique pour prédire la survie sans progression et la survie globale avant et après l'initiation du traitement adjuvant. Actuellement, il s'agit du seul système de détection des CTC approuvé par la FDA et qui peut être utilisé en routine dans les cancers métastatiques du sein (47), colo-rectaux (48) et de prostate (49) en tant que facteur pronostique de survie.

Deux nouvelles techniques apparues en 2010 se basent sur l'examen cytologique des cellules circulantes. La première, technique ISET® (Isolement par taille des cellules tumorales) se fait à partir d'une simple prise de sang veineux, qui est ensuite traité par un appareil spécifique qui filtre de manière verticale le sang afin d'isoler les très rares CTC.

La seconde, technique ScreenCell®, est également réalisée à partir d'une simple prise de sang veineuse et se divise en deux techniques distinctes et complémentaires. Le module ScreenCell®cyto sélectionne les cellules par leur taille. En effet, la taille des CTC étant supérieure à la taille des cellules sanguines, il est possible de les retenir sur un support percé de micropores qui laisseront passer seulement les cellules sanguines. Elle permet une analyse cytologique des cellules circulantes après fixation, quelle que soit la lignée de différenciation. Elle peut se faire directement sur le support de filtration (filtre) ou après réalisation d'un cytopspin pour une lecture sur lame, comme en cytologie de routine. Cette technique permet aussi l'analyse des cellules circulantes d'accompagnement, comme les macrophages géants circulants (CAML : Circulating cancer-Associated Macrophage-like Cell) ou la population lymphocytaire de voisinage. Les cellules obtenues peuvent bénéficier de toutes les techniques déjà utilisées sur des cytologies de routine, comme l'immunocytochimie, ou l'hybridation par fluorescence in situ (FISH). Les modules ScreenCell®BM et ScreenCell®CC ont le même principe de sélection des cellules, puis l'ADN ou l'ARN peuvent être extraits des cellules vivantes, et servir pour différentes techniques de biologie moléculaire, telle que la recherche de mutations, le séquençage d'exome et autres. La culture cellulaire est également possible.



L'intérêt thérapeutique de la détection des CTC par ces différentes techniques dans le suivi des patients reste actuellement inconnu. Du fait de son investissement technique réduit, avec une mise en place facilitée, et des critères cytologiques proches de ceux utilisés en cytologie de routine, la technique ScreenCell® nous a semblé être la plus adaptée pour une utilisation de routine dans un service de pathologie.

## ***Objectifs***

Notre étude a pour but d'évaluer la faisabilité d'implémenter la technique ScreenCell® dans un laboratoire de pathologie en routine, puis de déterminer si la variation du nombre de CTC est corrélée à la réponse thérapeutique, au même titre que la [ADNlc].

## ***Matériel et méthodes***

### 1) Sélection et suivi des patients

Cinq patients atteints d'un mélanome métastatique de stade IV ont été inclus dans cette étude. Les seuls critères d'exclusion étaient la prise d'une première ligne de traitement par anti-BRAF, anti-MEK ou immunothérapie avant la date d'inclusion et la présence de métastases cérébrales.

Ces patients ont bénéficié d'un suivi clinique standard par les dermatologues avec notamment la recherche de récurrence locale, de métastase cutanée en transit ou à distance, d'adénomégalie suspecte.

L'analyse radiologique était faite à partir du suivi systématique recommandé par le clinicien, soit au minimum un scanner thoraco-abdomino-pelvien complété éventuellement par une IRM cérébrale et/ou un pet-scanner tous les 3 mois. La fréquence de l'imagerie était laissée à l'appréciation du dermatologue, conformément aux recommandations de l'HAS. Les imageries étaient interprétées par un radiologue expérimenté. A partir du compte-rendu, nous avons défini la réponse radiologique en nous basant sur les critères OMS (Organisation Mondiale de la Santé) de la réponse tumorale au traitement (50). Nous avons établi 4 types de résultats, définis à partir de l'examen radiologique précédent : réponse complète (RC), c'est-

à-dire disparition de toutes les lésions connues, réponse partielle (RP) si diminution de moins de 50% du produit des plus grandes longueurs des lésions et pas d'apparition d'une nouvelle lésion ni augmentation d'une lésion de plus de 25%, maladie progressive (MP) si progression de plus de 25% d'une lésion ou apparition d'une nouvelle lésion, et maladie stable (MS) si stabilité de l'ensemble des lésions, absence de nouvelle lésion, progression ou diminution inférieure à 25% des lésions existantes.

En parallèle, ils ont bénéficié tous les trois mois pendant un an d'une biopsie liquide.

## 2) Isolement et caractérisation des CTC

Le recueil des CTC a été réalisé selon le protocole du laboratoire ScreenCell® à partir de 9 mL de sang veineux périphérique, recueillis dans un tube de prélèvement Transfix®, contenant un liquide préservant les cellules de la lyse. Sur ces 9mL de sang, 3 filtrations de 3mL de sang étaient réalisées. Pour ce faire, 3 mL de sang étaient mélangés à 4 mL d'un tampon de dilution (PBT-FC buffer) et mis à incuber 15 minutes à température ambiante. Puis ce mélange était filtré à travers le système d'isolation à usage unique (par aspiration). A la fin de la filtration, 1,6 mL de tampon phosphate salin (PBS) étaient ajoutés pour enlever les débris du filtre puis 700 µL de tampon de chargement (Loading buffer : PBS 1X + 6% BSA (Bovine Serum Albumine + 5 mM EDTA) afin d'éviter la déshydratation et l'adhésion des cellules au filtre. Ce dernier était ensuite retiré du module et placé dans un système de CytoSpin afin de transférer les cellules sur lames par centrifugation. Les lames étaient ensuite colorées au May-Grunwald-Giemsa (MGG).

Au total, pour chaque prélèvement de sang, 3 lames et 3 filtres correspondant étaient obtenus. Les lames ont été analysées par deux observateurs ayant bénéficié de la même formation avant l'étude, puis un des observateurs réalisait une seconde lecture à plus d'un mois d'intervalle. Le compte de CTC a également été réalisé sur les filtres par un observateur.

Une étude immunocytochimique (ICC) a été réalisée sur automate Omnis (Agilent/Dako) pour chaque patient avec les anticorps anti-melanA (clone A103), anti-S100 (clone 4c4-9), anti-melanosome (cloneHMB45). Les lames, précédemment sélectionnées, ont préalablement été démontées, décolorées à l'aide d'un tampon à base saline et passées dans une solution de démasquage à 95°C. Elles ont été ensuite été immunomarquées sur l'automate. Elles ont été comparées avec le profil d'expression tissulaire initial par les pathologistes.

La technique ScreenCell® a également été réalisée sur un témoin négatif. Les critères d'inclusion pour ce témoin étaient l'absence d'antécédents néoplasiques (personnels ou familiaux) ou de pathologies inflammatoires chroniques connues, avec un état général conservé et l'absence de pathologie aiguë au moment de la prise de sang.

L'analyse des lames et filtres reposait sur des critères cytologiques cytoplasmiques et nucléaires précis, testés et recommandés par le laboratoire. Les critères de malignité d'une cellule étaient : sur cellule entière, un noyau supérieur ou égal à 20 µm avec un rapport nucléo-cytoplasmique supérieur ou égal à 0,75, une membrane nucléaire irrégulière, un noyau dense, hyperchromatique, mais pas totalement opaque. Les noyaux nus et pycnotiques n'étaient donc pas comptabilisés. Si l'un des 5 critères de malignité manquait ou ne pouvait pas être apprécié, la cellule était classée en « cellule de malignité incertaine » (UMC : Uncertain Malignancy Cell). Les macrophages géants circulants ne différaient des CTC que par leur rapport nucléo-cytoplasmique plus bas et donc un abondant cytoplasme d'aspect filamenteux. Les amas de 2 à 10 cellules étaient catégorisés en « clusters de CTC » selon un critère majeur : l'anisocaryose. Sinon ils étaient classés en amas de lymphocytes activés.

Nous avons également évalué la qualité des lames et l'impact sur l'analyse des CTC. Un pathologiste, non formé à la lecture des lames de CTC mais avec des connaissances en cytologie de routine, a classé chaque lame en qualité « correcte » ou « non satisfaisante ». Les deux critères, basés sur les cellules de fond et non sur les CTC, étaient : la reconnaissance de la morphologie cellulaire permettant de classer les leucocytes en polynucléaires neutrophiles, éosinophiles ou en lymphocytes, et la distinction entre leur noyau et leur cytoplasme de façon évidente.

D'après les données de la littérature, nous avons fixé un seuil de positivité des CTC à 5 cellules par filtration (51)(52) . Nous n'avons pas retrouvé de données dans la littérature permettant de déterminer la significativité d'une variation entre deux points de suivi.

### 3) Isolement de l'ADN circulant plasmatique et recherche de mutation *BRAF*

Le protocole utilisé dans notre laboratoire respecte les recommandations pour la prise en charge des biopsies liquides.

Pour chaque prélèvement de sang veineux périphérique réalisé pour l'isolement d'ADNlc, le sang a été recueilli dans 4 tubes K2-EDTA. Dans un maximum de 4 heures après le prélèvement, le plasma était isolé par centrifugation à 1600g pendant 10 minutes à 6°C. Puis

les plasmas étaient congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . La veille de l'extraction d'ADN, les plasmas étaient placés à  $-20^{\circ}\text{C}$  toute la nuit puis à température pendant 1 heure afin de permettre une décongélation douce. Les plasmas étaient ensuite centrifugés à 16 000 g pendant 10 minutes et 4 mL du surnageant plasmatique étaient utilisés pour l'extraction. Les plasmas étaient par la suite extraits en utilisant le kit QIA Symphony circDNA (Qiagen) en suivant les recommandations du protocole du fabricant. Les [ADNlc] étaient mesurées par méthode spectrofluorimétrique spécifique de l'ADN double brin (Qubit ds DNA High Sensitivity, Life Technologies) et également qualifiées pour évaluer la taille des fragments d'ADN par l'instrument TapeStation 4200 (kit DNA 1000 High Sensivity, Agilent). La recherche des mutations V600E et V600K du gène *BRAF* a été réalisée par PCR digitale (utilisation de sondes taqman) en utilisant le système Naica de la société Stilla Technologies. La détection des mutations a été réalisée en utilisant deux sondes d'hydrolyse fluorescentes (marquage HEX à l'extrémité 5' de la sonde spécifique de la mutation V600K et marquage Cy5 à l'extrémité 5' de la sonde spécifique de la mutation V600E) spécifiques de celles-ci, ainsi qu'une sonde d'hydrolyse fluorescente spécifique de la séquence sauvage du gène *BRAF* (marquage 6-FAM) (53).

Pour la [ADNlc], le seuil de positivité a été fixé à 10 ng/mL de plasma de manière arbitraire mais en se basant sur les valeurs observées en routine au sein de notre CHU pour les patients stables. Nous avons également fixé cette valeur de 10 ng/mL comme limite pour identifier une variation significative de [ADNlc].

#### 4) Analyses statistiques

Nous avons établi la moyenne du nombre de CTC et d'UMC sur lames par filtration pour chaque patient par point de suivi, de même que la moyenne de CTC sur filtre par patients par point de suivi. Afin de vérifier la reproductibilité intra et inter observateur, nous avons calculé l'erreur type sur les différences entre les moyennes de CTC des observateurs, puis nous l'avons rapportée à la moyenne des valeurs afin d'obtenir un coefficient de variation. Nous avons présenté nos résultats sous forme du coefficient maximal. Nous avons fait de même pour établir la corrélation entre le compte de CTC sur lames seules et le compte de CTC sur lames ajoutées aux CTC sur filtres, cette dernière étant considérée comme la technique de référence.

En plus, nous avons fait une régression linéaire dans chacun des cas précédents qui a donné les coefficients d'une droite que nous avons ainsi pu tracer.

Un test de Student a été appliqué aux coefficients de régression obtenus afin de savoir si la pente de la droite différait de 1, et si l'ordonnée à l'origine différait de 0.

Un test exact de Fisher a été appliqué pour évaluer la corrélation entre la qualité des lames et la présence de CTC, ainsi qu'entre la qualité des lames et le nombre de CTC (moyenne sur 3 filtrations).

Nous avons établi les courbes d'évolution dans le temps de la moyenne de CTC/filtration de l'observateur 1 et de la quantité d'ADNlc en  $\eta\text{g/mL}$  de plasma en comparaison avec l'évolution des lésions radiologiques. Pour cela, nous avons adopté la convention suivante : les résultats du score radiologique étaient représentés par une flèche positionnée à la date de réalisation de l'examen. Une régression partielle (RP) était représentée par une flèche oblique descendante, une régression complète (RC) par une flèche verticale descendante, une maladie progressive (MP) par une flèche oblique ascendante et une maladie stable (MS) par une flèche horizontale. L'examen initial était représenté par un point positionné à la date de réalisation et à 50% de l'axe vertical principal. Concernant les courbes de CTC, nous avons ajouté à la moyenne de CTC / filtration, la moyenne de CTC/clusters sur les trois filtrations, afin d'établir le compte global de CTC.

## ***Résultats***

### 1) Patients inclus

Cinq patients ont été inclus d'octobre 2017 à juin 2018. Il s'agissait principalement de femmes (4/5, tableau 1). Trois d'entre eux avaient plus de 65 ans à l'inclusion. Un seul présentait des métastases synchrones au diagnostic, tandis que les quatre autres avaient des métastases métachrones, c'est-à-dire à distance. Pour l'un des patients, la tumeur primitive n'a pas été retrouvée. Les localisations des métastases étaient variées, ganglionnaires, pulmonaires et cutanées (60%), hépatiques et cérébrales (40%), et splénique dans un cas. Un seul patient présentait une mutation *BRAF* V600E au niveau de sa tumeur et a reçu un traitement par thérapie ciblée (Tafinlar et Mekinist). Les autres patients ont eu une immunothérapie, soit par nivolumab soit par pembrolizumab. (Tableau 1)

Le patient témoin était une femme de 27 ans sans antécédent néoplasique ou pathologie inflammatoire chronique et sans épisode inflammatoire aiguë à l'inclusion.

Nous avons eu très peu de données manquantes : un seul des patients est décédé entre son suivi à 9 mois et 12 mois ; pour certains prélèvements en vue de l'isolement de CTC, la quantité de sang veineux prélevée était insuffisante pour réaliser les 3 filtrations de 3 ml, mais au moins deux filtrations par point de suivi ont toujours pu être réalisées pour l'ensemble des patients. Il n'y a pas eu de patients perdus de vue, ni de manque de données radiologiques et moléculaires.

