

ANNEE 2019

N°

**INTÉRÊT DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT ANALYSÉ PAR PCR DIGITALE :
ÉTUDE RÉTROSPECTIVE DE 35 PATIENTS ATTEINTS DE MÉLANOME MÉTASTATIQUE MUTÉ BRAF**

THESE
Présentée

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

et soutenue publiquement le 23 septembre 2019

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

Par Elsa MARION

Né(e) le 31 décembre 1991

A Bourgoin-Jallieu (38)

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, plagiat, 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°

**INTÉRÊT DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT ANALYSÉ PAR PCR DIGITALE :
ÉTUDE RÉTROSPECTIVE DE 35 PATIENTS ATTEINTS DE MÉLANOME MÉTASTATIQUE MUTÉ BRAF**

THESE
Présentée

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

et soutenue publiquement le 23 septembre 2019

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par MARION Elsa

Né(e) le 31 décembre 1991

à Bourgoin-Jallieu (38)

Année Universitaire 2019-2020
au 1^{er} **Septembre 2019**

Doyen :
Assesseurs :

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

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

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

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

PROFESSEURS EN SURNOMBRE

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

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

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

PROFESSEURS EMERITES

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

PROFESSEURS DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

M.	Jean-Noël	BEIS	Médecine Générale
----	-----------	-------------	-------------------

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme	Katia	MAZALOVIC	Médecine Générale
-----	-------	------------------	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Didier	CANNET	Médecine Générale
M.	François	MORLON	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

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

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

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

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Marianne	ZELLER	Physiologie
-----	----------	---------------	-------------

PROFESSEURS AGREGES de L'ENSEIGNEMENT SECONDAIRE

Mme	Marceline	EVRARD	Anglais
Mme	Lucie	MAILLARD	Anglais

PROFESSEURS CERTIFIES

Mme	Anaïs	CARNET	Anglais
M.	Philippe	DE LA GRANGE	Anglais
Mme	Virginie	ROUXEL	Anglais (Pharmacie)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

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

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

M.	Philippe	FAGNONI	Pharmacie clinique
M.	Frédéric	LIRUSSI	Toxicologie
M.	Marc	SAUTOUR	Botanique et cryptogamie
M.	Antonin	SCHMITT	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 Laurent MARTIN, CHU Dijon

Membres :

Professeur Pierre VABRES, CHU Dijon

Professeur Mary CALLANAN, CHU Dijon

Docteur Marie-Hélène AUBRIOT-LORTON, CHU Dijon

Directeur de thèse :

Docteur Géraldine JEUDY, CHU Dijon

Remerciements

Au président du jury, Monsieur le Professeur Laurent MARTIN. Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'être le président du jury de cette thèse et de m'avoir accueillie dans votre service pendant six mois. Merci également pour votre gentillesse et votre disponibilité.

A Monsieur le Professeur Pierre VABRES. Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury, ainsi que pour ces années d'internat où vous m'avez enseigné les étapes du raisonnement diagnostique dermatologique et où vous m'avez initié à la dermatologie pédiatrique. Votre présence dans ce jury me fait honneur.

A Madame la Professeur Mary CALLANAN. Vous me faites l'honneur d'être juge de mon travail. Veuillez recevoir l'expression de ma respectueuse gratitude.

A ma directrice de thèse, Docteur Géraldine JEUDY, je te remercie du fond du cœur de m'avoir accompagnée depuis le début de mon internat jusqu'à ce travail de thèse. Merci d'avoir consacré du temps à mon travail, toujours dans la bonne humeur et dans la bienveillance, ceci a été une réelle source de motivation pour moi. Je t'en suis infiniment reconnaissante.

A Madame le Docteur Marie-Hélène AUBRIOT-LORTON, je vous remercie d'avoir accepté d'être juge de mon travail. Les six mois passés dans votre service ont été extrêmement formateurs et m'ont permis de découvrir la spécialité passionnante qu'est la dermatopathologie. Je vous remercie pour votre pédagogie, votre gentillesse et votre écoute.

A Benjamin TOURNIER, merci de m'avoir aidé dans mon travail depuis le début et d'avoir consacré du temps à mes questions (multiples !). Tu as été d'un grand soutien et je t'en suis extrêmement reconnaissante. Merci également à Caroline CHAPUSOT et aux techniciennes pour m'avoir fait découvrir la biologie moléculaire.

A toute l'équipe médicale du service de Dermatologie de Dijon,

Sophie, merci pour votre bienveillance, votre pédagogie et votre enthousiasme, depuis le début de mon internat jusqu'à aujourd'hui.

Evelyne, merci pour votre gentillesse et les enseignements que vous m'avez dispensé toujours avec plaisir.

Bertille, merci pour ta pédagogie, ta disponibilité, pour les nombreux cas intéressants que l'on a vus ensemble, tu m'as beaucoup appris tout au long de mon internat.

Maud et Jean-Charles, merci pour votre soutien !

A l'équipe paramédical du service de Dermatologie de Dijon, et notamment Angeline, Pascaline, Hélène, Mélanie, Nadège, Nadia, Christelle, Aurélie ... Cela a été un réel plaisir de travailler avec vous ! Merci également à la dream-team des secrétaires !

Aux services qui m'ont accueillie au cours de mon internat : le service de dermatologie du CH de Macon, merci aux super-infirmières et aux Dr Mauduit et Dr Sarret pour leur patience, leur confiance, leur pédagogie et m'avoir fait aimer cette belle spécialité. Le service d'endocrinologie du CHU, ou comment allier travail et bonne humeur, merci aux médecins tous gentils et pédagogues, merci aux infirmières pour leur soutien et leurs sourires, c'était un semestre très formateur. Le service de maladies infectieuses du CH de Macon, merci à Joséphine et Annabelle qui m'ont accueillie avec bienveillance, ainsi qu'à l'équipe paramédicale.

A mes parents, pour votre amour inconditionnel et votre soutien sans faille, c'est grâce à vous que je suis là, et j'ai beaucoup de chance de vous avoir.

Maman, merci pour ton amour, merci de m'avoir portée (et supportée) toute ma vie. Merci surtout pour ton exigence et ta rigueur, qui m'ont aidée à accomplir ce que je voulais et qui me permettent d'avoir la vie que je souhaite, chose dont je ne me rendais peut-être pas compte quand j'étais plus jeune. C'est grâce à cela que je peux m'épanouir aujourd'hui. Je t'aime infiniment mamounette. Merci également à Joël de faire partie de ta vie et de te rendre heureuse.

Papa, merci pour ton amour et ta bonne humeur, merci pour l'exemple que tu es avec ta force mentale (et physique bien sûr !) et ta super philosophie de vie. Je t'aime et je suis fière de la personne que tu es. Tu m'as toujours soutenue quoi qu'il arrive et j'ai toujours pu compter sur toi. Merci également à Anne-Laure de te rendre heureux, à Mathissou pour son énergie et ses blagues, à notre petite Romane pour son espièglerie et son rire !!

A Titi et Clacla, mes frangins adorés, quand je repense à toutes ces après-midis où on passait notre temps à se disputer je me dis que cette époque est bien révolue ! Désormais, les instants avec vous sont précieux et on passe toujours de supers moments. Je suis trop fière de vous deux, de l'homme et la femme que vous êtes devenus. Sachez que vous pourrez toujours compter sur moi et qu'en tant que grande sœur je vous protégerais toujours autant que je le peux 😊 je vous aime mes ptits loups.

A ma Mamie, qui m'a toujours témoigné un amour inconditionnel, j'ai énormément de chance de t'avoir maminette. Pour ta culture espagnole (et ta délicieuse paëlla !), tes romans cultes, tes anecdotes, ton fameux « magazine de la santé » ... Tu es une belle personne et j'ai beaucoup à apprendre de toi. Merci d'être là, je t'aime de tout mon cœur.

A mes grands-parents : Papi Sisa, Papi Marion, Mamie Marion. Comme j'aurais aimé que vous soyez là aujourd'hui, vous me manquez énormément et penser à vous me brise le cœur à chaque fois. Je ne vous oublierai jamais. J'espère que vous êtes fiers.

A l'ensemble de ma famille :

Pascal, Isabelle, Hugo et Chloé, merci pour votre soutien, votre bienveillance et vos sourires, c'est toujours un plaisir de passer du temps avec vous autour de grands repas de famille !

Anne-Marie, Audrey et Tanguy, merci pour votre bonne humeur ! Tata merci pour tes blagues qui ont toujours le don de me détendre même dans les situations difficiles. Audrey, merci pour toutes ces années d'adolescence passées à rire et à s'inventer des vies extraordinaires... cela me rend nostalgique

José, merci pour ton enthousiasme, on se voit peu mais c'est toujours un plaisir de partager des moments avec toi !

