

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année : 2017

N° 165

T H E S E

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

DES de Biologie médicale

par

Guillaume HERBRETEAU
Né le 27 juillet 1986 à Nantes

Présentée et soutenue publiquement le 11 octobre 2017

**SUIVI DU MELANOME CUTANE METASTATIQUE TRAITÉ PAR IMMUNOTHERAPIE ANTI-PD1,
PAR L'ANALYSE DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT**

Président : Madame le Professeur Gaëlle QUEREUX

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Marc DENIS

Remerciements

A Madame le Professeur Gaëlle QUEREUX,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de ma thèse, et vous avez participé, au travers des trois stages d'externe que j'ai réalisé dans votre service, à nourrir mon intérêt pour la dermatologie. Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ce travail, et plus largement aux projets que nous menons au sein du laboratoire de génétique des cancers de Nantes. Recevez ici toute ma reconnaissance et l'expression de mon plus profond respect.

A Monsieur le Professeur Marc DENIS,

Je n'aurai pas assez de ces quelques lignes pour vous exprimer ma plus profonde reconnaissance pour la confiance que vous m'avez accordé depuis mon arrivée dans votre service. Plus encore, depuis les bancs de la faculté, lors des ED de biochimie de ma première année de médecine, jusqu'à mon internat puis, prochainement, mon assistantat, vous avez fortement marqué mon parcours étudiant et professionnel, et vous avez participé à faire de moi le médecin que je suis aujourd'hui. Vous avez su me guider avec patience tout au long de l'élaboration de cette thèse, et pour cela, je souhaite vous exprimer toute ma gratitude et toute ma sympathie.

A Madame le Professeur Hélène BLONS,

En me recevant pendant 6 mois dans votre service d'oncologie moléculaire, à l'Hôpital Européen Georges Pompidou, vous m'avez fait découvrir avec pédagogie le séquençage haut-débit, son interprétation et les décisions cliniques qui en résultent. Sans ces connaissances, une partie des résultats présentés dans cette thèse n'auraient pas pu voir le jour. Il était donc important à mes yeux de pouvoir vous présenter ce travail, et je vous remercie de me faire l'honneur de participer au jury de ma thèse. Recevez ici toute ma reconnaissance.

A Madame le Docteur Edith BIGOT,

Cette thèse marque, pour moi, le passage de la vie d'étudiant à la vie d'enseignant. Et pourtant, cette vie d'enseignant a déjà débuté grâce à vous. Je vous remercie vivement pour la confiance que vous avez su m'accorder, et je souhaite vous exprimer toute ma gratitude pour votre participation à mon jury de thèse.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	2
Abréviations	4
Introduction	6
1 Epidémiologie du mélanome cutané.....	6
2 Traitements du mélanome cutané métastatique.....	7
2.1 Thérapies ciblées.....	8
2.1.1 Inhibiteurs de BRAF.....	8
2.1.2 Inhibiteurs de MEK.....	11
2.2 Immunothérapies.....	12
2.2.1 Immunothérapie anti-CTLA-4.....	15
2.2.2 Immunothérapies anti-PD1.....	17
3 Biomarqueurs évalués pour la prédiction de la réponse aux anti-PD1.....	22
4 Suivi radiologique.....	26
5 Biomarqueurs évalués pour le suivi.....	29
6 L'ADN tumoral circulant.....	30
6.1 Facteurs préanalytiques.....	31
6.1.1 Nature du prélèvement : plasma vs sérum.....	31
6.1.2 Traitement préanalytique et conservation.....	31
6.1.3 Extraction de l'ADN circulant.....	32
6.2 Méthodes de détection et de quantification.....	33
6.2.1 PCR quantitative.....	33
6.2.2 PCR digitale.....	35
6.2.3 Next-Generation Sequencing.....	35
6.3 Suivi du mélanome cutané métastatique.....	36
Matériel et méthodes	40
1 Patients et prélèvements.....	40
2 Quantification de l'ADN tumoral circulant.....	41
3 Mise au point des critères d'évaluation.....	44
4 Analyses statistiques.....	45
5 Aspects règlementaires et éthiques.....	45
Résultats	46
1 Patients.....	46
2 Concentration basale d'ADN tumoral circulant.....	49
3 Analyse cinétique de l'ADN tumoral circulant.....	52
3.1 Patients.....	52
3.2 Détectabilité de l'ADN tumoral circulant au cours du suivi.....	54
3.3 Suivi quantitatif de l'ADN tumoral circulant.....	57
3.3.1 Corrélation entre variations de l'ADNtc et évolution clinique.....	57
3.3.2 Mise au point des critères d'évaluation.....	59
3.3.3 Réponse biologique à la première évaluation biologique.....	65
3.3.4 Stratégie de suivi.....	67
3.3.5 Evaluation du modèle de suivi.....	69
Discussion	72
Conclusion	78
Bibliographie	79
Annexe : Cinétiques individuelles	89