<b>Caractéristiques</b>	<b>n</b>
<b>Sexe</b>	
Homme	1
Femme	4
<b>Age</b>	
< 65 ans	2
> 65ans	3
<b>Stade IV au diagnostic</b>	1
<b>Mutation BRAF V600E/V600K</b>	1
<b>Traitement adjuvant antérieur</b>	
Oui	2
Non	3
<b>Type de mélanome</b>	
SSM	1
Nodulaire	2
Desmoplastique	1
Absence de primitif	1
<b>Localisation des métastases</b>	
Ganglionnaires	3
Cutanées	3
Hépatiques	2
Pulmonaires	3
Cérébrales	2
Spléniques	1
Surréaliennes	1
<b>Expression tissulaire des marqueurs IHC</b>	
MelanA	4
HMB45	4
PS100	5
<b>Traitement mis en place à l'inclusion</b>	
Tafinlar + Mekinist	1
Nivolumab	3
Pembrolizumab	1

**Tableau 1.** Caractéristiques cliniques des patients inclus  
*n* : nombre de patients

## 2) Technique ScreenCell®

La technique a été réalisée d'octobre 2017 à juin 2019 par la même personne. La durée du temps technique variait de 1h15 à 1h30 ; les lames étaient ensuite colorées au MGG puis montées au pertex (Sakura®). La première lecture pouvait être réalisée le jour même du

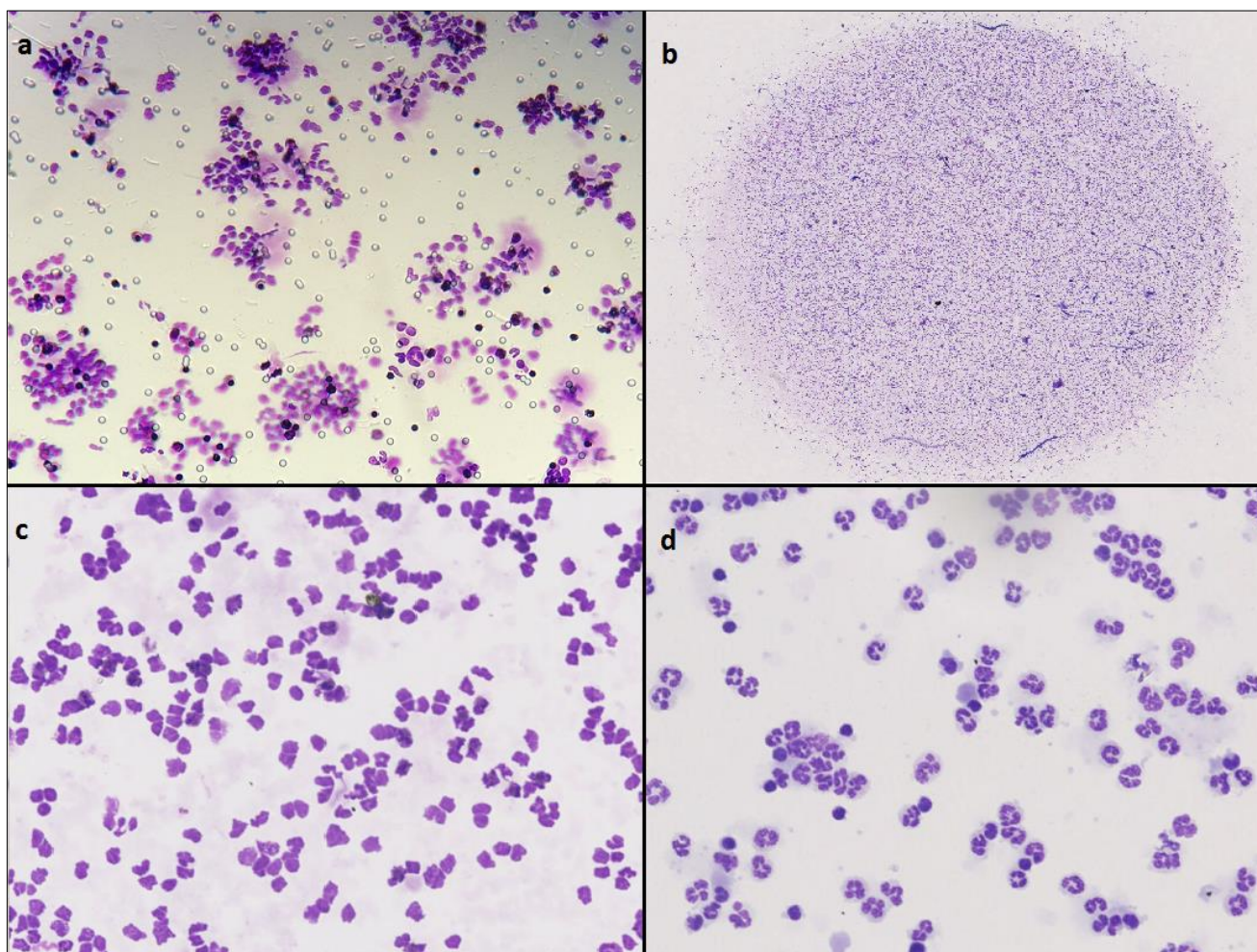
prélèvement. Le temps de lecture était en moyenne de 30 min pour les trois lames d'un même patient, avec un allongement en cas de mauvaise qualité des lames avec une hypercellularité de fond. La lecture des filtres était d'environ 10 minutes par filtre de densité cellulaire faible, et 15 minutes en cas de cellularité élevée, avec une pénibilité importante du fait de la présence de cellules de part et d'autre de la membrane, nécessitant un ajustement de la mise au point.

Au total, 74 lames et filtres correspondant ont été étudiés. La qualité était très variable, avec 62 % de qualité correcte et 38 % de qualité médiocre (Figure 3). Elle variait au sein d'un même point de suivi dans 30% des cas. Nous avons évalué la présence ou non de CTC en fonction de la qualité des lames. Sur les 28 lames de qualité médiocre, 86 % avaient des CTC, contre 100% des 46 lames de bonne qualité ( $p = 0,06$ ). Nous avons ensuite évalué la qualité des lames et le nombre de CTC sur cette lame par rapport à la moyenne des 3 filtrations du point de suivi. Sur les 46 lames de bonne qualité, 26 avaient un nombre de CTC supérieur à la moyenne par filtration contre 12 sur les 28 de qualité médiocre ( $p = 0,34$ ).

Au total, 830 CTC et 52 UMC ont été retrouvées sur l'ensemble des 74 lames. Tous nos patients avaient des CTC lors du premier point de contrôle à M0, avec en moyenne  $13,1 \pm 8,9$  CTC / filtration. Nous avons retrouvé  $0,8 \pm 0,9$  UMC / filtration pour l'ensemble des patients et des points de suivi. Sur l'ensemble des filtres, seulement  $1,6 \pm 2,0$  CTC / filtration ont été décomptées (Figure 4). Nous n'avons pas trouvé de pigment mélanique dans le cytoplasme des CTC. Nous avons observé des CAML chez un patient à un point de suivi. Il s'agissait de cellules de plus de  $20 \mu\text{m}$ , aux noyaux hyperchromatiques et aux contours irréguliers, mais entourés d'un abondant cytoplasme éosinophile.

Nous avons comparé l'évolution des CTC sur lame seule avec celle des CTC sur lame et sur filtre (Annexe 3). Entre les CTC sur lames *versus* CTC sur lames et filtres, le coefficient d'adéquation était  $R^2 = 96,42\%$ , ce qui nous a permis de calculer une pente à 0,91 (erreur type : 0,02) avec un intervalle de confiance (IC 95%) [0,87 ; 0,95] et une ordonnée à -0,46 (erreur type : 0,36) avec un IC 95% [-1,18 ; 0,26] (Figure 5). Les intervalles de confiance montrent que la pente est significativement inférieure à 1, avec une ordonnée ne différant pas de 0, c'est-à-dire qu'il y a une différence significative entre les valeurs des CTC sur les lames seules et les valeurs des CTC sur lames et filtres, avec des valeurs sur lames significativement inférieures aux valeurs sur lames et filtres (le rapport étant approximativement de 0,91). L'écart maximal entre les CTC sur les lames et les CTC sur lames et filtres peut atteindre 41,7%, avec un écart moyen de 7,1% (écart-type 9,0%). Nous

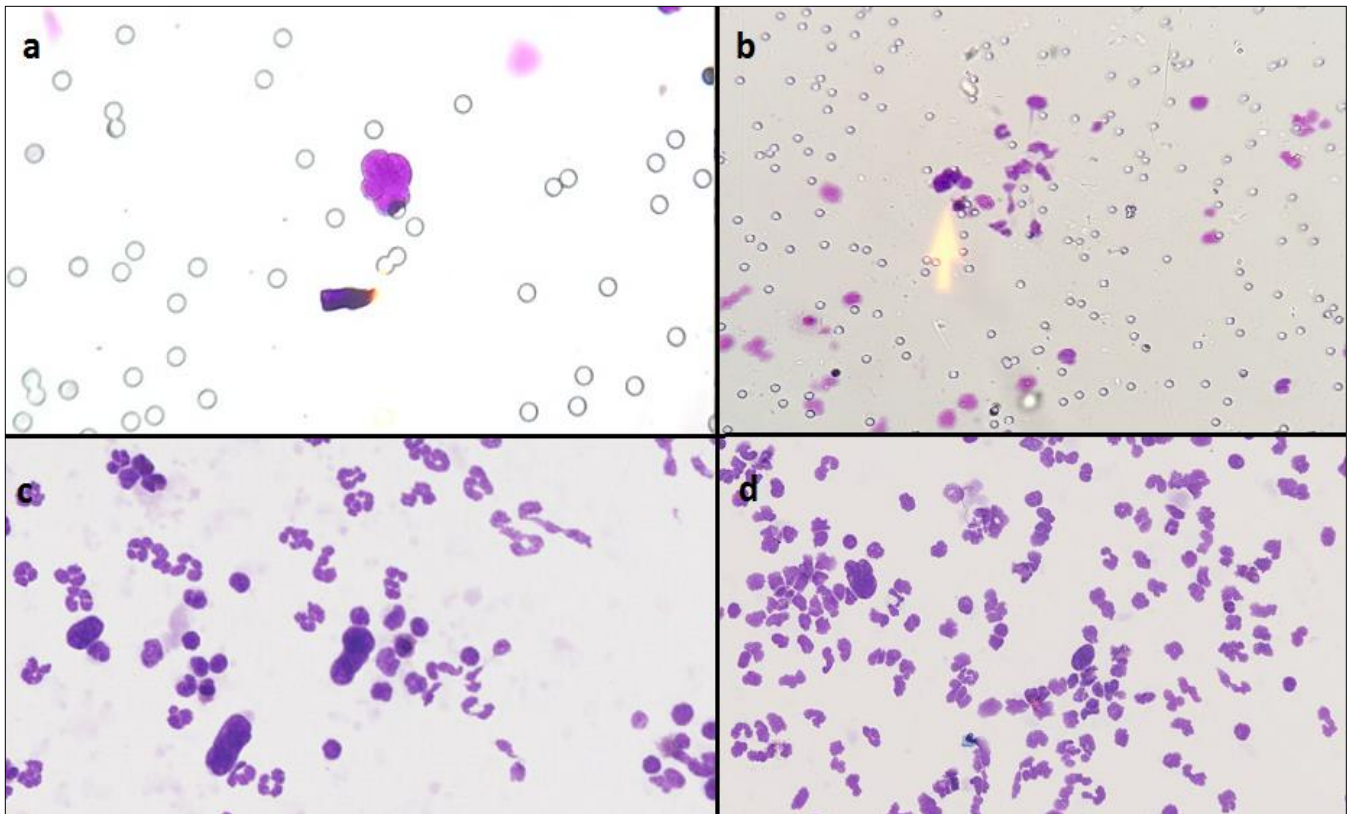
avons regardé si cette différence avait un impact vis-à-vis de l'évolution des patients et du rapport du nombre de CTC par rapport à la valeur seuil de 5 CTC par filtration. Seules deux filtrations du prélèvement à 6 mois du patient n°4 ont montré une différence entre les CTC sur lames et CTC sur lames et filtres par rapport au seuil de positivité (Annexe 4). Il n'y avait pas de différence dans le profil évolutif des patients.



**Figure 3.** Aspect des cellules d'accompagnement sur filtres et lames.

*a : cellules d'accompagnement sur filtre (x20) ; b : lame à faible grossissement ( x2) ; c : cellules d'accompagnement sur une lame de qualité médiocre (x20) ; d : cellules d'accompagnement sur une lame de bonne qualité (x20)*



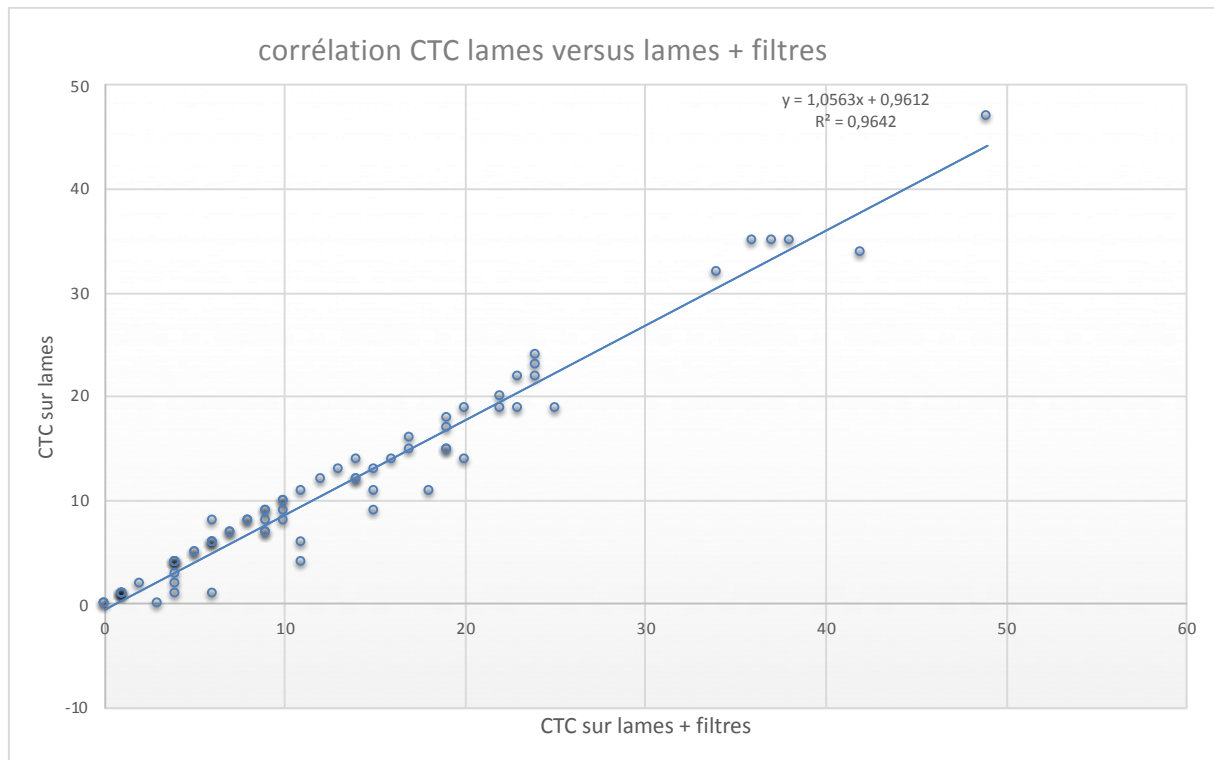


**Figure 4.** Aspect des CTC et UMC sur filtre et lame.

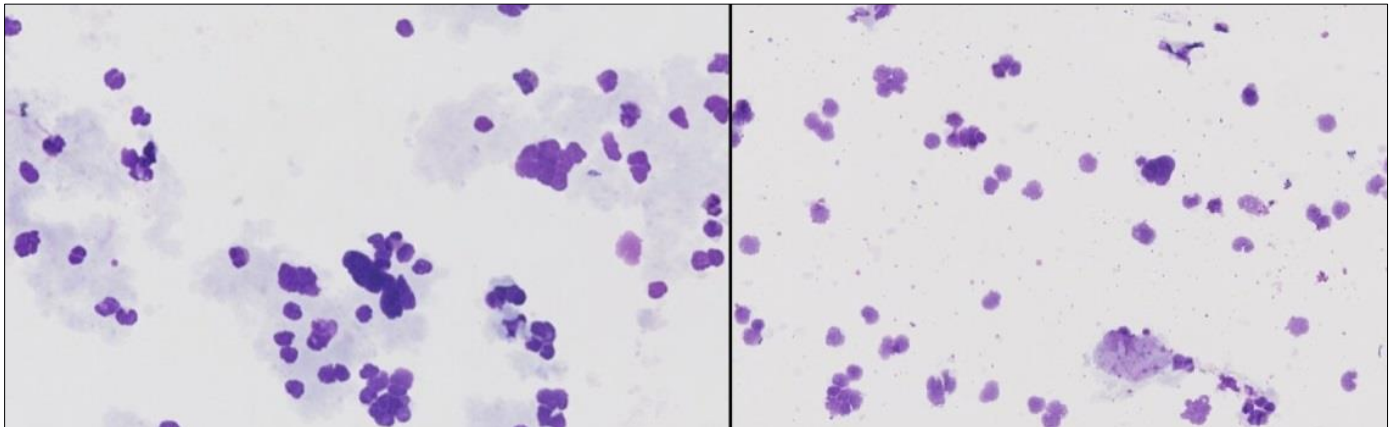
*a : CTC sur filtre (x20) ; b : UMC (flèche) sur filtre (x10) ; c : CTC et UMC sur lame (x10) ; d : CTC et UMC sur lame (x20)*

Sur les trois filtrations du patient témoin, deux cellules atypiques ont été visualisées, soit une moyenne de  $0,7 \pm 0,6$  CTC / filtration. Elles mesuraient plus de  $20 \mu\text{m}$ , au rapport nucléo-cytoplasmique élevé, aux noyaux hyperchromatiques et irréguliers, et donc considérées comme CTC. Il n'a pas été visualisé d'UMC, ni CAML, ni clusters. (Figure 6)

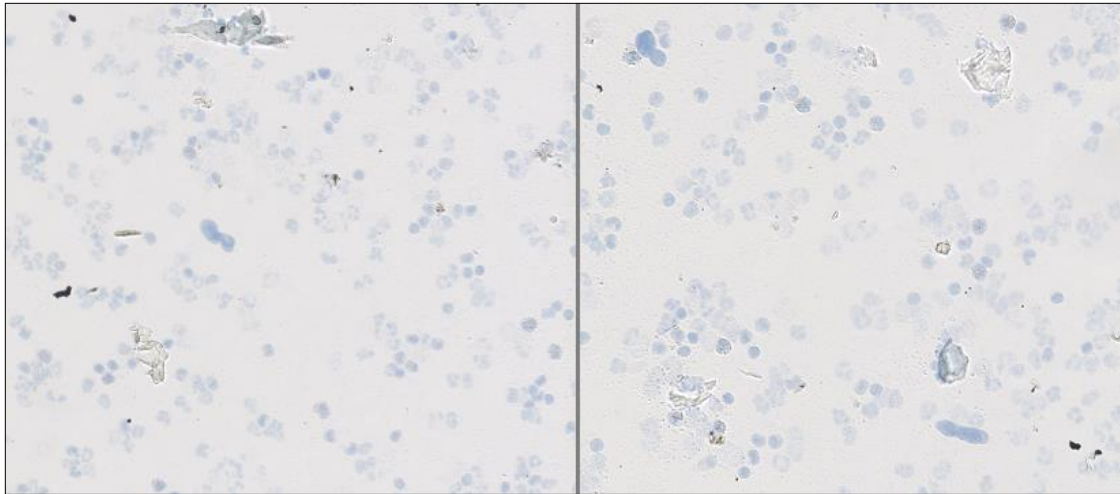
L'ICC s'est révélée non contributive, avec l'absence totale de marquage des CTC avec les trois anticorps testés : MelanA, HMB45 et PS100, et ce malgré les nombreux tests réalisés. La qualité des lames restait correcte, sans décollement des cellules ni bruit de fond ni faux marquage. Les CTC étaient reconnaissables grâce à la contre coloration par l'hématoxyline, mais ne présentaient aucun marquage (Figure 7).