Antonio et Joana, merci pour tous ces supers souvenirs de vacances en Espagne (le bonheur)

A mes amis de toujours. Alice, Paulo, François, depuis notre rencontre à l'âge de 8 ans sur les bancs de l'athlé à aujourd'hui ! Vous êtes tous les 3 des personnes en or, j'ai beaucoup de chance de vous avoir rencontré et je suis heureuse de vous compter encore parmi mes amis. Alice, ma lys, ma grosse, pour tous ces petits mots laissés dans nos cahiers au collège, ces folles soirées quand nous étions ado (du César Palace au Bal de Maubec haha), ces journées passées à « réviser » le brevet ou le bac... La distance de l'internat était difficile mais j'espère qu'on pourra se voir plus souvent à partir de novembre ! Paul, merci pour l'orga des week-ends retrouvailles ces dernières années qui nous ont permis de rester proches malgré la distance, et encore félicitations pour la récente nouvelle, je te souhaite tout le bonheur du monde, tu le mérites. François, merci pour ton soutien sans faille et toutes ces supers vacances à Entraigues, entre rando et génépi, où le mur des lamentations est né !!

Astrid, mon petit talus, toujours le mot pour rire, merci pour toutes ces années d'amitié, à échanger les séries et les chansons, à rager sur les garçons ou partager notre vision du monde en buvant (parfois) trop d'alcool.. Je suis trop heureuse de savoir qu'on sera de nouveau dans la même ville bientôt !

A mes amis de l'externat, qui m'ont accompagnée pendant toutes ces folles années à la boîte.

Mélissa, ma mélo, merci pour ton amitié authentique. Pour toutes ces aprèm à regarder Grey's Anatomy dans ta chambre, parfois avec des pizzas (Domino's !!), toutes ces Foy's floues où on débrieffait nos bêtises le lendemain devant un macdo, toutes ces fois où tu m'as soutenue lorsque j'avais l'impression de m'écrouler... Tu es un pilier, un rayon de soleil et je suis vraiment heureuse de t'avoir rencontrée. J'espère qu'on se verra plus souvent après mon internat !

Charlotte, ma Chacha, pour ta générosité, ton rire, ton soutien pendant toutes ces années... Tu es une belle personne et c'est toujours un plaisir de te voir.

Sophie, pour tes conseils avisés, notre soutien mutuel pendant la préparation des ECN, ta gentillesse, ces we dépayants à Saint Jean de Luz... Je suis vraiment heureuse de te compter parmi mes amies.

Ammar, pour toutes ces soirées à refaire le monde ou à parler de mangas, pour notre complicité qui est intacte malgré la distance, j'espère qu'on réussira à se voir plus souvent dans les années qui viennent.

Kawtar, pour ta bonne humeur et ta spontanéité, ton écoute ou ton fameux couscous ! Tu me manques !

Et aussi, Ségo, Anne-So, Market, Charlotte, Pierro... vous avez rendu ma vie à l'Ecole plus belle et plus fun !

A mes copains d'internat : Merci aux WAGs : A2, Lucile, Amélie, Charline, Sarou, qui ont rendu mon séjour dijonnais plus agréable, grâce à nos petits goûters ou verres en soirée. Adeline, entre nos semestres mâconnais et nos semestres au CHU, tu m'as aidée à traverser les épreuves de l'internat, et je suis vraiment heureuse de t'avoir rencontrée ! Je sais que notre amitié va durer encore longtemps même si on s'envole toutes les deux vers de nouveaux horizons. Lulu, encore une belle rencontre de cet internat, toujours le mot pour rire et toujours à l'écoute, vivement Coachella !! Les copains de Macon 1 avec lesquels de nombreuses soirées endiablées (sur fond de Synapson) et d'innombrables gardes aux urgences (« je n'arrive pas à faire la synthèse dans ma tête ») ont été partagées, mais aussi des supers week-ends skis / plage dans nos Airbnb de luxe : Nico le Pirate (alias Nick alias le killer de phytothérapie), Kinan (alias Kick le maître des fajitas), Rémy (Dr An-Dan), Sarah, Alicia, Fonseca, JC, Yann, Lamb, Moumoun...

Les copains de Macon 2 (ou un semestre à danser sur du MHD) : Quentin (pour ces supers après-dégustation au domaine ou les soirées planchas), Steevos (« le dernier des internes »), Julie, Samir, Paco, Momo...

Marion et Alexia, pour le super semestre passé en endoc à se soutenir mutuellement ! Les co-internes d'anapath : Lisa, Anne, Ossama, Juliette, Céline ... Merci pour ce semestre génial à vos côtés, à apprendre la dermatopath mais surtout à débriefer nos séries préférées entre deux proverbes africains.

A mes co-internes de dermatologie : Aurélie, Marion, Camille, Orlane, Mélodie, Eléonore, Quentin, Sophie... merci pour tous ces moments partagés avec vous ! Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

A Bastien, mon toupoul, mon cœur. Merci de faire partie de ma vie. Je suis tellement heureuse que nos chemins se soient croisés il y a 8 ans ! On a beaucoup de chance de s'être trouvés. Merci pour ton amour, pour ton humour, ton soutien, pour ta philosophie de vie qui m'a beaucoup appris et fait de moi une meilleure personne chaque jour. Ces dernières années auprès de toi m'ont comblée, j'ai tellement hâte de vivre celles qui nous attendent... Je t'aime.

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 MATIERES

TABLE DES TABLEAUX.....	13
TABLE DES FIGURES.....	14
LISTE DES SIGLES OU ABRÉVIATIONS	15
INTRODUCTION.....	16
PATIENTS ET METHODES	18
RESULTATS.....	21
DISCUSSION	25
CONCLUSIONS.....	29
BIBLIOGRAPHIE	30
ANNEXES.....	34

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Volume de l'échantillon en fonction de la concentration d'ADN extrait.....	34
Tableau 2: Liste des sondes utilisées	35
Tableau 3 : Canaux de détection Naica Prism, temps d'exposition, seuils de fluorescence ...	36
Tableau 4 : Caractéristiques cliniques et biologiques de la population totale étudiée	37
Tableau 5 : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients avec un suivi régulier sous traitement	38
Tableau 6 : Evolution du nombre de copies mutées BRAF sous traitement	39
Tableau 7 : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients en rémission complète / surveillance.....	40
Tableau 8 : Caractéristiques cliniques des patients avec des biopsies liquides irrégulières ou faites sous traitement	41

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Sous-groupes au sein de la population totale.....	42
Figure 2 : Evolution du nombre de copies mutées BRAF entre M0 et M1	43
Figure 3 : Evolution de l'ADNct de la patiente 30, sous dabrafenib et trametinib.....	44
Figure 4 : Classification TNM du mélanome (8 ^{ième} édition de l'American Joint Committee on Cancer)	45
Figure 5 : Critères RECIST version 1.1	47

LISTE DES SIGLES OU ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNct : acide désoxyribonucléique circulant tumoral

AJCC : American Joint Committee on Cancer

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

EI : Écart interquartile

LDH : Lactates Deshydrogénases

MAPkinases : Mitogen-activated protein kinases

mL : millilitre

NA : non atteinte

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

RECIST : Response evaluation criteria in solid tumors

TNM : Tumor, Nodules, Metastases

INTRODUCTION

Le mélanome est un cancer cutané de mauvais pronostic du fait de son fort potentiel métastatique. En France, son incidence est en augmentation avec 15961 cas de mélanomes diagnostiqués en 2018, et 1975 décès estimés cette même année (1,2). Depuis 2011, la prise en charge des mélanomes métastatiques connaît des avancées majeures avec le développement de traitements tels que les thérapies ciblant la voie des MAPkinases et les immunothérapies (3–7). Quarante à 50% des mélanomes métastatiques sont porteurs d’une mutation du codon V600 du gène *BRAF* (8,9). Ces mutations entraînent une augmentation de l’activité kinase de la protéine BRAF et l’activation constitutionnelle de la voie des MAPkinases, cascade de signalisation conduisant à la prolifération cellulaire(10). Pour ces patients avec un mélanome inopérable muté *BRAF* V600, des thérapies ciblées associant un inhibiteur de BRAF et de MEK sont disponibles avec un taux de réponse allant jusqu’à 76% pour l’association dabrafenib et trametinib, et une survie globale des patients à cinq ans de 28% (11). Cependant, la plupart des patients rechutent après 11 mois de traitement (12,13). D’autre part, les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires anti-PD1 (nivolumab, pembrolizumab) ou anti-CTLA4 (ipilimumab) ont montré leur efficacité pour le traitement des patients ayant un mélanome métastatique, quelque soit le statut *BRAF*. Contrairement aux thérapies ciblées, ces immunothérapies peuvent conduire à des réponses thérapeutiques retardées et durables (7). En l’absence d’essai clinique randomisé comparant la thérapie ciblée à l’immunothérapie, il n’existe pas de critère clinique ou biologique pour orienter la décision thérapeutique dans les mélanomes métastatiques *BRAF* mutés en première ligne de traitement. Pour l’heure, les réponses aux traitements sont évaluées sur les scanners pratiqués tous les 2 à 3 mois chez les patients asymptomatiques. D’autre part, les LDH sériques sont prises en compte dans la 8ième classification AJCC du mélanome (14) (décrite en annexe). Par exemple, un taux élevé de LDH avant traitement est associé à une diminution de la survie globale sous thérapie ciblée (12), mais leurs sensibilité et spécificité pour détecter les progressions tumorales sont faibles (15). Ces problématiques montrent bien la nécessité de marqueurs tumoraux fiables pour aider à la décision thérapeutique et pour le suivi des patients.