Abréviations

ADNtc	ADN tumoral circulant
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARMS	Amplification-Refractory Mutation System PCR
BEAMing digital PCR	Beads, Emulsions, Amplification and Magnetics Digital PCR
BRAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, homolog B
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COLD PCR	CO-amplification at Lower Denaturation temperature PCR
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, homolog C
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte associated-Antigen-4
ddPCR	Droplet Digital PCR
dPCR	Digital PCR
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
FDA	U.S. Food and Drug Administration
iCPD	immune Confirmed Progressive Disease (iRECIST)
iCR	immune Complete Response (iRECIST)
iPR	immune Partial Response (iRECIST)
IrRC	Immune-related Response Criteria
IrCR	Immune-related Complete Response (IrRC)
iRECIST	immune Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
IrPR	Immune-related Partial Response (IrRC)

IrSD	Immune-related Stable Disease (IrRC)
IrPD	Immune-related Progressive Disease (IrRC)
iUPD	immune Unconfirmed Progressive Disease (iRECIST)
KRAS	Kirsten RAt Sarcoma viral oncogene homolog
LDH	Lactate DeHydrogenase
MEK	Mitogen-activated protein kinase-kinase
NGS	Next-Generation Sequencing
NRAS	Neuroblastoma RAt Sarcoma viral oncogene homolog
Pb	Progression biologique
PD1	Programmed-cell Death 1
PD-L1	Programmed- cell death-ligand 1
PD-L2	Programmed- cell death-ligand 2
PNA	Peptide Nucleic Acid
qPCR	PCR quantitative en temps-réel
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	RAt Sarcoma viral oncogene
Rb	Réponse biologique
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
Sb	Stabilité biologique
TCR	T-Cell Receptor
WHO	World Health Organisation
WT	Wild-Type (allele sauvage)

Introduction

1 EPIDEMIOLOGIE DU MELANOME CUTANE

Le mélanome cutané, cancer développé aux dépens des mélanocytes de la peau, représente le 10^{ème} cancer le plus incident en France avec 14 325 nouveaux cas estimés pour l'année 2015 (Hommes : 7083 cas, 13,6 cas/100 000 personnes par année ; Femmes : 7242 cas, 13,5 cas/100 000 personnes par année) (1). Néanmoins, il s'agit également du cancer dont l'incidence progresse le plus, tous cancers confondus, en particulier chez l'homme (Hommes : +2,9%/an entre 2005 et 2012 ; Femmes : +1,7%/an entre 2005 et 2012). Il est prévu un doublement de son incidence au cours des 20 prochaines années.

Le mélanome cutané est le plus souvent diagnostiqué à un stade localisé (stade I de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC)) : le pronostic est alors très favorable, avec une survie à 5 ans de 98,5%. Néanmoins, la maladie reste diagnostiquée, dans environ 15% des cas, au stade métastatique locorégional (stade III AJCC) ou à distance (stade IV AJCC). Dès lors que le mélanome atteint un stade avancé, le pronostic devient sombre, avec une survie à 5 ans de 62,9% au stade III, et de 19,9% au stade IV, selon les données américaines (2).

Ainsi, avec 1773 décès estimés pour l'année 2015 (Hommes : 1033 décès ; Femmes : 740 décès), la mortalité par mélanome cutané représente respectivement 1,2% et 1,1% des décès par cancer masculins et féminins. Bien qu'elle suive la dynamique de l'incidence, l'évolution de la mortalité a ralenti entre 2005 et 2012 chez l'homme (+0,1%/an entre 2005 et 2012), et s'est même inversée chez la femme (-1,8%/an entre 2005 et 2012), en partie grâce aux effets des campagnes de détection précoce favorisant le diagnostic du mélanome à un stade localisé.