**Figure 5.** Courbe de corrélation entre le compte des CTC sur lames et le compte des CTC sur lames additionné au compte de CTC sur filtres, par l'observateur 1  
*Coefficient d'adéquation  $R^2 = 96,42\%$ , pente à 0,91 (erreur type : 0,02) avec IC 95% [0,87 ; 0,95] et ordonnée à -0,46 (erreur type : 0,36) avec IC 95% [-1,18 ; 0,26].*



**Figure 6.** Cellules mimant des CTC sur lames du patient témoin.  
*Coloration MGG (x20)*

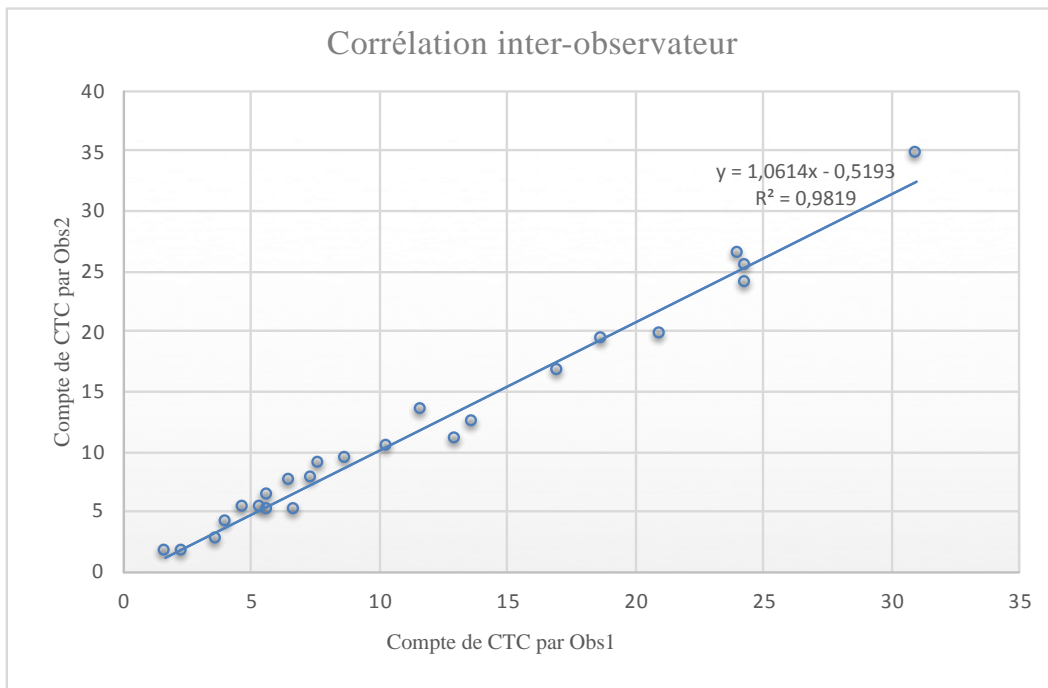


**Figure 7.** Technique d'ICC sur lames.

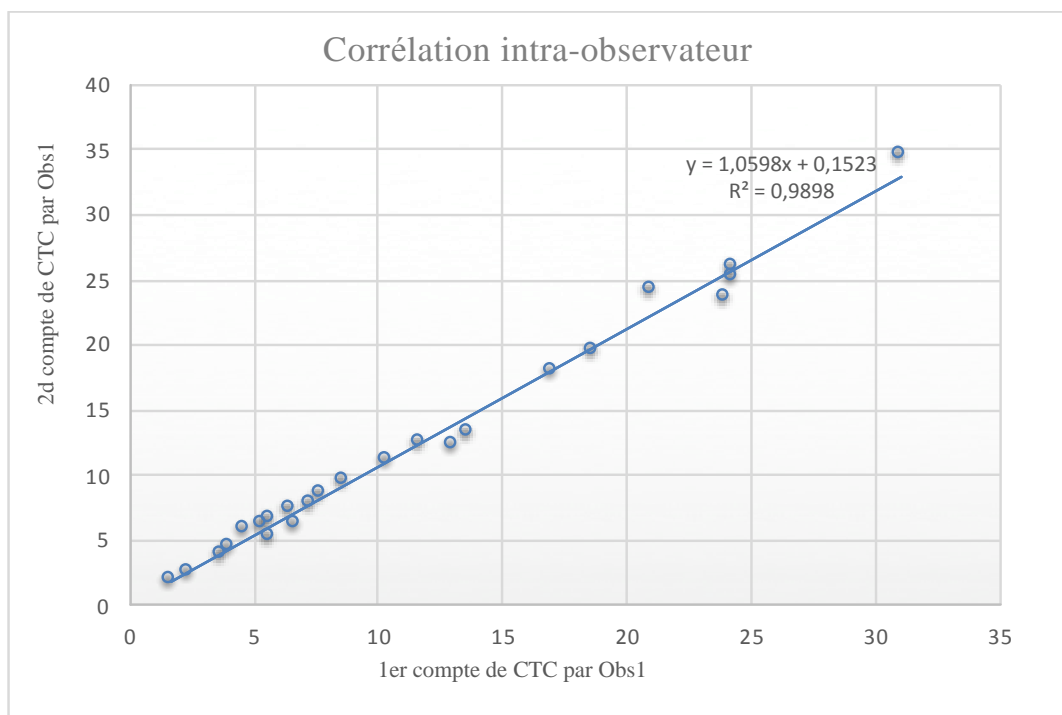
*Contre-coloration par hématoxyline et anticorps anti melanA (x10) : absence de marquage des CTC*

Nous avons testé la reproductibilité inter et intra observateurs du compte de CTC sur les lames et donc des critères de malignité. L'analyse de l'ensemble des moyennes de CTC/filtration des observateurs 1 et 2 est présentée en annexes 5. Le coefficient d'adéquation était de  $R^2=98,19\%$ , avec une pente à 0,93 (erreur type : 0,03) avec IC 95% [0,87 ; 0,98] et une ordonnée à 0,69 (erreur type : 0,39) avec IC 95% [-0,12 ; 1,51] (Figure 8). Les intervalles de confiance montrent que la pente est significativement inférieure à 1, avec une ordonnée de différent pas de 0, c'est-à-dire qu'il y a une différence statistiquement significative entre les comptes de CTC des deux observateurs, avec des valeurs de CTC de l'observateur 2 significativement inférieures aux valeurs de l'observateur 1. L'écart maximal entre les deux observateurs était de 16,7% avec un écart moyen de 5,2% (écart-type 4,8).

De même, l'analyse de l'ensemble des moyennes de CTC/filtration des comptes initiaux et à 1 mois de l'observateur 1 est présentée en Annexe 6. Le coefficient d'adéquation était  $R^2 = 98,98\%$ , avec une pente à 0,93 (erreur type : 0,02) avec IC95% [0,89 ; 0,98] et une ordonnée à -0,02 (erreur type : 0,31) avec IC95% [-0,66 ; 0,61] (Figure 8). Les intervalles de confiance montrent que la pente est significativement inférieure à 1, avec une ordonnée de différent pas de 0, c'est-à-dire qu'il y a une différence statistiquement significative entre les deux comptes à distance du même observateur, avec des valeurs à 1 mois significativement inférieures aux valeurs initiales. L'écart maximal était de 12,5%, avec un écart moyen de 5,1% (écart-type 2,9).



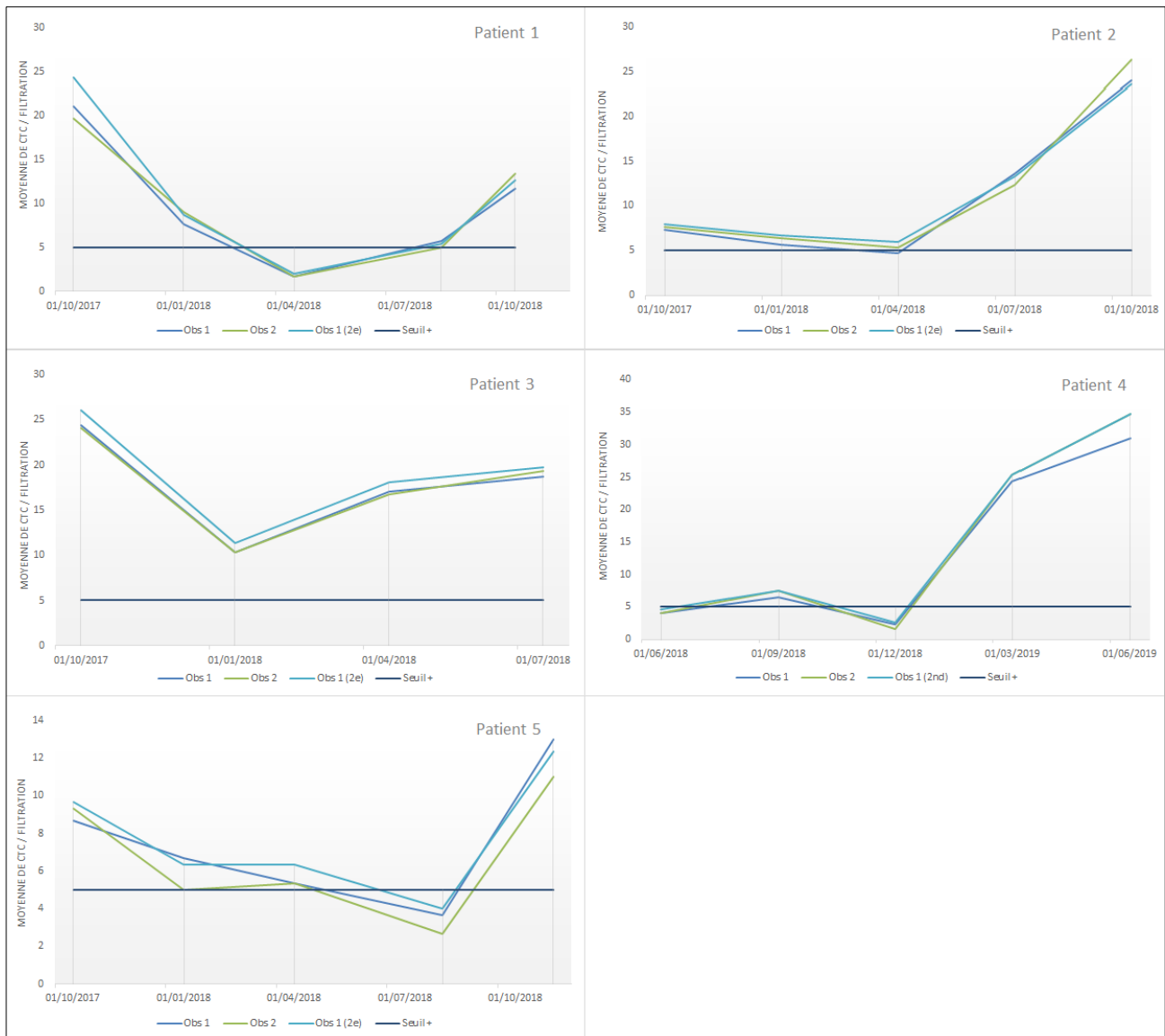
a) Courbe de corrélation inter-observateur :  $R^2=98,19\%$  ; pente : 0,93 (erreur type : 0,03) avec IC 95% [0,87 ; 0,98] et ordonnée : 0,69 (erreur type : 0,39) avec IC 95% [-0,12 ; 1,51]



b) Courbe de corrélation intra-observateur :  $R^2 = 98,98\%$  ; pente : 0,93 (erreur type : 0,02) avec IC 95% [0,89 ; 0,98] et ordonnée : -0,02 (erreur type : 0,31) avec IC 95% [-0,66 ; 0,61]

**Figure 8.** Courbes de corrélation inter et intra observateurs

Nous avons ensuite vérifié si ces différences statistiquement significatives impactaient les variations des CTC. (Figure 9). Il y avait une différence vis-à-vis du seuil de positivité de 5 CTC / filtration pour le patient 2 au suivi à 6 mois. Les différences inter-observateurs ont impacté le profil évolutif du patient 5, entre le suivi à 3 mois et à 6 mois, avec une diminution du nombre de CTC avec l'observateur 1 et une augmentation du nombre de CTC avec l'observateur 2.



**Figure 9.** Courbes d'évolution des CTC dans le temps par patient selon les comptes des deux observateurs et des deux comptes du même observateur

### 3) Profils évolutifs des patients

A l'inclusion, 4 des patients avaient des CTC supérieures au seuil de positivité, dont deux avec un nombre élevé  $\geq 20$  CTC / filtration. Un seul de nos patients est décédé après 9 mois de traitement avec un nombre de CTC à 18,7 / filtration au dernier point de contrôle. Un nombre élevé de CTC  $\geq 20$  / filtration à l'instauration de la première ligne de traitement ne montre pas de différence statistiquement significative en termes de survie ( $p = 0,22$  avec test de Log-rank).

Le patient n°1 sans primitif retrouvé présentait de multiples adénopathies métastatiques confirmées par une histologie sur biopsie, ainsi que des lésions hépatiques. Il était le seul patient muté *BRAF* à l'inclusion, avec une [ADNlc] très élevée à 363 ng/ml au premier prélèvement. Sur le plan clinique, il présentait des adénomégalies axillaires palpables, le reste de l'examen était normal. Durant les neuf premiers mois du suivi, il a présenté une régression partielle de l'ensemble des lésions radiologiques, ainsi qu'une normalisation de son examen clinique. En parallèle, la [ADNlc] a fortement diminué, jusqu'à passer en dessous du seuil de positivité entre les 6<sup>e</sup> et le 9<sup>e</sup> mois du suivi. Il n'a plus été retrouvé de mutation du gène *BRAF* sur l'ensemble des points de suivi. Le nombre de CTC, de 21 CTC / filtration à l'inclusion, a également diminué et est devenu non significatif entre le 3<sup>e</sup> (7,7 CTC / filtration) et le 6<sup>e</sup> mois (1,7 CTC / filtration). Au dernier scanner du suivi à 12 mois, il a présenté une progression radiologique, avec augmentation de taille des lésions connues. Le nombre de CTC avait augmenté plus précocement, dès le 9<sup>e</sup> mois du suivi et continué de progresser au 12<sup>e</sup> mois (Figure 10). Le performans statut (PS) de l'OMS était resté stable entre 0 et 1 tout le long du suivi. Au TDM TAP à 15mois, les lésions radiologiques avaient encore progressé puis se sont stabilisées au scanner de contrôle à 18 mois.