En 1948, Mandel et Métais (16) décrivaient pour la première fois la présence d'ADN libre circulant dans le plasma d'individus sains. L'ADN circulant proviendrait de cellules apoptotiques ou nécrotiques, mais il pourrait également être la conséquence d'une libération cellulaire active notamment lors des processus inflammatoires (17). En 1977, Leon *et al.* mettaient en évidence une quantité plus importante d'ADN libre circulant chez les patients atteints d'un cancer comparativement aux sujets sains (18). En effet, les cellules tumorales présentent des phénomènes de morts cellulaires ce qui entraîne une libération sanguine de fragments de leur matériel génétique (19). Cet ADN est appelé ADN tumoral circulant ou ADNct. La biopsie liquide est un prélèvement sanguin permettant d'étudier différents sous-compartiments du sang comme l'ADN circulant, les cellules tumorales circulantes et les exosomes (20). L'identification d'ADN tumoral porteur de mutations au sein de l'ADN total libre circulant permet de déterminer le statut mutationnel de la tumeur et quantifier le nombre de copies mutées. Pour les patients avec des mélanomes mutés *BRAF* V600, l'analyse de l'ADN circulant n'est pas encore réalisée en routine mais pourrait avoir un intérêt diagnostique, pronostique et dynamique pour le suivi de la maladie.

Dans cette étude, nous avons analysé rétrospectivement les taux d'ADN tumoral circulant déterminés par PCR digitale en micro compartiments, chez 35 patients présentant des mélanomes mutés *BRAF* V600 suivis au Centre Hospitalier Universitaire de Dijon. L'objectif de cette étude a été d'évaluer si les variations des taux d'ADN circulants mutés *BRAF* étaient ou non corrélés à l'évolution de la maladie métastatique.

PATIENTS ET METHODES

Population

Il s'agit d'une étude rétrospective monocentrique menée au Centre Hospitalier Universitaire de Dijon entre janvier 2016 et mai 2019. Les critères d'inclusion étaient la présence d'un mélanome de stade II, III ou IV selon la 8^{ième} classification de l'AJCC (14) (décrite en annexe), avec des mutations *BRAF* V600E ou V600K de l'ADN tissulaire pour lesquels au minimum 2 biopsies liquides étaient analysées par PCR digitale. L'inclusion ne tenait pas compte de leur traitement. Les patients étaient traités par thérapie ciblée (inhibiteurs de BRAF et de MEK : dabrafenib + trametinib ou vemurafenib + cobimetinib), immunothérapie anti-PD1 (pembrolizumab ou nivolumab), anti-CTLA4 (ipilimumab), interféron, ou n'avaient pas de traitement. Pour chaque biopsie liquide, les données cliniques, biologiques et d'imagerie étaient recueillies rétrospectivement à partir des dossiers informatisés. Tous les patients avaient préalablement signé un consentement éclairé permettant l'exploitation de leurs dossiers médicaux.

Les paramètres collectés étaient l'âge, le sexe, le statut OMS, le stade du mélanome, le type de mutation *BRAF*, le taux de LDH lors de la première biopsie liquide et le type de traitement pris. Pour chaque biopsie liquide, le taux d'ADN circulant total (en copies/mL de plasma), le taux d'ADN circulant muté (en copies/mL de plasma) et le pourcentage d'ADN circulant muté étaient répertoriés. Pour les patients ayant eu des biopsies liquides régulières sous traitement, la date de la première progression et, le cas échéant, la date de décès étaient recueillis. La survie sans progression était définie comme le temps écoulé entre le début du traitement et la première progression tumorale ou le décès ; la survie globale était définie à partir de la première administration du traitement jusqu'au décès, quelle qu'en soit la cause.

L'évolution tumorale était évaluée par l'imagerie (tomodensitométrie) en utilisant les critères RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) version 1.1 (21) (décrits en annexe). L'évolution tumorale était classée en : Progression tumorale (PD), Stabilisation (SD), Réponse partielle (RP), Réponse complète (RC).

Les variables continues sont décrites en utilisant les médianes, extrêmes, et les écarts interquartiles pour les taux d'ADN circulant. Les variables qualitatives sont décrites par nombre et pourcentage.

Méthodes

Recueil et conditionnement des échantillons

Les biopsies liquides étaient prélevées sur sang veineux par quatre tubes EDTA de 7 mL. Elles étaient adressées au secteur pré-analytique dans les quatre heures suivant le prélèvement afin de pratiquer une première centrifugation pendant dix minutes à 1400 g. Les échantillons plasmatiques étaient ensuite stockés à – 80°, jusqu'à l'extraction.

Extraction de l'ADN circulant

L'extraction de l'ADN circulant était réalisée avec l'automate QIA Symphony (Qiagen®), à partir de 4 mL de plasma, selon la procédure automatisée du fabricant. L'évaluation qualitative de l'ADN extrait était faite par la technique TapeStation 4200 (Agilent Technologies®), permettant de séparer et quantifier les acides nucléiques en fonction de leurs tailles au moyen d'une électrophorèse. La concentration de l'ADN circulant total était évaluée avec la méthode Qubit.

Analyse de l'ADN circulant par PCR digitale

Principe

La PCR digitale est une technique de quantification absolue en PCR de très haute sensibilité. Elle se base sur une approche de PCR utilisant des couples d'amorces amplifiant les zones d'intérêt ainsi que des sondes fluorescentes ciblant les altérations recherchées. Le mélange réactionnel de PCR est réparti, au sein de la chambre, en plusieurs milliers de nano-réacteurs (gouttelettes) indépendants correspondant chacun à une copie d'ADN. Ces gouttelettes sont ensuite amplifiées par PCR et un signal de fluorescence est produit par chaque gouttelette en fonction de son statut mutationnel. La quantification du nombre de copies *BRAF* mutées au sein de l'ADN circulant est réalisée en comptant le nombre de gouttelettes positives ou négatives. Cette approche permet de déterminer la quantité absolue d'acide nucléique porteur de l'altération recherchée.

Technique

La technique de PCR digitale est pratiquée avec le système NAICA (Stilla Technologies®). Un mélange réactionnel contenant des couples d'amorces, des polymérase et des sondes fluorescentes est ajouté à l'ADN extrait au sein d'un microtube. Le volume de mélange réactionnel ajouté est déterminé en fonction de la concentration d'ADN extrait (Tableau 1). Trois sondes d'hydrolyse sont utilisées, correspondant à l'allèle sauvage du codon 600 du gène *BRAF* (également appelée « WT » pour Wild-Type), à l'allèle muté V600E et à l'allèle muté V600K (Tableau 2). Les microtubes sont insérés dans une chambre microfluidique au sein de la puce Sapphire (Stilla Technologies®), puis placés dans le thermocycleur Naica Geode. Le thermocyclage débute par une étape initiale de dénaturation à 95° pendant 5 minutes, suivie d'une hybridation à 95° pendant 15 secondes puis d'une élongation à 60° pendant 30 secondes. A l'issue de ce programme, les puces sont transférées dans le Naica Prism (microscope automatisé à fluorescence équipé de 3 filtres passe-bande), afin d'acquérir les images de fluorescence (Tableau 3). Un algorithme pour le traitement d'images identifie et caractérise chaque gouttelette afin de définir l'intensité de fluorescence dans chaque canal. L'énumération totale et le contrôle qualité des gouttelettes sont réalisés avec le logiciel Crystal Reader.

RESULTATS

A. Caractéristiques de la population totale étudiée

Au total, 35 patients ont été inclus et 186 biopsies liquides étaient analysées. Les caractéristiques cliniques et biologiques de la population totale sont décrites dans le Tableau 4. L'âge médian était de 66 ans [extrêmes : 24 – 86], la population était majoritairement masculine avec 21 hommes (60%). Trente et un patients avaient une mutation V600E du gène *BRAF* (88,6%), et 4 patients présentaient une mutation V600K (11,4%). Un patient avait un mélanome stade II (2,9%), 8 patients présentaient un mélanome stade III (22,8%) et 26 mélanomes stade IV (74,3%) dont 10 avec des métastases cérébrales (28,6%). Le score OMS était à 0 pour 74,3% des patients (n = 26), huit patients avaient un statut OMS à 1 (22,8%) et un patient avait un statut OMS à 3 (2,9%). Le nombre médian de biopsies liquides par patients était de 4 [2 – 16]. Pour tous les patients ayant eu au moins une biopsie liquide positive, la mutation détectée sur l'ADN circulant correspondait à la mutation de l'ADN tissulaire (n = 18, 100%).