2 TRAITEMENTS DU MELANOME CUTANE METASTATIQUE

Si le traitement du mélanome localisé repose principalement sur l'exérèse chirurgicale de la lésion primitive, la prise en charge du mélanome cutané métastatique à distance (stade IV) ou localement avancé inopérable (stade III inopérable) repose essentiellement sur l'usage des thérapies systémiques.

Néanmoins, le mélanome cutané métastatique se distingue par sa très grande résistance aux chimiothérapies conventionnelles. Ainsi, jusqu'au début des années 2010, seule la dacarbazine était approuvée en Europe, en monothérapie, avec un taux de réponse estimé entre 13 à 20%, pour une efficacité de courte durée (survie sans progression médiane : 6 à 9 mois) (3). Malgré une augmentation du taux de réponse observée pour de nombreuses combinaisons associant la dacarbazine à d'autres chimiothérapies (cisplatine, carmustine, tamoxifène, procarbazine, bleomycine, vindesine), aucune n'a montré de bénéfice sur la survie (4).

En France, la fotemustine a également été approuvée pour le traitement du mélanome cutané métastatique, sur la base d'un essai de phase III montrant un retard à l'apparition de métastases cutanées par rapport à la dacarbazine, sans toutefois montrer de bénéfice sur la survie sans progression ni sur la survie globale (5).

C'est dans ce contexte qu'au début des années 2010, la prise en charge et le pronostic du mélanome cutané métastatique ont été considérablement modifiés par deux révolutions majeures : le développement des thérapies ciblées, d'une part, et des immunothérapies, d'autre part.

2.1 THERAPIES CIBLEES

2.1.1 Inhibiteurs de BRAF

Le développement des inhibiteurs de BRAF (vemurafenib, dabrafenib) a permis d'améliorer le pronostic de la maladie.

BRAF est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire, par l'intermédiaire de la voie de signalisation intracellulaire RAS-RAF-MEK-ERK. Physiologiquement, l'activation de BRAF est dépendante de sa liaison aux protéines RAS, elles-mêmes activées par des récepteurs à tyrosine kinase transmembranaires. Sous forme active, BRAF déclenche une cascade de signalisation intracellulaire, en phosphorylant les kinases MEK1 et MEK2, qui activent à leur tour les kinases ERK1 et ERK2, induisant leur translocation vers le noyau, où elles régulent les facteurs de transcription Elk1, c-Fos et c-Myc, impliqués dans la prolifération, la migration, la différenciation et la survie cellulaire (Figure 1) (6).

La dérégulation de la voie RAS-RAF-MEK-ERK, liée à l'acquisition d'une mutation activatrice par le gène de l'une de ces protéines, est impliquée dans la carcinogénèse de la majorité des mélanomes.

Le gène *BRAF* est le plus fréquemment muté, porteur d'une altération dans environ 40% des cas (7,8). Il s'agit le plus souvent de mutations des exons 11 et 15 du gène, codant pour le domaine kinase de la protéine. Dans environ 80% des cas, la mutation est retrouvée sur le codon 600 (exon 15) et substitue une valine par un acide glutamique (mutation p.V600E). Les mutations de *BRAF* étaient retrouvées dans 33,4% des cas au CHU de Nantes, entre 2013 et 2016 (Tableau 1). La mutation p.V600E de *BRAF* est liée le plus souvent à la substitution d'une thymine par une adénine en position 1799 du gène. Cette mutation n'est pas caractéristique des altérations génétiques liées aux ultra-violets (9), et est par ailleurs plus souvent présentée par les mélanomes du tronc et des zones non-photo exposées (7). Enfin, la mutation *BRAF* p.V600E est retrouvée dans environ 80% des nævi bénins (10) : les études de culture cellulaire ont montré que cette mutation n'était pas suffisante à elle seule pour induire la carcinogénèse des mélanocytes, et provoquait la sénescence cellulaire de cellules de naevus, responsable de l'arrêt du cycle cellulaire (11).