Le patient n°2 était suivi pour un mélanome desmoplastique du vertex avec des localisations pulmonaires secondaires. Il avait 7,3 CTC / filtration à l'inclusion. Au 3<sup>e</sup> mois après l'initiation du traitement par immunothérapie, il était en rémission complète au TDM TAP, persistante sur les TEP-TDM aux 6<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> mois. Après décision en réunion de concertation pluridisciplinaire, son traitement a été suspendu après 18 cures. L'évolution des CTC était concordante. Elles ont diminué jusqu'à passer sous le seuil de positivité au 6<sup>ème</sup> mois (4,7 CTC / filtration). La [ADNlc] était non significative avec des variations inférieures

à 10 ng/ml autour du seuil de positivité sur l'ensemble de suivi. L'examen clinique et son PS étaient strictement normaux. Au scanner TAP du 12<sup>e</sup> mois du suivi, des lésions pulmonaires sont apparues, à type de condensation alvéolaire, dont la malignité n'a pas pu être affirmée par les radiologiques. La survenue de ces lésions était précédée par une augmentation importante du nombre de CTC (Figure 10). Le traitement n'a pas été repris, et les lésions ont disparues au scanner de contrôle. A 21 mois de l'inclusion, il était toujours stable sur le plan clinique et en rémission complète radiologique.

Le patient n°3 était suivi pour un mélanome de type superficiel extensif du dos depuis 2010, et a présenté en 2017 de nombreuses métastases pulmonaires, hépatiques, surrenaliennes, spléniques et cutanées. A l'inclusion, il avait un nombre de CTC élevé à 24,3 CTC / filtration. L'évolution radiologique à 3 mois était dissociée, avec une disparition de l'ensemble des lésions pulmonaires, une nette diminution des lésions spléniques et hépatiques, et seulement une augmentation d'une lésion surrenalienne par rapport au TDM TAP initial inférieure à 25%, que nous avons donc considéré en régression partielle selon les critères OMS. Il en était de même au scanner du 6<sup>e</sup> mois. Cette amélioration du volume global tumoral était concordante avec l'examen clinique qui retrouvait une diminution de taille des nodules sous-cutanés palpables jusqu'à disparition totale au 6<sup>e</sup> mois, ainsi qu'avec les CTC qui avaient diminué au 3<sup>e</sup> mois de 24,3 à 10,3 CTC / filtration.

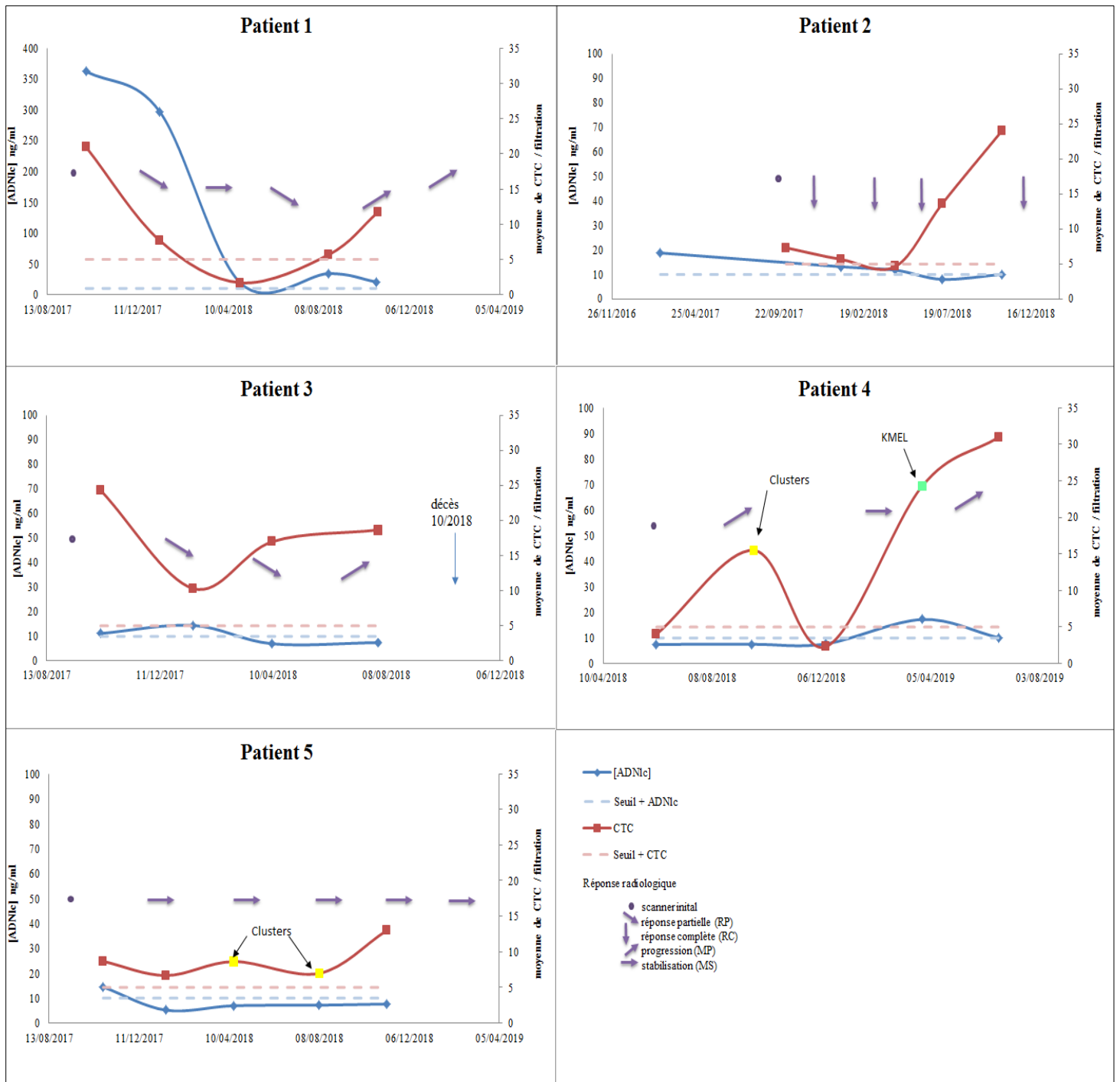
Le nombre de CTC a augmenté au suivi à 6 mois à 17 CTC / filtration, précédant l'apparition de nouvelles lésions métastatiques cérébrales au scanner à 9 mois. La [ADNlc] était non significative avec des variations inférieures à 10 ng/ml autour du seuil de positivité sur l'ensemble de suivi (Figure 10). Après son 9<sup>e</sup> mois de suivi et 22 cures d'immunothérapie, le traitement a été suspendu devant une altération de l'état général et une radiothérapie pan-encéphalique a été débutée. Il est décédé deux mois plus tard.

Le patient n°4, suivi pour un mélanome nodulaire de la main gauche en 2017, a présenté des lésions secondaires ganglionnaires, cutanées et pulmonaires en 2018. Il avait un nombre de CTC négatif à l'inclusion (4 CTC / filtration). Il a présenté une réponse radiologique dissociée avec diminution de l'ensemble des métastases connues, mais apparition de métastases cérébrales au scanner du 3<sup>e</sup> mois, considéré en progression selon les critères OMS. Cliniquement, les nodules sous cutanés avaient diminué et il était asymptomatique sur le plan neurologique. Il est resté stable au TDM TAP du 8<sup>e</sup> mois. Les CTC, négatives à l'inclusion, ont subi une discrète augmentation au 3<sup>e</sup> mois (6,5 CTC /

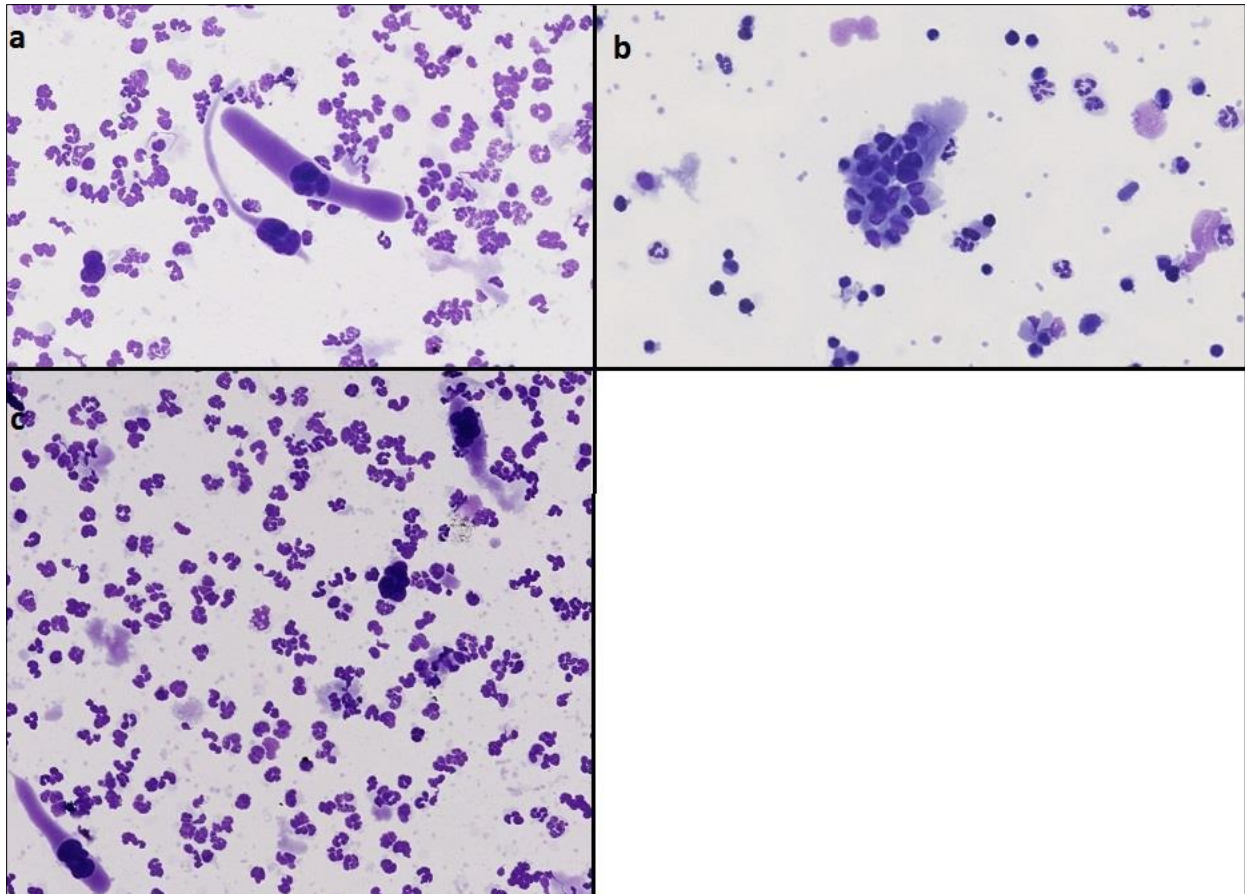
filtration), associée à la présence de nombreux clusters, puis étaient de nouveau négatives au 6<sup>e</sup> mois. Le patient a bénéficié d'une radiothérapie pan-encéphalique entre le 3<sup>e</sup> et le 6<sup>e</sup> mois. A scanner du 10<sup>e</sup> mois, les lésions cérébrales ont progressées et sont devenues symptomatiques cliniquement, avec crises comitiales et déficit neurologique séquellaire. Le nombre des CTC a progressé au 9<sup>e</sup> mois (24,3 CTC / filtration), associées à des CAML, ainsi qu'au 12<sup>e</sup> mois (31 CTC / filtration) (Figures 10 et 11). La [ADNlc] était non significative sur l'ensemble du suivi, malgré une augmentation de 7,69 ng/mL à 17,25 ng/mL entre les 6<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> mois, en dessous du seuil de positivité. Le traitement a été stoppé après 21 cures d'immunothérapie, devant une altération de l'état général et une indication de soins palliatifs a été posée.

Enfin, le patient 5 a présenté un mélanome nodulaire de la cuisse gauche avec une métastase pulmonaire opérée en 2016 par lobectomie, ainsi que de nombreuses métastases ganglionnaires. Il a eu une évolution radiologique stable tout au long du suivi, avec une alternance de TDM TAP et TEP-TDM. L'examen clinique était normal tout comme le PS, à 0. Les CTC, peu élevées à l'inclusion (8,7 CTC / filtration) sont restées relativement stables les 9 premiers mois du suivi avec des variations, en prenant en compte les clusters retrouvés au 6<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> mois, de 1 à 2 CTC / filtration. Au cours des trois derniers mois, elles ont augmenté (13 CTC / filtration). L'ADNlc est resté en dessous du seuil de positivité pendant tout le suivi (Figure 10 et 11). A 18 mois de l'instauration du traitement et après 27 cures, il est toujours stable sur le plan clinique et radiologique.





**Figure 10.** Évolution dans le temps du compte de CTC, de la [ADNc] et des lésions radiologiques par patient



**Figure 11.** Images de CAML et clusters sur lames  
*a et c : CAML et CTC sur lame (x20) ; b : cluster de CTC sur lame (x20)*

## ***Discussion***

### 1) Technique ScreenCell®

De nombreuses techniques existent actuellement pour détecter et quantifier la présence de CTC, mais à ce jour, seule la technique CellSearch® a été validée en routine par la FDA.

Cette technique, qui permet la détection des CTC par séparation immunomagnétique, présente quelques limites. D'une part, il existe un biais de sélection du fait de l'utilisation d'un marquage des CTC d'origine épithéliale. Certaines CTC peuvent perdre l'expression de leurs marqueurs épithéliaux suite à une transition épithélio-mésenchymateuse, et ainsi ne pas être reconnues (54) ; d'autre part, elle n'est pas encore développée dans des cancers d'une autre origine, comme le mélanome. Enfin, son utilisation nécessite deux automates et de nombreux réactifs spécifiques, donc un investissement important, ainsi qu'un coût élevé à l'utilisation en routine.

La technique ScreenCell® permet la détection de CTC de toutes origines, en se basant seulement sur leur taille. Elle est très sensible et spécifique, avec une perte de CTC minimale (55). Les principales CTC perdues sont de trop petite taille vis-à-vis des pores de filtration et ne sont pas retenues sur le support. Ces pores de filtration de 7,5 µm de diamètre ont été conçus pour retenir la plus plupart des CTC du fait de leur grand diamètre, mais il est possible de trouver des CTC de plus petite taille dans certains cancers et donc avoir une fuite de CTC lors de la filtration.

La technique ISET® est basée également sur une sélection par la taille. Le sang veineux périphérique est traité par un appareil spécifique, le Rarecells® Device qui permet une filtration verticale du sang. Il est capable de détecter une seule CTC intacte dans 10 mL de sang. Ce test n'a pas encore été validé pour une utilisation de routine malgré de nombreux travaux réalisés. Il a été comparé à la technique CellSearch® dans les carcinomes à cellules rénales par Bai *et al.* Dans l'étude, aucune des deux méthodes n'a détecté de CTC chez les patients témoins, mais la technique ISET® a détecté d'avantages de CTC et clusters et était corrélée avec le stade ganglionnaire clinique (56). La technique ISET® est comparable à la technique ScreenCell® dans ses critères de sélection et les analyses complémentaires réalisables, avec comme seul inconvénient un coût un peu plus élevé à l'utilisation de routine. Elle a été la première technique autre que la RT-PCR à être testée chez des patients avec des mélanomes à différents stades d'évolution (57). Cette étude avait montré des résultats similaires aux nôtres, avec une majorité des CTC seules et non en clusters, non pigmentées et des témoins négatifs.

La méthode de détection des CTC par la taille, avec les critères cytologiques de routine, couplée à l'ICC, semble donc être adaptée pour le mélanome.