Au sein de cette population, nous avons identifié différents sous-groupes que nous avons étudiés de manière indépendante (Figure 1). Tout d'abord, 10 patients avaient un suivi régulier avec une biopsie liquide pratiquée avant l'initiation d'un traitement puis régulièrement au cours du suivi sous traitement. Ensuite, 13 patients étaient en rémission complète de leur mélanome et les biopsies liquides étaient analysées dans le cadre de leur surveillance. Enfin, 12 patients avaient été prélevés de manière irrégulière, sans qu'un dosage pré-thérapeutique n'ait pu être effectué.

B. Patients avec un suivi régulier sous traitement (n = 10)

Caractéristiques

Les caractéristiques cliniques et biologiques des patients ayant eu une biopsie liquide avant l'instauration d'un traitement puis à intervalles réguliers sont décrites dans le Tableau 5. L'âge médian était de 56,5 ans [43 – 80], il y avait 80% d'hommes (n = 8). Tous ces patients présentaient des mélanomes stade IV, dont 4 avec des métastases cérébrales (40%). Trois

patients (30%) présentaient moins de trois sites métastatiques. A l'initiation thérapeutique, le taux de LDH était supérieur à la norme chez 2 patients (20%), normal chez 6 patients (60%) et elles étaient hémolysées chez 2 patients (20%). Neuf patients débutaient une thérapie ciblée (90%) et un débutait une immunothérapie par nivolumab (10%). La médiane de survie sans progression sous traitement était de 7 mois [2 – NA], et la survie globale médiane était de 9 mois [4 – NA].

Suivi

Les biopsies liquides étaient pratiquées à M0 (avant l'initiation du traitement), puis à M1 (un mois après le début du traitement), M3 et M6 (trois et six mois après le début du traitement, respectivement). Les médianes du nombre de copies mutées *BRAF* sur l'ADN circulant sont résumées dans le Tableau 6. Avant l'initiation thérapeutique, 90 % des patients (n = 9) présentaient des mutations de l'ADN circulant avec une médiane de copies mutées *BRAF* à 78,7 copies/mL de plasma [écart interquartile : 15,51 – 504,41]. Un mois après le début du traitement, l'ADNct devenait négatif chez sept patients sur huit (87,5 %) et la médiane de copies mutées descendait à 0 [EI : 0- 0]. A trois mois de traitement, lors de la première évaluation scanographique, 5 patients étaient en réponse thérapeutique (55,5%), 3 patients étaient en progression (33,3%) et un patient présentait une réponse dissociée (augmentation des métastases cérébrales et diminution des nodules pulmonaires). Cette réponse dissociée survenait chez le seul patient sous immunothérapie. A M3, la médiane de copies mutées restait à 0 [EI : 0 – 7,95]. Six mois après le début du traitement, le nombre de copies mutées *BRAF* augmentait avec une médiane à 84 copies/mL de plasma [EI : 0 – 202,43]. La réévaluation paraclinique retrouvait 3 patients en progression (50%) et 3 patients en réponse thérapeutique (50%). La figure 2 illustre l'évolution du nombre de copies circulantes *BRAF* mutées pour chaque patient entre M0 et M1.

Il est à noter qu'un seul patient avait un ADNct encore détectable à M1. Il s'agissait d'un homme de 79 ans présentant un mélanome métastatique muté *BRAF* V600E. Avant l'instauration de la thérapie ciblée, son taux d'ADNct était élevé à 43428 copies mutées/mL de plasma et les LDH étaient augmentées à 1020 UI/L. Cliniquement, il était sous oxygénothérapie et son score OMS était de 3. Le scanner montrait une progression tumorale avec l'apparition de métastases pulmonaires et cérébrales, ce qui conduisait à l'instauration d'une thérapie ciblée par dabrafenib et trametinib. A M1, l'état clinique s'améliorait avec un

score OMS à 1 et l'oxygénothérapie était arrêtée. L'ADNct restait détectable à 98,7 copies mutées/mL de plasma (les LDH étaient alors hémolysées). A M3, le scanner de réévaluation retrouvait une progression cérébrale et osseuse. L'ADNct augmentait à 2568 copies mutées/mL de plasma. Les LDH étaient à 244 UI/L. Le patient décédait un mois plus tard. La survie sans progression était de 3 mois et la survie globale de 4 mois.

C. Patients en rémission complète, surveillance (n = 13)

Les caractéristiques cliniques et biologiques des patients en rémission complète, surveillés, sont décrites dans le Tableau 7. L'âge médian était de 64 ans [extrêmes : 34 - 75], il y avait 9 hommes (69,2%). Il s'agissait de 8 mélanomes stade IV (61,5 %), 4 mélanomes stade III (30,8%), un mélanome stade II (7,7%). Un patient avait un statut OMS à 1 (7,7%), les autres patients étaient OMS 0 (n = 12, 92,3%). Antérieurement, 2 patients avaient eu uniquement une chirurgie (15,4%). 6 patients avaient été traités par interféron (46,1%), 8 patients par thérapie ciblée (61,5%) et 3 par immunothérapie (23,1%). Quatre patients avaient eu de la radiothérapie (30,8%). La durée médiane de rémission était de 39 mois [10 – 69]. La médiane du nombre de copies mutées *BRAF* sur l'ADN circulant était de 0 [0 – 0].

D. Patients avec des biopsies liquides irrégulières ou faites sous traitement (n = 12)

En raison du caractère récent de la technique de PCR digitale, 12 patients étaient prélevés de manière irrégulière ou étaient déjà traités lors de leurs premières biopsies liquides. Les caractéristiques cliniques de ces patients sont décrites dans le Tableau 8.

Pour chacun de ces patients, les variations de taux de l'ADN circulant muté et l'évolution tumorale ont été analysées au cas par cas, afin d'étudier leur corrélation.

Cette étude a permis de différencier deux modèles distincts :

- Les patients avec des progressions tumorales et des variations de taux d'ADN circulant muté corrélées (n = 8)
- Les patients ayant présenté une progression tumorale et des taux d'ADN circulant muté non concordants (n = 4)

1. Patients avec des progressions tumorales et des variations de taux d'ADNct concordants

(n = 8)

Au sein de notre cohorte, l'évolution tumorale était corrélée aux variations de taux d'ADNct pour 8 patients. La figure 3 illustre l'évolution d'une patiente de 80 ans, qui présentait un mélanome métastatique muté *BRAF* V600E. La première biopsie liquide était faite un mois après l'introduction de la thérapie ciblée. L'ADNct était alors détectable à un taux de 16,5 copies/mL de plasma. Sur le scanner pratiqué à 2 mois, les lésions secondaires (ganglionnaires et osseuses) régressaient partiellement. Le taux d'ADNct diminuait à 5,55 cop/mL avant de réascensionner à 46,65 copies/mL de plasma. Cette augmentation survenait avant que la patiente ne soit hospitalisée pour une méningite mélanomateuse. Il existait également une progression tumorale pulmonaire et ganglionnaire. Le taux d'ADNct était alors en franche augmentation à 1638 copies/mL de plasma. La patiente décédait quelques semaines plus tard.

2. Patients ayant présenté une progression tumorale et des taux d'ADNct discordants (n = 4)

Nous avons identifié quatre patients qui présentaient une progression tumorale au cours de leur suivi et dont les biopsies liquides n'étaient pas informatives.

Deux patients présentaient des progressions cérébrales exclusives, sans que des mutations de l'ADN circulant ne soient détectées.

Un patient présentait une progression cutanée exclusive sous la forme de multiples métastases en transit, et les biopsies liquides restaient négatives.

Un patient présentait une progression pulmonaire exclusive avec apparition d'une volumineuse métastase du lobe moyen, et les biopsies liquides étaient négatives.