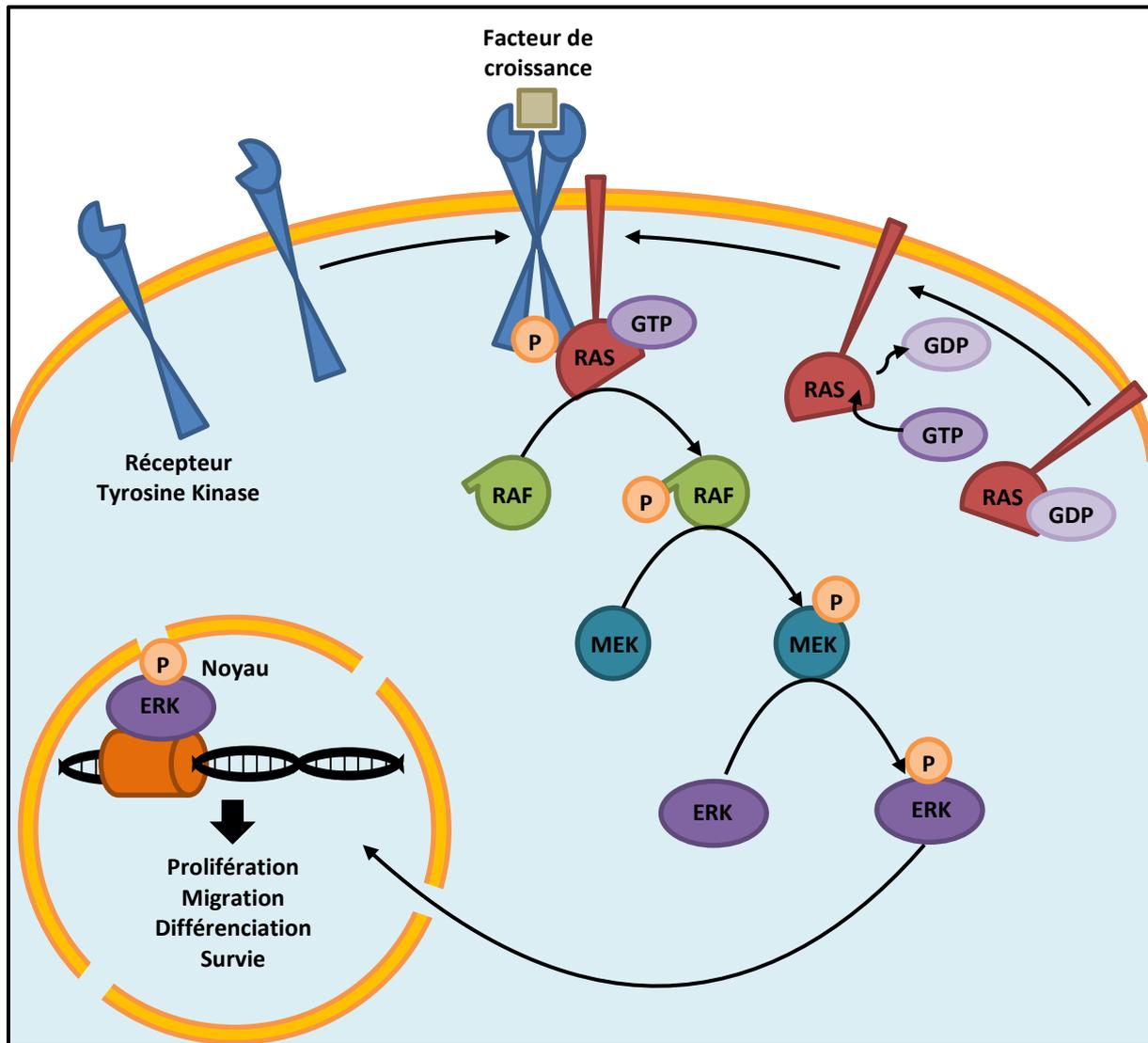


Figure 1. Voie RAS-RAF-MEK-ERK. La présence de facteurs de croissance cellulaire entraîne l'activation des récepteurs à tyrosine kinase membranaires par dimérisation. Les récepteurs à tyrosine kinase activés favorisent le recrutement et l'activation des protéines RAS par échange d'un GDP contre un GTP. RAS activée phosphoryle les protéines RAF, qui activent MEK1 et MEK2, qui phosphorylent à leur tour les kinases ERK1 et ERK2. ERK 1/2 sont transloqués dans le noyau, où ils régulent plusieurs facteurs de transcription.