La technique ScreenCell® est une technique d'analyse cytologique non invasive, basée sur un principe de filtration des cellules par leur taille, qui n'utilise que du matériel à usage unique et à faible coût (environ 200€ par patient par point de suivi), sans investissement dans un automate spécifique. Sa réalisation est simple et rapide, et permet un premier résultat en 24h. L'utilisation des tubes Transfix® lors de la prise de sang veineuse apporte une plus grande flexibilité à la technique, avec un délai de 72h pour réaliser la technique, contrairement aux tubes EDTA classique qui ont un délai de 4h. Pour ces raisons, nous avons choisis cette approche pour notre étude.

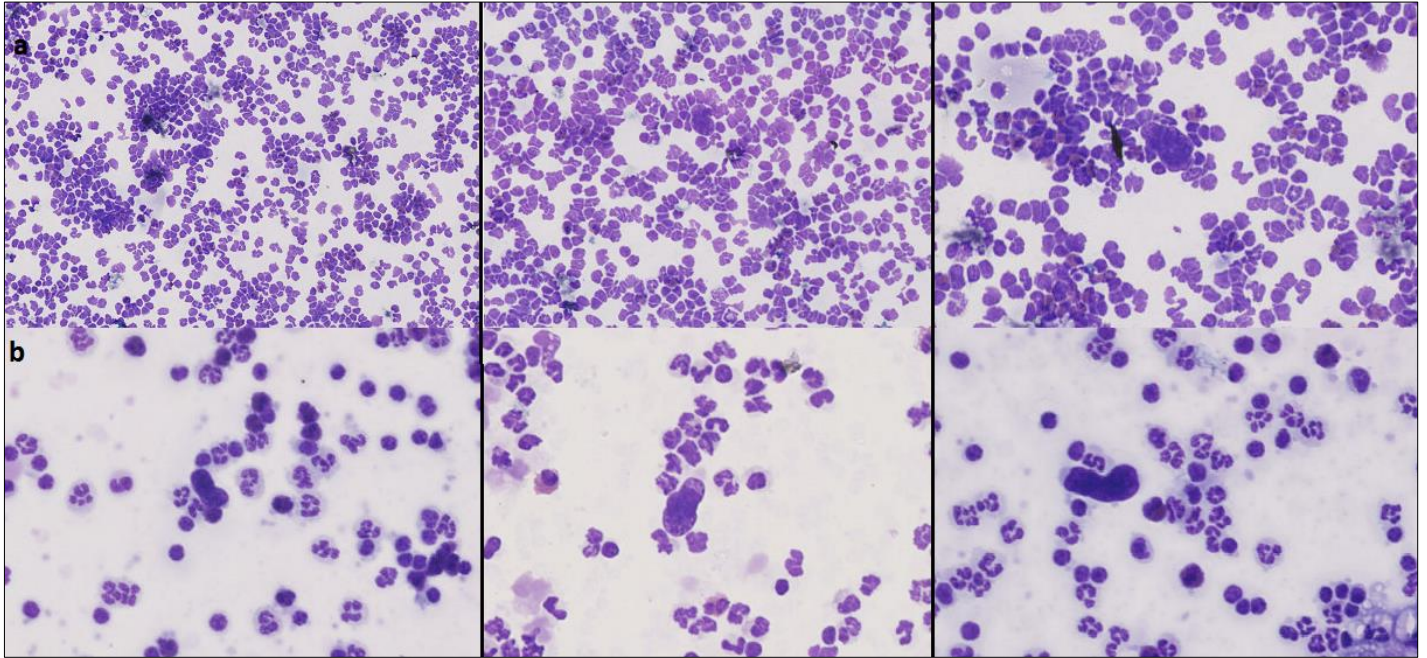
L'identification des CTC par la technique ScreenCell® repose sur des critères morphologiques simples, utilisés en cytologie de routine par les pathologistes dans la recherche des cellules suspectes de malignité. Ces critères sont une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique, l'irrégularité des contours nucléaires et un hyperchromatisme nucléaire. La grande majorité des cellules est facilement classable dans les catégories « cellule maligne (CTC) » ou « cellule bénigne hématologique » car nous retrouvons moins d'une cellule par lame classée en « malignité incertaine ».

Malgré des corrélations inter et intra-observateurs qui semblent très bonnes (Figure 8), les différences significatives entre les valeurs des comptes de CTC ne nous ont pas permis de démontrer la reproductibilité de la technique dans le groupe de patient étudié. Le coefficient de variation entre le compte des deux observateurs peut varier jusqu'à 16,7% au sein de notre groupe de patient (Annexe 5). De même, l'écart entre les comptes initiaux et à 1 mois d'un même observateur peut varier jusqu'à 12,5% (Annexe 6). Ces écarts, bien qu'élevés, correspondent à de faibles variations de moyenne, de 1 à 2 CTC/filtration, dont il est difficile d'évaluer l'impact sur le suivi des patients, du fait de l'absence de définition précise dans la littérature d'une variation significative de CTC entre deux points de suivi.

Nous avons observé que ces valeurs hautes étaient majoritairement réalisées sur des points de contrôle de plus mauvaise qualité. La qualité des lames était très variable dans notre échantillon. Les cellules d'accompagnement n'étaient pas toujours individualisables entre lymphocytes et polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles. Leur cytoplasme était absent et leur noyau mal conservé. Nous n'avons pas trouvé de lien significatif entre la qualité des lames et le fait de trouver ou non des CTC, ni avec le fait d'être supérieur ou inférieur à la moyenne par filtration du point de suivi. La qualité des lames n'impacte donc pas la présence et la quantité de CTC retrouvées sur les lames. Mais les écarts observés entre les deux pathologistes ou entre les comptes initiaux et à un mois peuvent être en partie expliqués par des lames de moins bonne qualité et / ou trop densément cellulaire.

Sur les lames de qualité médiocre, les CTC apparaissent mieux conservées que les cellules d'accompagnement (figure 12). Le système de filtration ne permet pas de contrôler la pression lors du passage du sang à travers la membrane, ce qui peut altérer les cellules. Cependant, les cellules tumorales circulantes acquièrent des propriétés de résistance leur permettant de s'adapter aux différents microenvironnements rencontrés durant les différentes étapes du processus de métastase. La transition épithélio-mésenchymateuse confère aux CTC des capacités à survivre dans la circulation sanguine, du fait de modifications du cytosquelette

leur conférant une plus grande déformabilité, et donc une plus grande résistance aux pressions externes, expliquant que nos CTC paraissent moins altérées que les cellules hématologiques normales (58).



**Figure 12.** Illustration des difficultés de lecture selon la qualité des lames  
*a : CTC sur lames de qualité médiocre aux grossissements x10, x20 et x40 ; b : CTC sur lames de bonne qualité aux grossissements x20 et x40*

La variation de qualité au sein de nos lames ne semble pas provenir d'une mauvaise réalisation technique, car elle varie au sein d'un même point de suivi d'un même patient. De plus, les filtres des patients comportent très peu de CTC résiduelles en comparaison d'un nombre bien plus élevé sur les lames correspondantes, ce qui témoigne d'une bonne réalisation technique. En comparant le compte de CTC sur lames seules *versus* le compte de CTC sur lames et filtres, seulement un patient présente une différence vis-à-vis du seuil de positivité sur un point de son suivi (Annexe 4). Malgré une corrélation qui semble très bonne (Figure 5), nous n'avons pas réussi à montrer que le compte de CTC pouvait être réalisé uniquement sur lames, du fait d'une différence significative entre le compte de CTC sur lames et sur lames plus filtres. Les écarts importants entre les deux comptes sont surtout mesurés lorsque le nombre de CTC sur lame est déjà important, et nous avons vu qu'il n'y a eu qu'un point de contrôle où la différence du nombre de CTC entre lames et lames plus filtres faisait changer le rapport au seuil de positivité par filtration. La lecture des filtres nécessite du temps et une importante accommodation visuelle entraînant rapidement une fatigue oculaire, ce qui

peut limiter l'usage de la technique en routine. Il est donc nécessaire de refaire des tests sur un échantillon de patients plus important et d'avantage représentatif de l'ensemble de la population, afin de prouver qu'il est possible de se passer de la lecture des filtres pour le compte de CTC.

Nous avons également réalisé la technique chez un patient sain afin de vérifier la spécificité des critères de malignité. Nous avons retrouvé deux cellules répondant à tous les critères de CTC sur les trois filtrations. Ces résultats sont bien en dessous du seuil de positivité fixé à 5 CTC / filtration. Ils sont en accord avec les données de la littérature, qui ont démontré la présence en faible quantité de cellules atypiques dans la circulation sanguine chez des sujets sains. Ces cellules peuvent avoir diverses origines : dystrophiques ou réactionnelles, dysplasiques, malignes. De Giorgi *et al.* ont montré en 2010 l'existence de cellules naeviques bénignes dans la circulation sanguine de sujets indemnes de toute lésion maligne (37). De nombreuses études ont également démontré la capacité de certains cancers à un stade métastatique avancé, tel que le mélanome, de régresser spontanément et complètement (59). Mais il reste possible de détecter des CTC dans leur circulation périphérique, du fait de micro-métastases en transit. Enfin, des cellules non tumorales et non hématologiques peuvent circuler dans le sang et mimer des CTC. Il s'agit dans la grande majorité des cas de cellules endothéliales, comme le montre l'étude menée par El-Heliebi *et al.* publiée en 2013 (60).

Afin de vérifier l'origine néoplasique des CTC identifiées, la technique ScreenCell® permet la réalisation d'examen complémentaires, comme l'immunocytochimie (ICC) ou l'hybridation par fluorescence in situ (FISH). L'ICC a montré dans une étude princeps de Desitter *et al.*, d'excellents résultats, avec une expression de l'anticorps anti-KL1 (marqueur de la nature épithéliale) par des CTC issues de carcinome bronchique non à petites cellules (55). Dans notre étude, nous avons réalisé la technique sur des lames de cytopspin précédemment montées au pertex (Sakura®) pour permettre plusieurs lectures échelonnées dans le temps par les pathologistes. Nous avons ensuite dû décoller la lamelle à l'aide de xylène, puis réaliser la technique préconisée par le laboratoire. La technique a préalablement été validée sur des lames de test de culture cellulaire de lignées de mélanome, dont une colorée au MGG dans les mêmes conditions que nos lames de patients. Les seules différences entre nos lames et les tests étaient donc le milieu de montage et le solvant ayant servi à décoller la lamelle. Dans l'étude de Desitter *et al.*, l'ICC est faite sur les filtres, donc sans

montage préalable (55). Il semble que le milieu de montage de nos lames empêche de réaliser une ICC.

Il nous paraît cependant indispensable de parvenir à mettre au point l'ICC sur cytopspin, afin de confirmer l'origine tumorale des CTC, en raison de cellules non tumorales non hématologiques pouvant mimer les critères de malignité (60). L'ICC est également importante sur le plan thérapeutique, avec l'anticorps anti-Braf dans le mélanome (61) ou anti-PDL-1 dans les cancers bronchiques non à petites cellules. Les lames obtenues après CytoSpin peuvent être montées temporairement à l'eau uniquement le temps de la lecture puis démontées, afin d'être utilisable ensuite pour l'ICC. Cependant, cette méthode semble moins adaptée dans le cadre d'une utilisation en routine car elle ne permet pas de lecture différée ou de seconde lecture comme avec le montage au pertex. Il est également possible de réaliser le compte de CTC directement sur les supports ou filtres, en interposant une lamelle, sans montage préalable. Dans notre étude, nous avons choisi de réaliser plutôt un cytopspin pour la facilité de lecture sur lames par rapport aux filtres, et afin de pouvoir scanner les lames. Nous voulions également tester la lecture automatisée, mais cela n'a pas été possible avec l'automate utilisé au laboratoire en routine en hématobiologie, le CellaVision® DM96, car ce système d'analyse d'images automatisée est programmé pour lire les étalements sanguins et non les cytopspin.

Concernant les CAML, nous n'en avons trouvé que chez un seul patient à un point de suivi. Les noyaux de ces cellules sont identiques aux noyaux des CTC, et donc la seule différence est le rapport nucléo-cytoplasmique inférieur à 0,75, du fait d'un abondant cytoplasme éosinophile. Sur des lames de qualité médiocre, le risque est de compter à tort des CAML qui auraient perdu leur cytoplasme et se retrouveraient avec un noyau nu mimant des CTC. Il est donc intéressant de confirmer le caractère non mélanocytaire par une ICC avec un anticorps anti-CD68, marqueur histiocytaire. Du fait de leur rareté, il n'est pas possible de conclure sur leur rôle en tant que cellule d'accompagnement dans notre étude. Cependant, d'autres travaux ont montré qu'il s'agissait de cellules géantes issues de la lignée myéloïde avec un noyau volumineux et atypique, exprimant les marqueurs CD45, CD14 et CD11c, ainsi qu'un marquage cytoplasmique par des cytokératines (62). Elles favoriseraient la traversée des parois vasculaires par les CTC. Elles sont associées à la phagocytose au niveau du site tumoral et leur présence pourrait aider à évaluer la réponse immunitaire. De plus, l'étude d'Adams *et al.* a trouvé des CAML chez 38 des 41 patientes avec un cancer du sein à un stade avancé contre 0 des 16 patientes témoins. Ces cellules ont également été retrouvées

chez les 5 patientes avec une maladie non invasive, suggérant un afflux de CAML même en cas de lésions à haut risque de transformation en carcinome invasif (63). D'autres études sont nécessaires pour confirmer leur lien avec les CTC, et pouvoir s'en servir comme biomarqueur pronostique ou dans le suivi des patients.

En ce qui concerne les clusters, seuls deux patients à 1 et 2 points de contrôle en présentaient. Chez le patient 4, les clusters précédaient l'apparition des métastases cérébrales, mais chez le patient 5, la présence de clusters n'était pas suivie de nouvelles métastases, puisqu'il était stable radiologiquement tout au long de l'étude. Il est donc difficile, du fait de leur rareté, de conclure sur leur rôle dans la survenue de métastases dans notre groupe de patients.

Connus depuis les années 1950, ces clusters auraient une plus grande prédisposition à former des métastases à distance. L'étude d'*Aceto et al.* a montré, sur un modèle animal, que ces clusters de CTC provenaient d'agrégats de cellules formés au sein de la tumeur et non de la prolifération d'une seule cellule tumorale dans la circulation. Ils ont également calculé une augmentation de 23 fois de la compétence métastatique par rapport aux CTC isolées (64). Plus récemment, l'étude de *Mu et al.* a montré une augmentation du risque de progression chez les patients ayant à la fois des CTC isolées et des clusters par rapport aux patients n'ayant que des CTC isolées et pas de clusters (65).

Des amas de lymphocytes activés peuvent mimer des clusters de CTC, tout comme les amas de cellules endothéliales. Une ICC serait là encore recommandée pour confirmer l'origine néoplasique de ces clusters.

Dans certains cancers, les investigations peuvent être complétées par une étude de FISH sur les lames obtenues puis décolorées. Nous n'avons pas réalisé de test, car il n'y a pas d'indication à la FISH dans le mélanome. Enfin, le laboratoire propose un module de biologie moléculaire basé sur le même principe de filtration du sang veineux périphérique, ScreenCell®BM. Il permet entre autres, la recherche de mutation et l'analyse d'exome, soit la majorité des techniques de biologie moléculaire réalisées sur l'ADN libre circulant, mais sur un matériel tumoral viable et donc plus spécifique (55). Il sera alors possible de réaliser la recherche de mutations du gène *BRAF*, même sur un petit nombre de CTC (66).

Une étude avec d'avantage de puissance est maintenant nécessaire pour prouver la reproductibilité du compte de CTC sur lames, la corrélation du nombre de CTC sur lames



seules et sur lames plus filtres, afin de pouvoir se passer du compte de CTC sur filtre en routine, et enfin pour mettre en place un protocole d'ICC qui serait adapté à notre milieu de montage.