DISCUSSION

Nos résultats retrouvaient dans la majorité des cas une bonne corrélation entre les variations des taux d'ADNct et l'évolution du mélanome. De plus, lorsqu'une mutation de l'ADNct était détectée, elle était similaire à la mutation tissulaire dans 100% des cas. De précédentes études montraient également un haut degré de concordance de 84,3% (22) et 90,9% (23) entre le statut mutationnel tissulaire et plasmatique. Dans notre travail, les patients avec des biopsies liquides régulières sous traitement présentaient une diminution franche du taux d'ADNct après un mois de thérapie ciblée (non détection de l'ADNct chez sept patients sur huit à M1 (87,5%)). Les taux d'ADNct augmentaient lors des progressions métastatiques objectivées sur les imageries et restaient négatifs chez les patients répondeurs. De même, pour les patients en rémission complète surveillés régulièrement, les biopsies liquides restaient toutes négatives. Pour les patients ayant eu des prélèvements irréguliers, 66,7 % des malades (n = 8) présentaient des taux d'ADNct corrélés au statut tumoral. Nos résultats étaient cohérents avec ceux de différentes études déjà publiées. En 2015, Sanmamed *et al.* (22) étudiaient la concentration plasmatique des mutations *BRAF* V600E de l'ADN circulant par PCR digitale chez 20 patients présentant des mélanomes sous thérapie ciblée. A l'inclusion, la concentration d'ADNct était corrélée à la charge tumorale. Les taux d'ADNct diminuaient significativement après la mise sous thérapie ciblée et lors des réponses tumorales, et augmentaient lors des progressions. En 2016, Schreuer *et al.* (24) réalisaient une étude translationnelle prospective en mesurant par PCR quantitative la concentration des mutations *BRAF* V600 de l'ADN circulant de 36 patients avec des mélanomes sous thérapie ciblée. Les concentrations d'ADNct diminuaient rapidement après l'initiation du traitement. Au cours du suivi, une augmentation du nombre de copies mutées de l'ADN circulant identifiait une progression avec une sensibilité de 70% et une spécificité de 100%. De même, en 2018, Haselmann *et al.* (23) étudiaient les évolutions de 35 patients avec des mélanomes stades IV sous thérapie ciblée. Pour tous les patients répondeurs, l'ADNct était indétectable après l'introduction du traitement. Lors du suivi, une progression tumorale était détectée sur l'imagerie dans 18 cas ; et les taux d'ADNct augmentaient chez 15 patients. Dans 3 cas, il n'était pas visualisé d'augmentation de l'ADNct, et 2 de ces patients présentaient une progression cérébrale exclusive. Pour les patients sous immunothérapie, Cabel *et al.* (25) observaient une corrélation significative entre les variations de concentrations d'ADNct et de la charge tumorale. De plus, des articles comparant les taux

d'ADNct aux LDH montraient une meilleure corrélation entre les variations d'ADNct et l'évolution tumorale (26,27), avec une sensibilité de l'ADNct de 82% pour détecter les progressions, contre 40% pour les LDH.

Dans notre étude, le seul patient dont l'ADNct restait détectable à un mois de traitement, avait la survie globale la plus courte (4 mois). De nombreux articles ont montré l'intérêt pronostique des biopsies liquides, et il existe un lien entre le taux d'ADNct avant traitement et la survie globale des patients métastatiques (22,28–32). En effet, Sanmamed *et al.* (22), mettaient en avant que des taux faibles d'ADNct à l'introduction de la thérapie ciblée étaient significativement associés à des survies sans progression et globale plus longues (9 mois et 27,7 mois respectivement), par rapport aux patients avec des taux élevés d'ADNct (3 mois et 8,6 mois respectivement). De plus, les variations d'ADNct un mois après l'introduction du traitement permettraient de prédire la réponse. En effet, Syeda *et al.* (33) montraient que des taux d'ADNct devenus indétectables après un mois de thérapie ciblée étaient associés à un allongement des survies sans progression et globale pour 201 patients. De même, lors de l'instauration d'une immunothérapie, Keller *et al.* (28) ont montré que les variations précoces de l'ADNct (six semaines) étaient significativement associées à l'évolution tumorale. La médiane de survie sans progression était de 21 jours pour les patients présentant une augmentation de l'ADNct, contre 145 jours pour les patients avec une diminution de l'ADNct.

Ces données soulignent l'intérêt des biopsies liquides pour la décision thérapeutique. En effet, en raison de la bonne concordance entre le statut mutationnel des ADN tissulaire et plasmatique, l'ADNct pourrait avoir un intérêt diagnostique et être un substitut au prélèvement tissulaire pour déterminer les mutations tumorales. Par rapport aux biopsies tissulaires, les biopsies liquides présentent l'avantage d'être non invasives, facilement reproductibles, et la technique de PCR digitale permet d'obtenir des résultats rapides en 24 heures. Dans la littérature, cette technique apparaît comme la plus appropriée pour détecter et quantifier les mutations de l'ADN circulant, en raison de sa haute sensibilité de détection qui peut aller jusqu'à 0,005% (20). D'autre part, plusieurs études ont montré une élévation du taux d'ADNct avant la détection sur l'imagerie de la progression tumorale (23,24,34). Haselmann *et al.* retrouvaient, sur 18 patients progressifs, 11 cas où l'ADNct augmentait avant l'imagerie, en moyenne 177 jours plus tôt. Dans l'étude de Schreuer *et al.*, la concentration d'ADNct augmentait chez 12 patients sur 27 avant le constat de la progression

tumorale (intervalle médian de 25 jours plus tôt). En outre, les examens d'imagerie sont parfois difficiles d'interprétation, notamment dans le cas de pseudoprogessions (augmentation initiale de la masse tumorale puis réponse secondaire) ou de réponse dissociée (diminution de certaines tumeurs alors que d'autres augmentent en taille) sous immunothérapie. Une étude a récemment démontré l'utilité de l'ADNct pour identifier les pseudoprogessions scanographiques chez les patients ayant des mélanomes métastatiques traités par anti-PD1 (35). La sensibilité de l'ADNct pour différencier une pseudoprogession d'une vraie progression tumorale était de 90%, et la spécificité de 100%.

Cependant, notre travail mettait en évidence plusieurs cas discordants. Tout d'abord, deux de nos patients présentaient des progressions cérébrales exclusives conduisant au décès, sans que des mutations de l'ADN circulant ne soient détectées. Cette situation était également retrouvée dans plusieurs études publiées (23,28,34). La barrière hémato-encéphalique pourrait limiter la diffusion sanguine de l'ADN tumoral (36). Dans ces situations, les biopsies liquides sanguines pourraient être moins contributives et l'analyse des mutations dans le liquide céphalo-rachidien pourrait être une alternative (37). Dans notre étude, deux patients présentaient également des oligoprogessions avec biopsies liquides négatives : une progression cutanée exclusive et une progression pulmonaire exclusive. En 2011, Yancovitz *et al.* (38) mettaient en avant l'hétérogénéité de la mutation *BRAF* dans le mélanome, hétérogénéité à la fois intra-tumorale (différentes proportions de cellules *BRAF* mutées et *BRAF* sauvages au sein d'une même tumeur) et inter-tumorale (entre les différentes métastases). Les biopsies liquides pourraient être le reflet global de ces mutations. De plus, en raison de la pression de sélection des traitements, l'émergence de nouveaux clones tumoraux avec des mutations distinctes de celle recherchée initialement pourrait expliquer l'absence de détection des mutations *BRAF* V600 de l'ADN circulant lors de certaines progressions métastatiques (39). Cette limite pourrait être dépassée par une caractérisation plus large du génome tumoral sur biopsie liquide par la technologie Next Generation Sequencing.

Notre étude comportait des biais de par son caractère rétrospectif, l'hétérogénéité de la population et des traitements entrepris. La technique de PCR digitale étant récente et disponible au CHU depuis 2016, les prélèvements de biopsie liquide ont été pratiqués à des

fréquences irrégulières et non standardisées, ce qui représentait la principale limite de notre travail. Il existait également un manque de puissance en raison du faible nombre de patients.

Il paraît judicieux d'instaurer une fréquence standardisée des prélèvements pour le suivi des patients ayant un mélanome métastatique. Les patients traités par thérapie ciblée pourraient avoir une biopsie liquide avant le début du traitement puis à un mois et à chaque réévaluation tumorale (tous les 2 à 3 mois). Ceci permettrait d'identifier de manière précoce les patients non-répondeurs, et ainsi d'adapter le traitement rapidement.

En conclusion, notre étude confirme la fiabilité de l'analyse de l'ADNct par PCR digitale avec une bonne concordance entre mutations tissulaires et plasmatiques. Les biopsies liquides présentent un intérêt dynamique pour le suivi des patients avec des mélanomes métastatiques puisque les variations des taux d'ADNct étaient corrélées à l'évolution tumorale. Elles ont également un intérêt pronostique pour prédire la réponse au traitement et aider aux décisions thérapeutiques. Toutefois, il est nécessaire de tenir compte du site métastatique pour interpréter ces résultats, en particulier en cas de métastases cérébrales ou cutanées exclusives. Enfin, les indications des biopsies liquides pourraient s'élargir à la surveillance des patients à un stade moins avancé de la maladie, pour lesquels un traitement adjuvant est indiqué.

THESE SOUTENUE PAR Mlle Elsa MARION

CONCLUSIONS

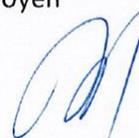
Notre étude confirme la fiabilité de l'analyse de l'ADN circulant tumoral par PCR digitale avec une bonne concordance entre mutations tissulaires et plasmatiques. Les biopsies liquides présentent un intérêt dynamique pour le suivi des patients avec des mélanomes métastatiques puisque les variations de taux d'ADN circulant muté étaient corrélées à l'évolution tumorale. Elles ont également un intérêt pronostique pour prédire la réponse au traitement et aider aux décisions thérapeutiques. Toutefois, il est nécessaire de tenir compte du site métastatique pour interpréter ces résultats, en particulier en cas de métastases cérébrales ou cutanées exclusives. Enfin, les indications des biopsies liquides pourraient s'élargir à la surveillance des patients à un stade moins avancé de la maladie, pour lesquels un traitement adjuvant est indiqué.