Les mutations des gènes des protéines RAS sont également fréquentes : au CHU de Nantes, elles étaient retrouvées dans 27,8% des cas entre 2013 et 2016 (Tableau 1). Elles sont exclusives des mutations du gène *BRAF*. Il s'agit dans la plupart des cas de mutations activatrices du gène codant pour l'isoforme NRAS, alors que les altérations de l'isoforme KRAS restent rares. Les mutations activatrices de NRAS impliquent essentiellement le codon 61 (exon 3), et rarement les codons 12, 13 (exon 2) du gène. Les mutations du codon 61 peuvent être induites par les UV, et sont le plus souvent présentées par les mélanomes touchant la peau endommagée par l'exposition solaire (7).

	EFFECTIF	% du TOTAL	% PARMIS
Mutations de BRAF	497	33,4%	% PARMIS BRAF
Dont : <i>BRAF</i> p.V600E	393	26,4%	79,0%
<i>BRAF</i> p.V600K	58	3,9%	11,7%
Autres	46	3,1%	9,3%
Mutations de NRAS	414	27,8%	% PARMIS NRAS
Dont : <i>NRAS</i> p.Q61R	193	13,0%	46,6%
<i>NRAS</i> p.Q61K	111	7,4%	26,8%
<i>NRAS</i> p.Q61L	53	3,6%	12,8%
<i>NRAS</i> p.Q61H	23	1,5%	5,6%
Autres	34	2,3%	8,2%

Tableau 1. Fréquence des mutations des gènes *BRAF* et *NRAS* retrouvées sur l'ADN tissulaire de mélanomes cutanés métastatiques, entre 2013 et 2016, au CHU de Nantes.

La découverte de la grande fréquence de la mutation *BRAF* p.V600E dans le mélanome cutané métastatique par Davies et al. a stimulé le développement de molécules inhibitrices de la protéine BRAF altérée (8).

Le vemurafenib est le premier inhibiteur de BRAF à avoir obtenu une AMM, en 2012, pour le traitement en première ligne du mélanome cutané métastatique porteur d'une mutation *BRAF* p.V600. L'essai randomisé de phase III BRIM-3 a évalué l'efficacité du vemurafenib par rapport à la dacarbazine sur la survie globale et la survie sans progression de 675 patients atteints de mélanome métastatique de stade IIIc non-résécable ou de stade IV porteurs de la mutation p.V600E du gène *BRAF* (12,13). Le vemurafenib a démontré un bénéfice sur la survie globale et la survie sans progression, avec une survie globale médiane et une survie sans progression médiane de 13,6 mois et 6,9 mois, respectivement, contre 9,7 mois et 1,6 mois pour le bras dacarbazine. Un second inhibiteur de BRAF, le dabrafenib, a également obtenu une AMM en 2013 pour le traitement en première ligne du mélanome cutané métastatique muté *BRAF* p.V600E, en démontrant une efficacité thérapeutique du même ordre que celle du vemurafenib, dans l'essai de phase III BREAK-3 (14). Ces deux molécules ont également montré une efficacité sur les mélanomes porteurs de la mutation -plus rare- p.V600K du gène *BRAF*.

Etonnamment, les études moléculaires montrent que les inhibiteurs de BRAF ne bloquent pas la signalisation des protéines RAF. En effet, si ces molécules empêchent l'activation de BRAF, elles favorisent également l'activation des autres protéines RAF, en particulier CRAF (15). Si ce phénomène est sans impact lorsque la dérégulation de la voie RAS-RAF-MEK-ERK est liée à une altération activatrice de BRAF, il la majeure paradoxalement pour les cellules présentant des altérations activatrices en amont des protéines RAF (mutation activatrice de NRAS ou de certains récepteurs à tyrosine kinase).

Par ce mécanisme, les inhibiteurs de BRAF favorisent le développement de lésions cancéreuses cutanées non-mélanomateuses, et peuvent aggraver la progression des mélanomes cutanés non-mutés *BRAF*, en particulier si une altération de *NRAS* est présente. Cela justifie la réalisation, pour tout mélanome métastatique, d'un génotypage tumoral par l'une des 28 plateformes hospitalières de génétique des cancers, avant toute décision thérapeutique. L'institut National du Cancer recommande la recherche, au minimum, des mutations du codon 600 de *BRAF*, et de l'exon 3 de *NRAS* (16).