## 2) Comparaison CTC, [ADNlc] et réponse radiologique

Parmi les 5 patients de cette étude, quatre présentaient des CTC à l'inclusion de façon significative, c'est-à-dire  $\geq 5$  CTC/filtration, et pour les patients 1 et 3, ils en présentaient  $\geq 20$  CTC / filtration. Dans le groupe de patient étudié, nous n'avons pas observé d'impact pronostique d'un nombre élevé de CTC ( $\geq 20$ ) au diagnostic de métastases en termes d'OS. Ce résultat n'est pas en accord avec les données de la littérature puisque de nombreuses études ont montré l'impact pronostique des CTC au diagnostic de métastases à distance, notamment dans le mélanome (40). La faible puissance de notre étude explique l'absence de résultat significatif, malgré le fait qu'un des deux patients avec des CTC élevées soit décédé au cours du suivi, alors que les trois patients avec des CTC  $< 20$  sont vivants.

Le nombre de CTC semble corrélé à la réponse thérapeutique pour les trois patients ayant présenté une progression. Les courbes de CTC et l'évaluation de la réponse radiologique sont comparables (figure 10). La progression radiologique est précédée à 3 mois par une augmentation du nombre de CTC. Certains travaux dans la littérature sont en accord avec ces données. L'étude de Li *et al.* de 2018 a porté sur 100 mélanomes, tous stades confondus, avec une évaluation immunomagnétique du compte de CTC au début et à la fin du traitement corrélée à la survie. L'augmentation des CTC était significativement associée à une diminution de la survie sans progression, et était un bon indicateur de réponse thérapeutique (43). De même, l'étude de Botteri *et al.* a intéressé 80 patients avec un cancer du sein avancé pour lesquels les CTC ont été mesurées par la technique CellSearch® à l'initiation du traitement puis à 4, 8 semaines et tous les deux mois jusqu'à objectiver une progression de la maladie. L'augmentation du nombre de CTC était liée avec une augmentation du risque de progression (67).

A l'inverse, la méta-analyse de Fei *et al.* de 2014 n'a pas montré de lien significatif entre les variations de CTC et la réponse après chimiothérapie néo-adjuvante (45). Deux études ont été analysées, avec un total de 328 patientes atteintes de cancer du sein localement avancé. Les CTC ont été recueillies par la technique CellSearch®, au début et à la fin du

traitement néo-adjuvant, puis leur évolution a été comparée avec la présence ou non d'une réponse tumorale complète à l'histologique sur pièce d'exérèse. Les résultats montrent qu'il n'y a pas d'association entre la variation du nombre de CTC pendant la chimiothérapie néo-adjuvante et la réponse histologique.

Il n'y a donc pas encore d'étude robuste dans la littérature permettant de corroborer nos résultats. Les nombreuses méthodes d'évaluation et les différentes entités tumorales étudiées expliquent en partie que le rôle des CTC dans le suivi soit encore controversé.

Physiologiquement, la survenue de nouvelles métastases est liée à la transition de cellules malignes par la circulation périphérique jusqu'à l'organe cible (68). Il n'est donc pas surprenant que le nombre de CTC augmente de façon précoce lors de la survenue de nouvelles lésions radiologiques. C'est le cas pour nos patients n°3 et n°4 qui ont présenté une augmentation de leur CTC en parallèle de l'apparition de nouvelles métastases cérébrales.

Chez le patient n°1, l'augmentation de taille de lésions métastatiques préexistantes était précédée par l'augmentation des CTC. Notre hypothèse est que l'augmentation de la masse tumorale s'accompagne d'un renouvellement cellulaire accru avec d'avantage de cellules en apoptose se retrouvant dans la circulation sanguine.

Le coefficient de perte cellulaire au sein d'une tumeur, évalué en comparant le temps de doublement cellulaire et de la masse tumorale peut dépasser 70%, notamment dans le mélanome métastatique. La nécrose et l'apoptose sont les principales causes de perte cellulaire. Il existe donc une importante perte cellulaire, même dans les masses tumorales en augmentation. L'étude de Rossi *et al.* a retrouvé la présence de CTC exprimant des marqueurs précoces de l'apoptose chez plus de 80% des patients (69). Ces données peuvent expliquer l'augmentation du nombre de CTC du patient n°1 sans pour autant s'accompagner de nouvelles lésions radiologiques. Il s'agirait de CTC pré-apoptotiques, et donc incapables de former des lésions tissulaires à distance.

Le patient n°5, aux lésions radiologiques stables, avait des CTC positives à l'inclusion. Elles sont restées au-dessus du seuil avec des variations minimales de 1 à 2 CTC / filtration sur les neuf premiers mois et une variation à peine plus importante sur les trois derniers mois de 7 CTC / filtration. La présence d'une masse tumorale tissulaire persistante pourrait expliquer la présence CTC avec de faibles variations. Malgré l'absence d'extension tumorale locale ou à distance, les lésions malignes ont un index mitotique souvent élevé, renouvelant de façon fréquente leurs cellules et libérant ainsi dans la circulation des cellules mortes ou des CTC

pré-apoptotiques (69). L'autre hypothèse serait que la faible quantité de CTC provienne de CTC dites dormantes (38). Il a été montré dans la littérature que toutes les CTC n'étaient pas capables de donner des métastases viscérales à court terme. Des lésions métastatiques viscérales peuvent survenir plusieurs années après le diagnostic initial de cancer et ce malgré l'absence totale de masse tumorale primitive vivace.

Enfin, le patient n°2, en RC, présente une évolution concordante des CTC les six premiers mois avec une diminution du nombre de CTC jusqu'à être en dessous du seuil de positivité. Au 9<sup>e</sup> et 12<sup>e</sup> mois, l'évolution est devenue discordante avec persistance d'une RC au scanner et une progression importante des CTC (24 CTC / filtration). L'étude de Luzzi *et al.* de 1998 met en lumière l'incapacité de certaines CTC isolées ou de micro-métastases à initier ou continuer la croissance tissulaire pour donner des tumeurs macroscopiques (70). Il peut également s'agir de CTC « dormantes ». Il est donc possible de trouver des CTC dans l'organisme sans pour autant avoir une recrudescence des lésions macroscopiques à l'imagerie dans le suivi. Il sera intéressant de voir si ce patient présente des métastases à long terme. La présence de CTC dans l'organisme malgré une RC radiologique pourrait être un indicateur de risque de métastases à distance. L'intérêt de poursuivre le traitement jusqu'à la disparition complète des CTC serait alors à discuter.

Il semble qu'il y ait un lien entre le nombre de CTC et l'évolution des lésions radiologiques chez les patients non répondeurs, avec une augmentation du nombre de CTC plus précoce que les lésions à l'imagerie. Mais les patients répondeurs ont encore des CTC qui restent positives et variables, probablement du fait de la présence de CTC dormantes ou inaptes à donner des métastases à distance voire aussi de la présence de cellules mimant des CTC.

Les quatre patients non mutés pour le gène *BRAF* n'avaient pas ou peu de variations de leur [ADNlc] au cours de leur suivi. Ce taux restait proche du seuil de positivité, avec des concentrations basses et des variations non significatives, alors que le patient muté *BRAF* avait une [ADNlc] élevée avec des variations significatives, suivant l'évolution radiologique. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Gray *et al.* en 2015 qui démontre que les variations de la [ADNlc] sont identiques à celles de la réponse radiologique pour les patients traités par thérapies ciblées et donc mutés *BRAF* mais pas chez les patients sous

immunothérapies non mutés BRAF (33). L'étude de Sanmamed *et al.* de 2015 confirme également nos résultats chez les patients traités par thérapies ciblées (71).

Après une revue de la littérature des dix dernières années, nous avons étudié 7 travaux qui s'intéressent à la quantité d'ADN circulant chez les patients sous immunothérapie, détaillés en annexe 7 ((34), (72), (73), (74), (75), (76), (77)). Que ce soit dans le mélanome ou dans les cancers bronchiques non à petites cellules, seule la part d'allèles mutés était utilisée dans toutes les études, sous forme d'une concentration d'ADN tumoral circulant, [ADN<sub>tc</sub>], plus spécifique que la [ADN<sub>lc</sub>]. En effet, l'ADN circulant peut avoir diverses origines autres que tumorale et notamment inflammatoire (27). L'ensemble des études analysées retrouvent une corrélation entre l'évolution de l'[ADN<sub>tc</sub>] et la réponse radiologique ou la survie globale et sans progression. Chez les 4 patients non mutés *BRAF*, nous avons étudié une [ADN<sub>lc</sub>], puisqu'ils n'avaient pas initialement de mutations somatiques (*NRAS* ou *KIT*) habituellement recherchées. Nous ne pouvons donc pas comparer nos résultats avec ceux des études précédemment analysées, puisque les mélanomes de nos patients n'avaient pas de mutation somatique spécifique, ni les extrapoler à l'ensemble des patients avec un mélanome traité par immunothérapie.

Mais cela n'explique pas les très faibles [ADN<sub>lc</sub>] de nos patients, quelle que soit leur origine. En effet, nous nous attendions à davantage de variations de la [ADN<sub>lc</sub>] chez les patients avec une évolution favorable sous immunothérapie, du fait de la physiopathologie même de ces molécules. En effet, elles lèvent le frein tumoral empêchant la réaction immunitaire, et permettent ainsi aux cellules de l'inflammation de jouer leur rôle de défense vis-à-vis des cellules tumorales. En cas de réponse, il y a donc un lyse cellulaire importante et donc relargage d'ADN dans la circulation.

Étant donné le faible nombre de patients et surtout les faibles concentrations et variations de la [ADN<sub>lc</sub>] que ce soit chez les répondeurs ou non répondeurs, il semble difficile de tirer des conclusions sur l'intérêt de ce dernier dans le suivi. Mais sans mutation somatique spécifique pour déterminer une fraction d'allèles mutés, il semble peu spécifique de doser la [ADN<sub>lc</sub>] au cours du suivi de ces patients.

### 3) Limites et perspectives

Notre étude présente plusieurs limites dans l'interprétation des résultats. Tout d'abord, notre faible puissance statistique avec seulement 5 patients ne permet pas de démontrer de corrélation entre l'augmentation des CTC et la progression radiologique dans le suivi des patients métastatiques. Nous avons utilisé le score radiologique de l'OMS, qui a été remplacé dans les études récentes par le score RECIST version 1.1 (78). Ces deux scores ont certes des similitudes mais également des différences. Ils définissent des lésions mesurables et d'autres non mesurables de la même manière, mais le score de l'OMS se base sur le produit des plus grandes longueurs orthogonales tandis que le score RECIST se base sur la somme des diamètres. Le score RECIST définit également cinq lésions cibles qui seront suivies tout au long de l'étude, alors que le score OMS évalue l'ensemble des lésions. Enfin quelques différences sont présentes dans les critères de réponse et de progression, mais l'apparition d'une nouvelle lésion quelle que soit l'évolution des autres est toujours considérée comme une progression. L'étude de Mazumdar *et al.* de 2004 met en évidence des différences de résultat pour un même patient entre les deux classifications (79), pouvant ainsi entraîner un biais dans nos résultats radiologiques. C'est pourquoi, les scanners des patients de notre étude vont être relus par des radiologues expérimentés afin d'établir le score RECIST pour vérifier l'absence de variation dans nos résultats. Compte tenu de l'évaluation radiologique des patients et des similitudes entre les deux scores, la relecture ne devrait pas impacter nos résultats.

De plus, les difficultés rencontrées lors de la mise au point de l'ICC constitue un biais d'interprétation de nos résultats ; il n'est pas possible de vérifier l'origine mélanocytaire des CTC visualisées à la coloration par MGG, or nous avons vu qu'il était possible de trouver des cellules mimant les critères de malignité, comme les cellules endothéliales (60). Il sera nécessaire pour la suite de ces travaux de mettre au point un protocole permettant un marquage ICC efficace de CTC isolées dans nos conditions.

Enfin, les différences significatives entre d'une part les comptes de CTC sur lames *versus* sur lames plus filtres, et d'autre part entre les comptes des deux observateurs et des comptes du même observateur, pourraient être liées en partie aux caractéristiques des patients de notre cohorte. Il serait intéressant de poursuivre l'étude avec une population plus importante et susceptible de bénéficier de cette technique en routine, afin d'évaluer de façon plus précise la reproductibilité de la technique et la nécessité du compte de CTC sur les filtres.

## ***CONCLUSION***

La technique ScreenCell®, avec son coût d'utilisation modéré et ses critères cytologiques de malignité facilement assimilables par les pathologistes, pourrait être adaptée à une utilisation de routine dans un laboratoire de pathologie ; cependant, notre population trop restreinte n'a pas permis de démontrer sa reproductibilité, qui semble pourtant bonne, probablement en raison d'écarts sur des lames de moins bonne qualité. Les critères de malignité ne sont pas totalement spécifiques puisque le patient témoin avait deux cellules mimant des cellules tumorales circulantes. Une étude immunocytochimique serait donc nécessaire pour confirmer l'origine mélanocytaire des cellules répondant aux critères cytologiques de malignité. Nos tests d'immunocytochimie n'ont pas été contributifs probablement du fait du milieu de montage de nos lames. Nous avons mis en évidence des différences significatives entre le compte de cellules tumorales circulantes sur lames seules et le compte sur lames et sur filtres, ce qui peut être un facteur limitant lors d'une utilisation quotidienne. En effet, le comptage des CTC sur filtres est chronophage et nécessite une accommodation permanente, entraînant une importante fatigue oculaire. Une nouvelle étude sur une population plus représentative de la population cible serait nécessaire pour prouver la reproductibilité de la technique et surtout que le compte des CTC sur filtres n'est pas nécessaire en routine. Il faudra également élaborer un nouveau protocole pour réaliser une immunocytochimie qui fonctionne malgré notre milieu de montage.

Dans notre étude préliminaire, les cellules tumorales circulantes semblent être un marqueur de progression des patients métastatiques, avec une augmentation plus précoce que les lésions radiologiques. Cependant, elles restent présentes et en quantité variable chez les patients répondeurs au traitement. De nouveaux travaux sont nécessaires pour déterminer le potentiel métastatique à court terme et à plus long terme de ces cellules tumorales circulantes persistantes chez les patients répondeurs et pour déterminer également leur nature pré-apoptotique, dormante ou agressive.

L'ADN libre circulant, s'il est associé à une mutation somatique tumorale, est lié à l'évolution des lésions radiologiques et est déjà utilisé en pratique courante pour le suivi des patients mutés BRAF. Mais pour les patients non mutés, traités par immunothérapie, il est peu informatif dans notre cohorte, et surtout non spécifique. Les cellules tumorales circulantes

pourraient ainsi être une alternative dans le suivi des patients métastatiques, sans mutation tumorale somatique.

Le Président du jury,

Vu et permis d'imprimer  
Dijon, le  
Le Doyen

Pr. Laurent MARTIN



Pr. M. MAYNADIÉ

## Bibliographie

1. ©Les cancers en France, Les Données, INCa, édition 2015.
2. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin.* 2017 Nov;67(6):472–92.
3. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009 Dec 20;27(36):6199–206.
4. Benelli C, Roscetti E, Dal Pozzo V. Reproducibility of the clinical criteria (ABCDE rule) and dermatoscopic features (7FFM) for the diagnosis of malignant melanoma. *Eur J Dermatol EJD.* 2001 Jun;11(3):234–9.
5. Maley A, Rhodes AR. The ABCDs of melanoma-A complicated morphologic message not intended for the general public. *J Am Acad Dermatol.* 2015 Aug;73(2):e59.
6. Lee ML, Tomsu K, Von Eschen KB. Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. *Melanoma Res.* 2000 Feb;10(1):81–92.
7. Serrone L, Zeuli M, Sega FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2000 Mar;19(1):21–34.
8. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature.* 2002 Jun 27;417(6892):949–54.
9. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with *BRAF* V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011 Jun 30;364(26):2507–16.
10. Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Ribas A, Hogg D, et al. Vemurafenib in patients with *BRAF*V600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Ann Oncol.* 2017 Oct;28(10):2581–7.
11. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med.* 2015 Jan 1;372(1):30–9.
12. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O’Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2011 Jun 30;364(26):2517–26.
13. Larkin J, Minor D, D’Angelo S, Neyns B, Smylie M, Miller WH, et al. Overall Survival in Patients With Advanced Melanoma Who Received Nivolumab Versus Investigator’s Choice Chemotherapy in CheckMate 037: A Randomized, Controlled, Open-Label Phase III Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2018 Feb 1;36(4):383–90.
14. Long GV, Flaherty KT, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, et al. Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic *BRAF* V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2017 Jul 1;28(7):1631–9.



15. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob J-J, Cowey CL, et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2017 05;377(14):1345–56.
16. © *Patients atteints de mélanome de stade III inopérable ou de stade IV* / Société française de dermatologie, septembre 2017.
17. Eggermont AMM, Suci S, Santinami M, Testori A, Kruit WHJ, Marsden J, et al. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet Lond Engl*. 2008 Jul 12;372(9633):117–26.
18. Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, et al. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med*. 2017 09;377(19):1813–23.
19. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med*. 2017 09;377(19):1824–35.
20. Guillot B, Dalac S, Denis M, Dupuy A, Emile JF, De La Fouchardiere A, et al. Actualisation des recommandations de prise en charge du mélanome stade I à III. *Bull Cancer (Paris)*. 2016 Sep;103(9):743–52.
21. Kelderman S, Heemskerk B, van Tinteren H, van den Brom RRH, Hospers GAP, van den Eertwegh AJM, et al. Lactate dehydrogenase as a selection criterion for ipilimumab treatment in metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother CII*. 2014 May;63(5):449–58.
22. Abusaif S, Jradi Z, Held L, Pflugfelder A, Weide B, Meier F, et al. S100B and lactate dehydrogenase as response and progression markers during treatment with vemurafenib in patients with advanced melanoma. *Melanoma Res*. 2013 Oct;23(5):396–401.
23. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948 Feb;142(3–4):241–3.
24. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977 Mar;37(3):646–50.
25. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*. 1998 Jul;17(1):89–97.
26. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998 Apr;62(4):768–75.
27. Long Y, Zhang Y, Gong Y, Sun R, Su L, Lin X, et al. Diagnosis of Sepsis with Cell-free DNA by Next-Generation Sequencing Technology in ICU Patients. *Arch Med Res*. 2016;47(5):365–71.
28. Rodrigues Filho EM, Simon D, Ikuta N, Klován C, Dannebrock FA, Oliveira de Oliveira C, et al. Elevated cell-free plasma DNA level as an independent predictor of mortality in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2014 Oct 1;31(19):1639–46.
29. Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Saiki RK, et al. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*

Res. 1993 Jun 1;53(11):2472–4.

30. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med*. 1996 Sep;2(9):1035–7.
31. Lecomte T, Ceze N, Dorval E, Laurent-Puig P. Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010 Dec;34(12):662–81.
32. Chang GA, Tadepalli JS, Shao Y, Zhang Y, Weiss S, Robinson E, et al. Sensitivity of plasma BRAFmutant and NRASmutant cell-free DNA assays to detect metastatic melanoma in patients with low RECIST scores and non-RECIST disease progression. *Mol Oncol*. 2016 Jan;10(1):157–65.
33. Gray ES, Rizos H, Reid AL, Boyd SC, Pereira MR, Lo J, et al. Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. *Oncotarget*. 2015 Dec 8;6(39):42008–18.
34. Keller L, Guibert N, Casanova A, Brayer S, Farella M, Delaunay M, et al. Early Circulating Tumour DNA Variations Predict Tumour Response in Melanoma Patients Treated with Immunotherapy. *Acta Derm Venereol*. 2019 Feb 1;99(2):206–10.
35. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Med J Aust*. 1869;14:146–7.
36. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Oct 15;10(20):6897–904.
37. De Giorgi V, Pinzani P, Salvianti F, Grazzini M, Orlando C, Lotti T, et al. Circulating benign nevus cells detected by ISET technique: warning for melanoma molecular diagnosis. *Arch Dermatol*. 2010 Oct;146(10):1120–4.
38. Wheeler SE, Clark AM, Taylor DP, Young CL, Pillai VC, Stolz DB, et al. Spontaneous dormancy of metastatic breast cancer cells in an all human liver microphysiologic system. *Br J Cancer*. 2014 Dec 9;111(12):2342–50.
39. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol*. 2013 Jun;31(6):539–44.
40. Mellado B, Colomer D, Castel T, Muñoz M, Carballo E, Galán M, et al. Detection of circulating neoplastic cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in malignant melanoma: association with clinical stage and prognosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1996 Jul;14(7):2091–7.
41. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Oct 1;14(19):6302–9.
42. Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Fléjou JF, et al. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011 Feb 15;17(4):827–35.
43. Li J, Fu W, Zhang W, Li P. High Number of Circulating Tumor Cells Predicts Poor Survival of Cutaneous Melanoma Patients in China. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2018 Jan

16;24:324–31.

44. Hong X, Sullivan RJ, Kalinich M, Kwan TT, Giobbie-Hurder A, Pan S, et al. Molecular signatures of circulating melanoma cells for monitoring early response to immune checkpoint therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 06;115(10):2467–72.
45. Fei F, Du Y, Di G, Wu J, Shao Z. Are changes in circulating tumor cell (CTC) count associated with the response to neoadjuvant chemotherapy in local advanced breast cancer? A meta-analysis. *Oncol Res Treat*. 2014;37(5):250–4.
46. Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet Lond Engl*. 1991 Nov 16;338(8777):1227–9.
47. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 Mar 1;23(7):1420–30.
48. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Jul 1;26(19):3213–21.
49. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Oct 1;14(19):6302–9.
50. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer*. 1981 Jan 1;47(1):207–14.
51. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Aug 19;351(8):781–91.
52. Bian L, Liu Y, Wang T, Zhang S, Shao Z, Tong Z, et al. Prediction value for dynamic changes of circulating tumor cell in therapeutic response and prognosis of Chinese metastatic breast cancer patients. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2014 Jan 28;94(4):265–8.
53. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, Raja R, Fine BM, Hughes BGM, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 Apr 15;18(8):2391–401.
54. Alix-Panabières C, Mader S, Pantel K. Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *J Mol Med Berl Ger*. 2017;95(2):133–42.
55. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, Wechsler J, Jänne PA, Kuang Y, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res*. 2011 Feb;31(2):427–41.
56. Bai M, Zou B, Wang Z, Li P, Wang H, Ou Y, et al. Comparison of two detection systems for circulating tumor cells among patients with renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol*. 2018 Oct;50(10):1801–9.
57. De Giorgi V, Pinzani P, Salvianti F, Panelos J, Paglierani M, Janowska A, et al. Application of a Filtration- and Isolation-by-Size Technique for the Detection of Circulating Tumor Cells in

Cutaneous Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2010 Oct 1;130(10):2440–7.

58. Francart M-E, Lambert J, Vanwysberghe AM, Thompson EW, Bourcy M, Polette M, et al. Epithelial-mesenchymal plasticity and circulating tumor cells: Travel companions to metastases. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 2018;247(3):432–50.
59. Kalialis LV, Drzewiecki KT, Klyver H. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res*. 2009 Oct;19(5):275–82.
60. El-Heliebi A, Kroneis T, Zöhrer E, Haybaeck J, Fischereder K, Kampel-Kettner K, et al. Are morphological criteria sufficient for the identification of circulating tumor cells in renal cancer? *J Transl Med*. 2013 Sep 17;11:214.
61. Hofman V, Ilie M, Long-Mira E, Giaccherio 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*. 2013 May;133(5):1378–81.
62. Adams DL, Martin SS, Alpaugh RK, Charpentier M, Tsai S, Bergan RC, et al. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 4;111(9):3514–9.
63. Adams DL, Adams DK, Alpaugh RK, Cristofanilli M, Martin SS, Chumsri S, et al. Circulating Cancer-Associated Macrophage-Like Cells Differentiate Malignant Breast Cancer and Benign Breast Conditions. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2016;25(7):1037–42.
64. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 2014 Aug 28;158(5):1110–22.
65. Mu Z, Wang C, Ye Z, Austin L, Civan J, Hyslop T, et al. Prospective assessment of the prognostic value of circulating tumor cells and their clusters in patients with advanced-stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Dec;154(3):563–71.
66. Sakaizawa K, Goto Y, Kiniwa Y, Uchiyama A, Harada K, Shimada S, et al. Mutation analysis of *BRAF* and *KIT* in circulating melanoma cells at the single cell level. *Br J Cancer*. 2012 Feb 28;106(5):939–46.
67. Botteri E, Sandri MT, Bagnardi V, Munzone E, Zorzino L, Rotmensz N, et al. Modeling the relationship between circulating tumour cells number and prognosis of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jul;122(1):211–7.
68. Coman DR, deLONG RP, MccUTCHEON M. Studies on the mechanisms of metastasis; the distribution of tumors in various organs in relation to the distribution of arterial emboli. *Cancer Res*. 1951 Aug;11(8):648–51.
69. Rossi E, Basso U, Celadin R, Zilio F, Pucciarelli S, Aieta M, et al. M30 neoepitope expression in epithelial cancer: quantification of apoptosis in circulating tumor cells by CellSearch analysis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2010 Nov 1;16(21):5233–43.
70. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*. 1998 Sep;153(3):865–73.

71. Sanmamed MF, Fernández-Landázuri S, Rodríguez C, Zárata R, Lozano MD, Zubiri L, et al. Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin Chem*. 2015 Jan;61(1):297–304.
72. Shinozaki M, O'Day SJ, Kitago M, Amersi F, Kuo C, Kim J, et al. Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2007 Apr 1;13(7):2068–74.
73. Ashida A, Sakaizawa K, Uhara H, Okuyama R. Circulating Tumour DNA for Monitoring Treatment Response to Anti-PD-1 Immunotherapy in Melanoma Patients. *Acta Derm Venereol*. 2017 Nov 15;97(10):1212–8.
74. Iijima Y, Hirotsu Y, Amemiya K, Ooka Y, Mochizuki H, Oyama T, et al. Very early response of circulating tumour-derived DNA in plasma predicts efficacy of nivolumab treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2017;86:349–57.
75. Raja R, Kuziora M, Brohawn PZ, Higgs BW, Gupta A, Dennis PA, et al. Early Reduction in ctDNA Predicts Survival in Patients with Lung and Bladder Cancer Treated with Durvalumab. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2018 Dec 15;24(24):6212–22.
76. Goldberg SB, Narayan A, Kole AJ, Decker RH, Teysir J, Carriero NJ, et al. Early Assessment of Lung Cancer Immunotherapy Response via Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2018 Apr 15;24(8):1872–80.
77. Anagnostou V, Forde PM, White JR, Niknafs N, Hruban C, Naidoo J, et al. Dynamics of Tumor and Immune Responses during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*. 2019 Mar 15;79(6):1214–25.
78. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2009 Jan;45(2):228–47.
79. Mazumdar M, Smith A, Schwartz LH. A statistical simulation study finds discordance between WHO criteria and RECIST guideline. *J Clin Epidemiol*. 2004 Apr;57(4):358–65.

## Annexes

### Annexe 1. Stades du mélanome selon la dernière classification AJCC 2018 (2)

AJCC Pathological (pTNM) Prognostic Stage Groups<sup>a</sup>

WHEN T IS...	AND N IS...	AND M IS...	THEN THE PATHOLOGICAL STAGE GROUP IS...
Tis	N0 <sup>b</sup>	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IA
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T0	N1b, N1c	M0	IIB
T0	N2b, N2c, N3b or N3c	M0	IIC
T1a/b-T2a	N1a or N2a	M0	IIIA
T1a/b-T2a	N1b/c or N2b	M0	IIB
T2b/T3a	N1a-N2b	M0	IIB
T1a-T3a	N2c or N3a/b/c	M0	IIC
T3b/T4a	Any N ≥N1	M0	IIC
T4b	N1a-N2c	M0	IIC
T4b	N3a/b/c	M0	IIID
Any T, Tis	Any N	M1	IV

<sup>a</sup>Used with permission of the American Joint Committee on Cancer (AJCC), Chicago, Illinois. The original and primary source for this information is the AJCC Cancer Staging Manual, eighth edition (2017) published by Springer International Publishing (Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, et al. Melanoma of the skin. In: Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al, eds. AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. New York: Springer International Publishing; 2017:563–585<sup>4</sup>).

<sup>b</sup>Pathological stage 0 (melanoma in situ) and T1 do not require pathological evaluation of lymph nodes to complete pathological staging; use clinical N information to assign their pathological stage.

**Annexe 2.** Stratégies thérapeutiques de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> ligne du mélanome avancé stade III inopérable et stade IV.

© TRAITEMENT DU MÉLANOME AVANCÉ, Fiche bon usage du médicament, collection Outils pour la pratique, Institut national du cancer/Agence de la biomédecine, septembre 2018.

TABLEAU 1 TRAITEMENTS RECOMMANDÉS EN 1 <sup>ÈRE</sup> ET 2 <sup>ÈME</sup> LIGNE DU MÉLANOME DE STADE III INOPERABLE ET IV		
	Tumeur BRAF V600 sauvage	Tumeur BRAF V600 muté
1 <sup>ÈRE</sup> LIGNE DE TRAITEMENT	<b>Traitement systémique hors métastase cérébrale</b>	
	Un <b>anti-PD-1 (nivolumab ou pembrolizumab) est recommandé</b> [NP A]. L'association nivolumab-ipilimumab peut être proposée aux patients en bon état général, sans métastase cérébrale active ni comorbidités notables [voir page 4].	Une <b>association anti-BRAF/anti-MEK</b> (vemurafenib/cobimetinib OU dabrafenib/trametinib) <b>est recommandée</b> [NP A].  En cas de maladie d'évolution lente et de masse tumorale limitée, un anti-PD-1 (nivolumab ou pembrolizumab) peut-être proposé [Avis d'experts].
	<b>En cas de métastase cérébrale unique ou peu nombreuses (&lt;5)</b>	
	<b>Un traitement local « destructeur » (chirurgie ou stéréotaxie) est à privilégier</b>	
	<i>Si le traitement local est incomplet :</i> Ajout d'un <b>anti-PD-1 (nivolumab ou pembrolizumab) à privilégier</b> [NP D]	<i>Si le traitement local est incomplet :</i> Ajout d'une <b>bithérapie ciblée (association anti-BRAF/anti-MEK) à privilégier</b> [NP B2].
	<b>En cas de métastases cérébrales multiples (+/- métastases extra-cérébrales)</b>	
Un <b>anti-PD-1 (nivolumab ou pembrolizumab) est à privilégier</b> [NP D].	Une <b>association anti-BRAF/anti-MEK</b> (vemurafenib/cobimetinib OU dabrafenib/trametinib) <b>est à privilégier</b> [NP B2].	
2 <sup>ÈME</sup> LIGNE DE TRAITEMENT	<b>Traitement systémique hors métastase cérébrale</b>	
	L' <b>ipilimumab (anti-CTLA-4) est recommandé</b> [NP B2].	Un <b>anti-PD-1 (nivolumab ou pembrolizumab) est recommandé</b> aux posologies de l'AMM [NP C]. Si le traitement de 1 <sup>ère</sup> ligne était un anti-PD-1, une combinaison anti-BRAF/anti-MEK sera proposée.
	<b>En cas de métastase cérébrale unique ou multiple</b>	
Situations palliatives et/ou symptomatiques : Prise en soins globale : soins palliatifs, radiothérapie pan-encéphalique à discuter.		
NP : niveau de preuve Les traitements cités doivent être prescrits en respectant les recommandations posologiques validées dans les RCP d'AMM.		

**Annexe 3.** Tableau de comparaison du nombre de CTC par lame et du nombre de CTC par lame additionné au nombre de CTC sur les filtres correspondants.