Le Président du jury,



Pr. L MARTIN

Vu et permis d'imprimer
Dijon, le 5 SEPTEMBRE 2019
Le Doyen



Pr. M. MAYNADIÉ

BIBLIOGRAPHIE

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Remontet L, Colonna M, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Résultats préliminaires Saint-Maurice (Fra): Santé publique France. 2019;
3. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med.* 01 2012;367(18):1694-703.
4. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 19 août 2010;363(8):711-23.
5. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 22 janv 2015;372(4):320-30.
6. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 11 juill 2013;369(2):122-33.
7. 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.* 05 2017;377(14):1345-56.
8. Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol.* 10 juill 2012;30(20):2522-9.
9. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat J-P, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* 20 juill 2012;150(2):251-63.
10. Sullivan RJ, Flaherty KT. BRAF in Melanoma: Pathogenesis, Diagnosis, Inhibition, and Resistance. *J Skin Cancer.* 2011;2011:423239.
11. Long GV, Eroglu Z, Infante J, Patel S, Daud A, Johnson DB, et al. Long-Term Outcomes in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Who Received Dabrafenib Combined With Trametinib. *J Clin Oncol.* 01 2018;36(7):667-73.
12. 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.* 1 juill 2017;28(7):1631-9.
13. 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.* 1 janv 2015;372(1):30-9.
 14. 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.* nov 2017;67(6):472-92.
 15. Egberts F, Hitschler WN, Weichenthal M, Hauschild A. Prospective monitoring of adjuvant treatment in high-risk melanoma patients: lactate dehydrogenase and protein S-100B as indicators of relapse. *Melanoma Res.* févr 2009;19(1):31-5.
 16. Mandel P, Metais P. [Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme]. *C R Seances Soc Biol Fil.* févr 1948;142(3-4):241-3.
 17. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta.* nov 2001;313(1-2):139-42.
 18. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* mars 1977;37(3):646-50.
 19. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* juin 2011;11(6):426-37.
 20. Gaiser MR, von Bubnoff N, Gebhardt C, Utikal JS. Liquid biopsy to monitor melanoma patients. *J Dtsch Dermatol Ges.* avr 2018;16(4):405-14.
 21. 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.* janv 2009;45(2):228-47.
 22. Sanmamed MF, Fernández-Landázuri S, Rodríguez C, Zárate 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.* janv 2015;61(1):297-304.
 23. Haselmann V, Gebhardt C, Brechtel I, Duda A, Czerwinski C, Sucker A, et al. Liquid Profiling of Circulating Tumor DNA in Plasma of Melanoma Patients for Companion Diagnostics and Monitoring of BRAF Inhibitor Therapy. *Clin Chem.* mai 2018;64(5):830-42.
 24. Schreuer M, Meersseman G, Van Den Herrewegen S, Jansen Y, Chevolet I, Bott A, et al. Quantitative assessment of BRAF V600 mutant circulating cell-free tumor DNA as a tool for therapeutic monitoring in metastatic melanoma patients treated with BRAF/MEK inhibitors. *J Transl Med.* 19 avr 2016;14:95.

25. Cabel L, Riva F, Servois V, Livartowski A, Daniel C, Rampanou A, et al. Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: a proof-of-concept study. *Ann Oncol.* 1 août 2017;28(8):1996-2001.
26. Chang GA, Tadepalli JS, Shao Y, Zhang Y, Weiss S, Robinson E, et al. Sensitivity of plasma BRAF mutant and NRAS mutant cell-free DNA assays to detect metastatic melanoma in patients with low RECIST scores and non-RECIST disease progression. *Mol Oncol.* janv 2016;10(1):157-65.
27. Tsao SC-H, Weiss J, Hudson C, Christophi C, Cebon J, Behren A, et al. Monitoring response to therapy in melanoma by quantifying circulating tumour DNA with droplet digital PCR for BRAF and NRAS mutations. *Sci Rep.* 22 juin 2015;5:11198.
28. 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.* 1 févr 2019;99(2):206-10.
29. Lee JH, Long GV, Boyd S, Lo S, Menzies AM, Tembe V, et al. Circulating tumour DNA predicts response to anti-PD1 antibodies in metastatic melanoma. *Ann Oncol.* 1 mai 2017;28(5):1130-6.
30. Gonzalez-Cao M, Mayo-de-Las-Casas C, Molina-Vila MA, De Mattos-Arruda L, Muñoz-Couselo E, Manzano JL, et al. BRAF mutation analysis in circulating free tumor DNA of melanoma patients treated with BRAF inhibitors. *Melanoma Res.* déc 2015;25(6):486-95.
31. Knol AC, Vallée A, Herbreteau G, Nguyen J-M, Varey E, Gaultier A, et al. Clinical significance of BRAF mutation status in circulating tumor DNA of metastatic melanoma patients at baseline. *Exp Dermatol.* 2016;25(10):783-8.
32. Santiago-Walker A, Gagnon R, Mazumdar J, Casey M, Long GV, Schadendorf D, et al. Correlation of BRAF Mutation Status in Circulating-Free DNA and Tumor and Association with Clinical Outcome across Four BRAFi and MEKi Clinical Trials. *Clin Cancer Res.* 1 févr 2016;22(3):567-74.
33. Syeda MM, Wiggins JM, Corless B, Long GV, Flaherty K, Schadendorf D, et al. Circulating tumor DNA (ctDNA) kinetics to predict survival in patients (pts) with unresectable or metastatic melanoma treated with dabrafenib (D) or D + trametinib (T). *JCO.* 20 mai 2019;37(15_suppl):9510-9510.
34. 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.* 8 déc 2015;6(39):42008-18.
35. Lee JH, Long GV, Menzies AM, Lo S, Guminski A, Whitbourne K, et al. Association Between Circulating Tumor DNA and Pseudoprogression in Patients With Metastatic Melanoma Treated With Anti-Programmed Cell Death 1 Antibodies. *JAMA Oncol.* 1 mai 2018;4(5):717-21.

36. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 19 févr 2014;6(224):224ra24.
37. Momtaz P, Pentsova E, Abdel-Wahab O, Diamond E, Hyman D, Merghoub T, et al. Quantification of tumor-derived cell free DNA(cfDNA) by digital PCR (DigPCR) in cerebrospinal fluid of patients with BRAFV600 mutated malignancies. *Oncotarget*. 20 déc 2016;7(51):85430-6.
38. Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, Ng E, Shapiro RL, Berman RS, et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. *PLoS ONE*. 2012;7(1):e29336.
39. Gremel G, Lee RJ, Girotti MR, Mandal AK, Valpione S, Garner G, et al. Distinct subclonal tumour responses to therapy revealed by circulating cell-free DNA. *Ann Oncol*. 2016;27(10):1959-65.

ANNEXES

Tableau 1: Volume de l'échantillon en fonction de la concentration d'ADN extrait

Concentration de l'échantillon (ng/ μ L)	Volume de prise d'échantillon (μ L) pour recherche mutationnelle
0 – 1,5	14,3
1,5 – 2,5	14,3
2,5 – 4	14,3
4 – 6	10
6 – 8	10
> 8	10

Tableau 2: Liste des sondes utilisées

Nom	5' fluorochrome	Séquence
BRAF WT V600	FAM (canal bleu)	CTA GCT ACA GTG AAA TCT CG
BRAF V600E	Cy5 (canal rouge)	CTA GCT ACA GAG AAA TCT CG
BRAV V600K	HEX (canal vert)	CTA GCT ACA AAG AAA TCT CG

Tableau 3 : Canaux de détection du Naica Prism, temps d'exposition, seuils de fluorescence

	Canal bleu	Canal vert	Canal rouge
Gamme d'excitation	415-480 nm	530-550 nm	615-645 nm
Gamme d'émission	495-520 nm	560-610 nm	655-720 nm
<u>Fluorophores</u>	FAM	HEX	Cy5
Temps d'exposition (ms)	50	300	30
Seuils de fluorescence (RFU)	25164	7000	8449

Tableau 4 : Caractéristiques cliniques et biologiques de la population totale étudiée

	Population totale n = 35
Age médian, années [extrêmes]	66 [24 – 86]
Sexe masculin, n (%)	21 (60)
Mutation de l'ADN tissulaire	
BRAF V600E, n (%)	31 (88,6)
BRAF V600K, n (%)	4 (11,4)
Stade du mélanome	
II, n (%)	1 (2,9)
III, n (%)	8 (22,8)
IV, n (%)	26 (74,3)
IV M1a	3 (8,6)
IV M1b	3 (8,6)
IV M1c	10 (28,6)
IV M1d (métastases cérébrales)	10 (28,6)
Statut OMS	
0, n (%)	26 (74,3)
1, n (%)	8 (22,8)
3, n (%)	1 (2,9)
Nombre médian de biopsies liquides par patient [extrêmes]	4 [2 – 16]

Tableau 5 : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients avec un suivi régulier sous traitement

	Population totale n = 10
Age médian, années [extrêmes]	56,5 [43 - 80]
Sexe masculin, n (%)	8 (80)
Statut OMS	
0, n (%)	7 (70)
1, n (%)	2 (20)
3, n (%)	1 (10)
Mélanome stade IV, n (%)	10 (100)
IV M1b	1 (10)
IV M1c	5 (50)
IV M1d (métastases cérébrales)	4 (40)
Nombre de sites métastatiques	
< 3, n (%)	3 (30)
≥ 3, n (%)	7 (70)
1 ^{ère} ligne thérapeutique, n (%)	6 (60)
Taux de LDH à M0	
< N, n (%)	6 (60)
> N, n (%)	2 (20)
hémolysées, n (%)	2 (20)
Traitement instauré	
Thérapie ciblée, n (%)	9 (90)
Immunothérapie, n (%)	1 (10)
Survie sans progression médiane, mois [extrêmes]	7 [2 - NA]
Survie globale médiane, mois [extrêmes]	9 [4 - NA]

Tableau 6 : Evolution du nombre de copies mutées *BRAF* sous traitement

	M0 (n = 10)	M1 (n = 8)	M3 (n = 9)	M6 (n = 6)
Médiane copies mutées / mL [EI]	78,7 [15,51 - 504,41]	0 [0 - 0]	0 [0 - 7,95]	84 [0 - 202,43]
Médiane fraction mutée % [EI]	1,9 [0,41 - 14,09]	0 [0 - 0]	0 [0 - 0,4]	2,87 [0 - 6,87]
Patients répondeurs, n (%)			5 (55,5)	3 (50)
Patients en progression, n (%)			3 (33,3)	3 (50)

Tableau 7 : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients en rémission complète / surveillance

	Population totale n = 13
Age médian, années [extrêmes]	64 [34 – 75]
Sexe masculin, n (%)	9 (69,2)
Stade du mélanome	
II, n (%)	1 (7,7)
III, n (%)	4 (30,8)
IV, n (%)	8 (61,5)
Statut OMS	
0, n (%)	12 (92,3)
1, n (%)	1 (7,7)
Traitement antérieur	
Chirurgie seule, n (%)	2 (15,4)
Radiothérapie, n (%)	4 (30,8)
Interféron, n (%)	6 (46,1)
Thérapie ciblée, n (%)	8 (61,5)
Immunothérapie, n (%)	3 (23,1)
Durée de rémission médiane, mois [extrêmes]	39 [10 – 69]
Médiane de copies mutées/mL de plasma [extrêmes]	0 [0 – 0]

Tableau 8 : Caractéristiques cliniques des patients avec des biopsies liquides irrégulières ou faites sous traitement

	Population totale n = 12
Age médian, années [extrêmes]	74,5 [44 - 86]
Sexe masculin, n (%)	4 (33,3)
Stade du mélanome	
III, n (%)	3 (25)
IV, n (%)	9 (75)
IV M1a	1 (8,3)
IV M1b	1 (8,3)
IV M1c	4 (33,3)
IV M1d (métastases cérébrales)	3 (25)
Statut OMS	
0, n (%)	7 (58,3)
1, n (%)	5 (41,7)