*Technique de référence : lames + filtres*

*M(+)* : moyenne des CTC lames et filtres des trois filtrations d'un patient à un point de suivi

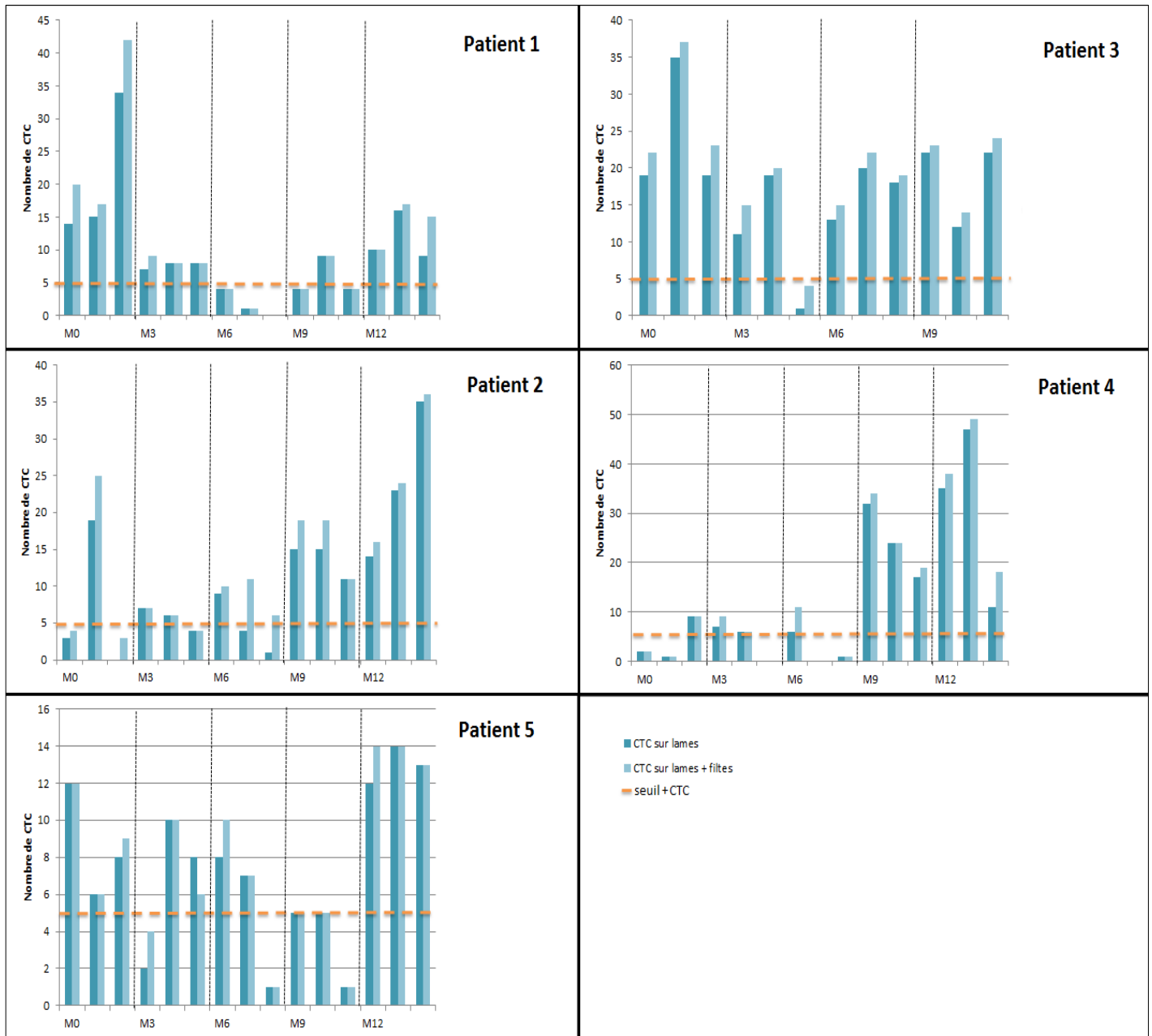
*CV(+)* : coefficient de variation (erreur type divisée par m(+))

	Patients	CTC lames	CTC lames + filtres	Différence	Erreur type	m (+)	CV(+)
M0	1	14	20	6	1,8	26,3	6,7%
		15	17	2			
		34	42	8			
	2	3	4	1	1,5	10,7	13,6%
		19	25	6			
		0	3	3			
	3	19	22	3	0,6	27,3	2,1%
		35	37	2			
		19	23	4			
	4	2	2	0	0,0	4,0	0,0%
		1	1	0			
		9	9	0			
	5	12	12	0	0,3	9,0	3,7%
		6	6	0			
		8	9	1			
						13,6%	Maximum
M3	1	7	9	2	0,7	8,3	8,0%
		8	8	0			
		8	8	0			
	2	7	7	0	0,0	5,7	0,0%
		6	6	0			
		4	4	0			
	3	11	15	4	0,9	13,0	6,8%
		19	20	1			
		1	4	3			
	4	7	9	2	0,8	7,5	10,9%
		6	6	0			
	5	2	4	2	0,7	7,3	9,1%
		10	10	0			
		6	8	2			
						10,9%	Maximum
M6	1	4	4	0	0,0	1,7	0,0%
		1	1	0			
		0	0	0			
	2	9	10	1	1,8	9,0	19,6%
		4	11	7			
		1	6	5			
	3	13	15	2	0,3	18,7	1,8%
		20	22	2			
		18	19	1			
	4	6	11	5	1,7	4,0	41,7%
		0	0	0			
		1	1	0			
	5	8	10	2	0,7	6,0	11,1%
		7	7	0			
		1	1	0			
						41,7%	Maximum



	Patients	CTC lames	CTC lames + filtres	Différence	Erreur type	m (+)	CV(+)
<i>M9</i>	1	4	4	0	0,0	5,7	0,0%
		9	9	0			
		4	4	0			
	2	15	19	4	1,3	16,3	8,2%
		15	19	4			
		11	11	0			
	3	22	23	1	0,3	20,3	1,6%
		12	14	2			
		22	24	2			
	4	32	34	2	0,7	25,7	2,6%
		24	24	0			
		17	19	2			
5	5	5	0	0,0	3,7	0,0%	
	5	5	0				
	1	1	0				
						8,2%	Maximum
<i>M12</i>	1	10	10	0	1,9	14,0	13,3%
		16	17	1			
		9	15	6			
	2	14	16	2	0,3	25,3	1,3%
		23	24	1			
		35	36	1			
	4	35	38	3	1,5	35,0	4,4%
		47	49	2			
		11	18	7			
	5	12	14	2	0,7	13,7	4,9%
		14	14	0			
		13	13	0			
						13,3%	Maximum

**Annexe 4.** Comparaison du compte de CTC sur lame versus sur lames + filtre pour chaque filtration, par rapport au seuil de positivité (5 CTC / filtration).



**Annexe 5.** Tableau de comparaison des moyennes de CTC par filtration et les erreurs types associées des deux observateurs, sur l'ensemble des points de suivi des cinq patients

Moyenne (O1+O2) : moyenne des comptes de CTC par l'observateur 1 et l'observateur 2

CV : coefficient de variation (erreur type sur moyenne (O1+O2))

	Patients	Moyenne CTC / filtration de l'observateur 1	Moyenne CTC / filtration de l'observateur 2	Erreur type	Moyenne (O1+O2)	CV
<i>M0</i>	1	21,0	19,7	0,7	20,3	3,3%
	2	7,3	7,7	0,2	7,5	2,2%
	3	24,3	24,0	0,2	24,2	0,7%
	4	4,0	4,0	0	4,0	0,0%
	5	8,7	9,3	0,3	9,0	3,7%
					<b>3,7%</b>	Maximum
<i>M3</i>	1	7,7	9,0	0,7	8,3	8,0%
	2	5,7	6,3	0,3	6,0	5,6%
	3	10,3	10,3	0,0	10,3	0,0%
	4	6,5	7,5	0,5	7,0	7,1%
	5	6,7	5,0	0,8	5,8	14,3%
					<b>14,3%</b>	Maximum
<i>M6</i>	1	1,7	1,7	0,0	1,7	0,0%
	2	4,7	5,3	0,3	5,0	6,7%
	3	17,0	16,7	0,2	16,8	1,0%
	4	2,3	1,7	0,3	2,0	16,7%
	5	5,3	5,3	0,0	5,3	0,0%
					<b>16,7%</b>	Maximum
<i>M9</i>	1	5,7	5,0	0,3	5,3	6,2%
	2	13,7	12,3	0,7	13,0	5,1%
	3	18,7	19,3	0,3	19,0	1,8%
	4	24,3	25,3	0,5	24,8	2,0%
	5	3,7	2,7	0,5	3,2	15,8%
					<b>15,8%</b>	Maximum
<i>M12</i>	1	11,7	13,3	0,8	12,5	6,7%
	2	24,0	26,3	1,2	25,2	4,6%
	3					
	4	31,0	34,7	1,8	32,8	5,6%
	5	13,0	11,0	1,0	12,0	8,3%
					<b>8,3%</b>	Maximum

**Annexe 6.** Tableau de comparaison des moyennes de CTC par filtration et les erreurs types associées des deux comptes d'un même observateur, sur l'ensemble des points de suivi des cinq patients  
*Moyenne (initial+M1) : moyenne des comptes de CTC par l'observateur 1 initial et à 1 mois*  
*CV : coefficient de variation (erreur type sur moyenne (initial+M1))*

	Patients	Moyenne CTC / filtration du compte initial	Moyenne CTC / filtration du compte à 1 mois	Erreur type	Moyenne (initial+M1)	Coefficient de variation	
<i>M0</i>	1	21,0	24,3	1,7	22,7	7,4%	
	2	7,3	8,0	0,3	7,7	4,3%	
	3	24,3	26,0	0,8	25,2	3,3%	
	4	4,0	4,7	0,3	4,3	7,7%	
	5	8,7	9,7	0,5	9,2	5,5%	
						<b>7,7%</b>	Maximum
<i>M3</i>	1	7,7	8,7	0,5	8,2	6,1%	
	2	5,7	6,7	0,5	6,2	8,1%	
	3	10,3	11,3	0,5	10,8	4,6%	
	4	6,5	7,5	0,5	7,0	7,1%	
	5	6,7	6,3	0,2	6,5	2,6%	
						<b>8,1%</b>	Maximum
<i>M6</i>	1	1,7	2,0	0,2	1,8	9,1%	
	2	4,7	6,0	0,7	5,3	12,5%	
	3	17,0	18,0	0,5	17,5	2,9%	
	4	2,3	2,7	0,2	2,5	6,7%	
	5	5,3	6,3	0,5	5,8	8,6%	
						<b>12,5%</b>	Maximum
<i>M9</i>	1	5,7	5,3	0,2	5,5	3,0%	
	2	13,7	13,3	0,2	13,5	1,2%	
	3	18,7	19,7	0,5	19,2	2,6%	
	4	24,3	25,3	0,5	24,8	2,0%	
	5	3,7	4,0	0,2	3,8	4,3%	
						<b>4,3%</b>	Maximum
<i>M12</i>	1	11,7	12,7	0,5	12,2	4,1%	
	2	24,0	23,7	0,2	23,8	0,7%	
	3						
	4	31,0	34,7	1,8	32,8	5,6%	
	5	13,0	12,3	0,3	12,7	2,6%	
						<b>5,6%</b>	Maximum

1 <sup>ER</sup> AUTEUR	JOURNAL (ANNEE)	N	CANCER	TRAITEMENT	ADN CIRCULANT	TECHNIQUE	RESULTATS
<b>SHINOZAKI (72)</b>	Clinical Cancer Research (2009)	103	Mélanome	Immunothérapie (SP)	Mutation BRAF V600E circulante dans le serum (BRAFsmt)	RT-PCR	BRAFsmt détectée chez 10% des patients répondeurs et 70% des non répondeurs et associée à une plus mauvaise OS (p=0,039)
<b>KELLER (34)</b>	Acta Dermato-Venereologica (2019)	16	Mélanome	Immunothérapie (SP)	Quantifications des mutations BRAF et NRAS dans le plasma (ADNtc)	dPCR	Variation de l'ADNtc en miroir avec la réponse tumorale (p=0,034) ; l'augmentation de l'ADNtc détecte une progression tumorale avec une spécificité de 100% et est liée à une PFS plus court (p=0,001)
<b>ASHIDA (73)</b>	Acta Dermato-Venereologica (2017)	5	Mélanome	Anti-PD1	Quantifications des mutations BRAF et NRAS dans le plasma (ADNtc)	dPCR	3 patients répondeurs, diminution de la quantité d'ADNtc dans les 2 à 4 semaines ; les 2 non répondeurs, absence de diminution après l'initiation du traitement.
<b>IJIMA (74)</b>	European Journal of cancer (2017)	14	CBNPC	nivolumab	Quantifications de mutations somatiques spécifiques (ADNtc) dans le plasma : fréquence allélique (FA)	SP	Présence d'ADNtc dans le plasma corrélé à un volume tumoral élevé (p=0,02). Haut degré de correspondance entre la diminution de la FA de l'ADNtc et la réponse durable après deux semaines.
<b>RAJA (75)</b>	Clinical Cancer Research (2018)	28	CBNPC	durvalumab	Fréquence de variants alléliques (FA) de mutations somatiques de 73 gènes (ADNtc)	SP	Les variations de la FA précèdent les réponses radiographiques. Réduction à 6 semaines de la FA significativement associée à une plus grande réduction du volume tumoral avec OS et PFS plus longues.
<b>GOLDBERG (76)</b>	Clinical Cancer Research (2018)	28	CBNPC	Immunothérapie (SP)	Fréquence allélique de mutations somatiques dans le plasma (ADNtc)	NGS	Forte relation entre variations d'ADNtc et réponse radiologique (Cohen's kappa 0,753). Délai médian avant la réponse initiale chez les patients répondeurs plus court avec ADNtc qu'avec l'imagerie. Diminution ADNtc associée à des PFS (p=0,03) et OS (p=0,007) supérieures.
<b>ANAGNOSTOU (77)</b>	Cancer Research (2019)	24	CBNPC	Immunothérapie (SP)	Quantifications de mutations somatiques spécifiques (ADNtc) dans le plasma	NGS	Réponse clinique associée à une réduction complète de l'ADNtc, mais absence de variation de l'ADNtc si pas de réponse clinique. Si échappement au traitement, recrudescence de l'ADNtc. Absence de réponse moléculaire associée à des PFS et OS plus courte en comparaison avec le groupe répondeur (p=0,007 et p=0,02)

**Annexe 7.** Tableau récapitulatif des 7 études s'étant intéressées à l'évolution de l'ADN tumoral circulant en fonction de la réponse tumorale sous immunothérapie.

(CBNPC : cancer bronchique non à petites cellules ; SP : sans précision ; ADNtc : ADN tumoral circulant ; RT-PCR : real time polymerase chain reaction ; dd-PCR : droplet digital polymerase chain reaction ; NGS : next generation sequencing ; OS : survie globale ; PFS : survie sans progression ; FA : fréquence allélique)

**TITRE DE LA THESE : Apport de la recherche de cellules tumorales circulantes (technique ScreenCell®), couplées à l'ADN libre circulant pour le suivi des patients atteints de mélanome métastatique**

**AUTEUR : Marine BADRIGNANS**

**RESUME :**

**Introduction :** La survie à 5 ans du mélanome métastatique est de 18%. Les nouvelles thérapies l'ont amélioré, allongeant le suivi. La biopsie liquide, avec la concentration d'ADN libre circulant ([ADNlc]) et les cellules tumorales circulantes (CTC), pourrait évaluer l'efficacité thérapeutique.

**Objectif :** Notre étude a pour but d'évaluer la faisabilité d'implémenter la technique ScreenCell® dans un laboratoire de pathologie en routine, et de déterminer si la variation du nombre de CTC est corrélée à la réponse thérapeutique, au même titre que la [ADNlc].

**Matériel et méthodes :** Cinq patients avec un mélanome métastatique ont été inclus à l'initiation de leur thérapie. Ils ont bénéficié tous les 3 mois d'un suivi clinique, radiologique, et d'une biopsie liquide (quantification de l'ADNlc et des CTC (ScreenCell®)).

**Résultats :** Les critères de CTC étaient facilement identifiables avec  $0,8 \pm 0,9$  cellule de malignité incertaine par lame. Malgré  $r^2=98,19\%$ , il avait une différence inter-observateur significative (pente : 0,93, IC95% [0,87 ; 0,98]), de même pour la différence intra-observateur avec  $r^2=98,98\%$  (pente : 0,93, IC95% [0,89 ; 0,98]). L'évolution des CTC précédait les lésions radiologiques chez les patients en progression. Elles restaient positives et variables chez les patients répondeurs. La [ADNlc] suivait l'évolution radiologique seulement pour le patient muté BRAF.

**Conclusions :** La technique ScreenCell® repose sur des critères cytologiques de malignité facilement identifiables. L'absence de reproductibilité semble liée aux caractéristiques des patients. En l'absence de mutation BRAF, les CTC pourraient être un marqueur de progression tumorale, contrairement à la [ADNlc].

**MOTS-CLES :**

MELANOME

CELLULES TUMORALES CIRCULANTES

SCREENCELL®

ADN LIBRE CIRCULANT