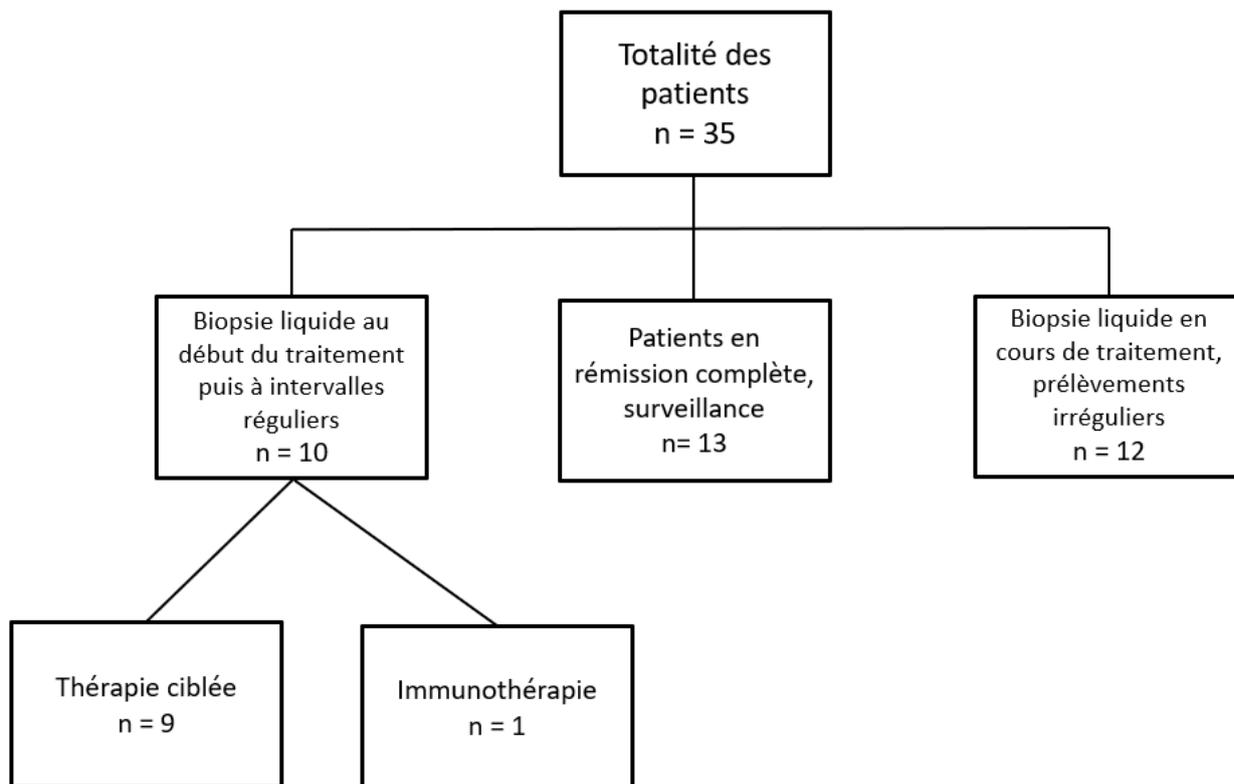


Figure 1 : Sous-groupes au sein de la population totale

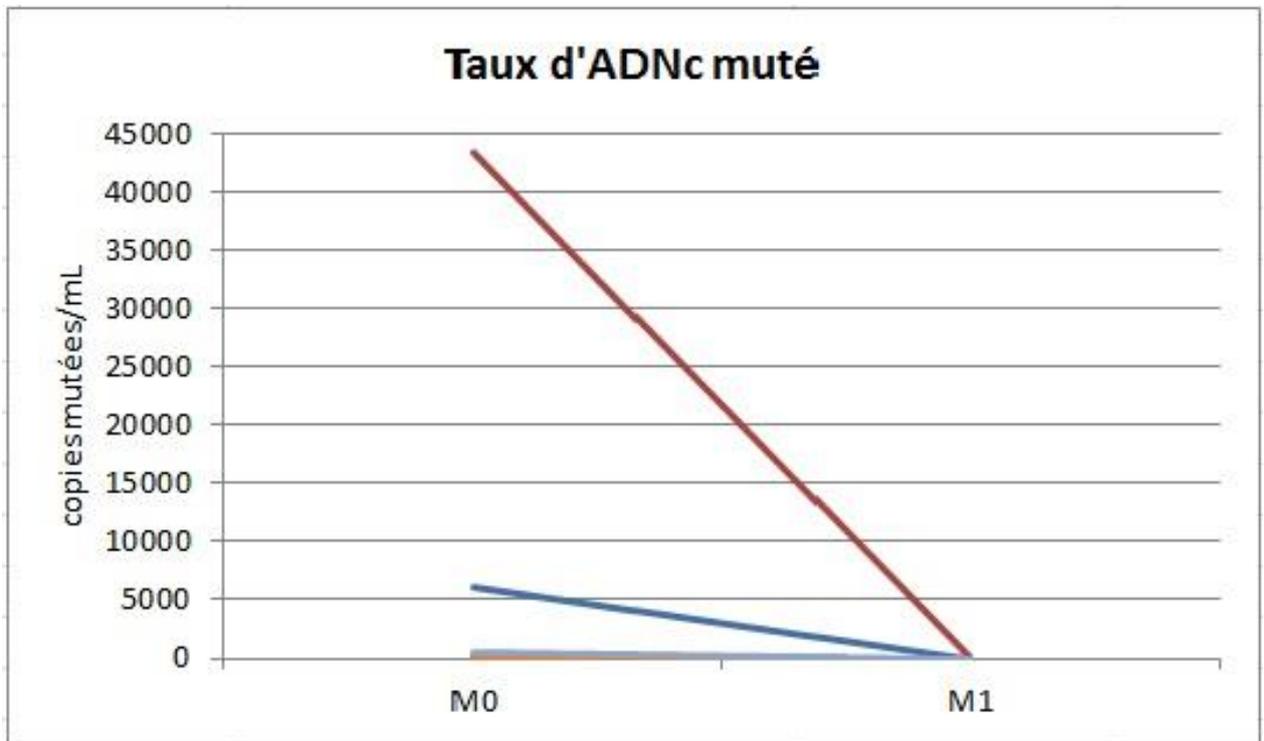


Figure 2 : Evolution du nombre de copies mutées BRAF entre M0 et M1

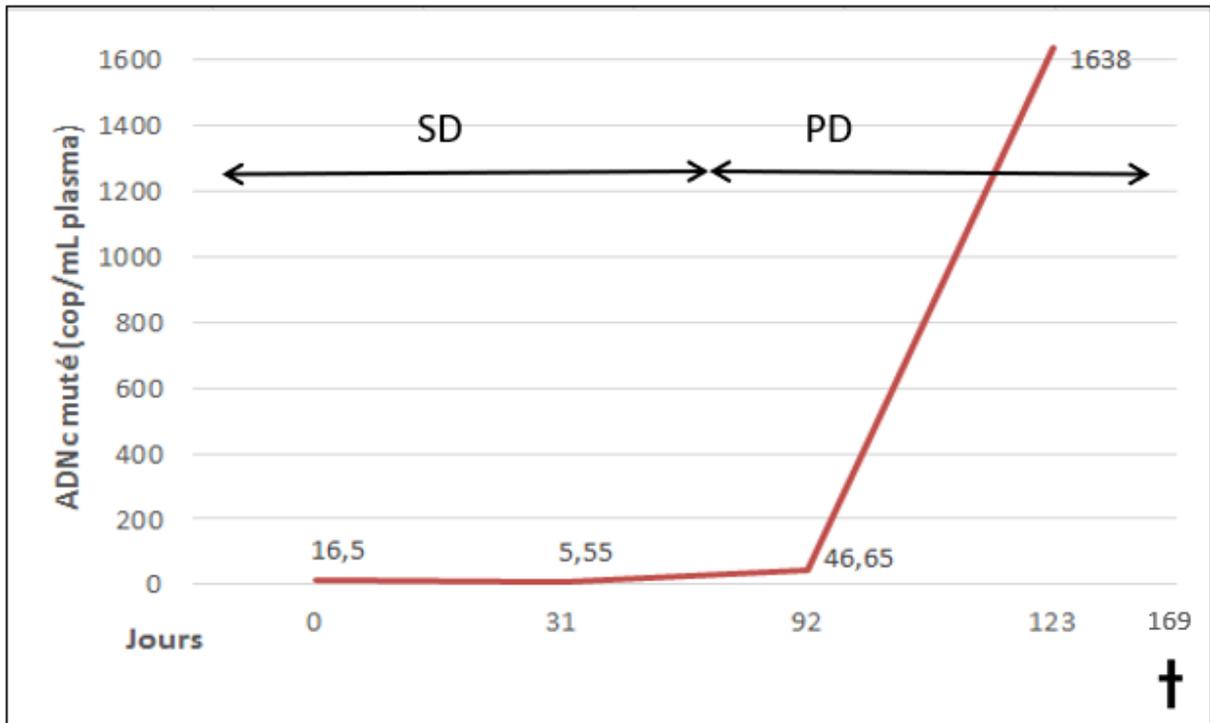


Figure 3 : Evolution de l'ADN circulant muté de la patiente 30, sous dabrafenib et trametinib

Tumeur primitive (T)		
Classification T	Epaisseur (Breslow en mm)	Ulcération
T1	≤ 1 mm	a: ≤ 0,8 mm sans ulcération b: 0,8 mm avec ulcération ou > 0,8 et < 1 mm avec ou sans ulcération
T2	> 1 et ≤ 2	a: sans ulcération b: avec ulcération
T3	> 2 et ≤ 4	a: sans ulcération b: avec ulcération
T4	> 4 mm	a: sans ulcération b: avec ulcération
Ganglions lymphatiques régionaux (N)		
Classification N	Nombre de ganglions métastatiques	Masse métastatique ganglionnaire
N1	1 ganglion régional ou métastases régionales <u>intralymphatiques</u> sans métastase ganglionnaire	a: <u>micrométastase</u> (cliniquement occulte) b: <u>macrométastase</u> (cliniquement apparente) c: métastase(s) en transit sans métastase régionale ganglionnaire
N2	2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases régionales <u>intralymphatiques</u> avec métastases ganglionnaires	a: <u>micrométastases</u> b: <u>macrométastases</u> c: métastase(s) en transit avec une seule métastase régionale ganglionnaire
N3	≥ 4 ganglions ou métastase(s) en transit avec ≥ 2 ganglions lymphatiques régionaux métastatiques	a: <u>micrométastases</u> b: <u>macrométastases</u> c: métastase(s) en transit avec ≥ 2 métastases régionales ganglionnaires
Métastases à distance (M)		
Classification M	Site métastatique	Taux de LDH sériques
M1a	Métastase(s) cutanée(s), sous-cutanée(s), ganglionnaire(s) à distance	0: Normal 1: Elevé
M1b	Métastase(s) pulmonaire(s)	0: Normal 1: Elevé
M1c	Autres localisations métastatiques non associées au système nerveux central	0: Normal 1: Elevé
M1d	Métastases associées au système nerveux central	0: Normal 1: Elevé

Figure 4: Classification TNM du mélanome (8^{ème} édition de l'AJCC) (14)

Stades	T	N	M
0	Mélanome in situ	N0	M0
IA	T1a T1b		
IB	T2a		
IIA	T2b T3a		
IIB	T3b T4a		
IIC	T4b		
IIIA	T1a T1b T2a	N1a ou N2a	M0
IIIB	T1a T1a T2a	N1b ou N1c ou N2b	
	T2b T3a	N1 ou N2a ou N2b	
IIIC	T1a T1b T2a T2b T3a	N2c ou N3	
	T3b T4a T4b	N1 ou N2 ou N3	
IIID	T4b	N3	
IV	Tout T	Tout N	M1

Regroupement par stades (Classification TNM du mélanome, 8^{ième} édition) (14)

Lésions cibles	Lésions non-cibles	Nouvelle lésion	Réponse globale
RC	RC	Non	RC
RC	Non RC/Non PD	Non	RP
RC	Non évalué	Non	RP
RP	Non PD ou pas tous évalués	Non	RP
SD	Non PD ou pas tous évalués	Non	SD
Pas tous évalués	Non PD	Non	Non évaluable
PD	Indifférent	Oui ou non	PD
Indifférent	PD	Oui ou non	PD
Indifférent	Indifférent	Oui	PD

Figure 5: Critères RECIST version 1.1 permettant de classer l'évolution tumorale en réponse complète (RC), réponse partielle (RP), stabilisation (SD), progression (PD). (21)

TITRE DE LA THESE :

INTÉRÊT DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT ANALYSÉ PAR PCR DIGITALE : ÉTUDE RÉTROSPECTIVE DE 35 PATIENTS ATTEINTS DE MÉLANOME MÉTASTATIQUE MUTÉ BRAF

AUTEUR : ELSA MARION

RESUME :

Introduction : Il n'existe pas de biomarqueur établi pour suivre l'évolution des mélanomes. L'analyse de l'ADN tumoral circulant (ADNct) détecte les mutations spécifiques des tumeurs et pourrait permettre d'évaluer la réponse au traitement des mélanomes mutés *BRAF*. L'objectif de notre étude était d'évaluer si les variations de taux d'ADNct étaient ou non corrélées à l'évolution de la maladie.

Patients et méthodes : Dans cette étude rétrospective, les patients avec des mélanomes mutés *BRAF* et 2 biopsies liquides (BL) analysées par PCR digitale entre 01/2016 et 05/2019 étaient inclus.

Résultats : Au total, 35 patients étaient inclus. La mutation détectée sur l'ADNct était identique à la mutation tissulaire pour tous les patients. Dix patients étaient prélevés avant l'initiation thérapeutique puis régulièrement. Les médianes de survie sans progression et globale étaient de 7 mois et 9 mois respectivement. Avant traitement, l'ADNct était détecté chez 90% de ces patients avec une médiane de 78,7 copies mutées *BRAF*/mL de plasma [écart interquartile: 15,51–504,41]. A un mois, l'ADNct était indétectable chez tous les patients qui répondaient au traitement. Treize patients étaient en rémission complète et les BL restaient négatives. Les variations de l'ADNct étaient toujours corrélées à l'évolution du mélanome, sauf pour 4 patients (progression cérébrale, cutanée ou pulmonaire exclusives).

Conclusion : L'analyse de l'ADNct par PCR digitale est fiable avec une bonne concordance des mutations plasmatiques et tissulaires. Pour les mélanomes *BRAF* mutés, les BL ont un intérêt dynamique et pronostique permettant de prédire la réponse au traitement et d'aider aux décisions thérapeutiques.

MOTS-CLES : MELANOME – BIOPSIE LIQUIDE – ADN CIRCULANT – BRAF – PCR DIGITALE