Si la réponse thérapeutique aux inhibiteurs de BRAF est souvent spectaculaire, la progression secondaire est inévitable, en quelques mois : ainsi, à un an, les patients traités par inhibiteurs de BRAF ont une survie globale et une survie sans progression similaires à celle des patients traités par dacarbazine. L'échappement thérapeutique aux inhibiteurs de BRAF peut impliquer la dérégulation d'autres voies de signalisation oncogéniques, l'apparition d'amplifications ou de mutations secondaires activatrices de MEK ou ERK, ou la réactivation paradoxale de la voie RAS-RAF-MEK-ERK et, parallèlement, de la voie PI3K-AKT-mTOR par des mutations secondaires de *NRAS* ou de récepteurs à tyrosine kinase, selon le mécanisme décrit ci-dessus (17).

2.1.2 Inhibiteurs de MEK

Plus récemment, le tramétinib, un inhibiteur sélectif de MEK1 et MEK2, a prouvé, en essai de phase III, un bénéfice sur la survie globale et sur la survie sans progression par rapport à la dacarbazine chez les patients porteurs d'une mutation du codon 600 de *BRAF* (18). En association avec les inhibiteurs de BRAF, les inhibiteurs de MEK permettent de limiter l'activation paradoxale de la voie RAS-RAF-MEK-ERK, retardant l'échappement thérapeutique tout en limitant le développement de cancers cutanés. L'association du vemurafenib à un autre inhibiteur de MEK, le cobimétinib a montré dans l'étude de phase III coBRIM, sur 495 patients naïfs de traitement, atteints de mélanomes de stade III non-résécables ou de stade IV porteurs de mutations *BRAF* p.V600, un bénéfice sur la survie sans progression (survie sans progression médiane : 12,3 mois contre 7,2 mois) et sur la survie globale (survie globale médiane : 22,3 mois contre 17,4 mois) par rapport au vemurafenib en monothérapie (Fig. 2) (19). Une seconde bithérapie, associant le dabrafénib au tramétinib, a montré des résultats similaires en phase III (20). Depuis 2015, l'association d'inhibiteurs de BRAF et de MEK est indiquée en première intention pour le traitement des mélanomes cutanés métastatiques porteurs d'une mutation *BRAF* p.V600.

2.2 IMMUNOTHERAPIES

L'immunothérapie est une alternative thérapeutique de choix dans le cas où le mélanome n'est pas muté *BRAF* p.V600, ou en seconde ligne après un traitement inhibiteur de BRAF.

L'échappement de la cellule cancéreuse à la réponse immunitaire antitumorale est l'une des caractéristiques essentielle à sa survie (21). Les immunothérapies ont pour objectif de produire un effet antinéoplasique indirect, via les effecteurs du système immunitaire, en réduisant la tolérance vis-à-vis de de la cellule tumorale. Deux classes thérapeutiques ont l'AMM en 1ère ligne de traitement des mélanomes métastatiques non mutés *BRAF* p.V600 : les anticorps anti-CTLA-4 (ipilimumab), et les anticorps anti-PD1 (nivolumab, pembrolizumab). Ces deux immunothérapies ciblent des mécanismes de régulation de l'activation du lymphocyte T CD8+ cytotoxique (LT8).

Les LT8 possèdent un récepteur spécifique, le TCR, susceptible de reconnaître à la surface des cellules des séquences peptidiques issues de la synthèse protéique endogène, et présentées sur le CMH de classe I. Les cellules tumorales exprimant des protéines altérées présentent à leur surface des peptides modifiés, susceptibles d'être reconnus par les LT8, et de déclencher leurs fonctions effectrices cytotoxiques. L'immunogénicité des cellules tumorales est donc en partie déterminée par la synthèse de ces néo-antigènes, et donc par la présence de mutations faux-sens au sein de leur génome (22). La cellule de mélanome possédant, en moyenne, la charge mutationnelle la plus importante, tous cancers confondus (23), elle est habituellement fortement immunogène, et constitue un candidat idéal pour un traitement par immunothérapie (24).

La mise en œuvre des fonctions effectrices du LT8 nécessite deux étapes de reconnaissance de l'antigène tumoral par le TCR : dans un premier temps, le lymphocyte doit reconnaître le peptide antigénique présenté par une cellule présentatrice d'antigène (CPA : cellule dendritique, macrophage) pour lui permettre d'acquérir ses fonctions cytotoxiques ; dans un second temps, le LT8 effecteur doit reconnaître l'antigène tumoral présenté par une cellule cancéreuse pour se réactiver et induire sa lyse.

L'acquisition par le LT8 naïf de ses fonctions effectrices au contact des CPA a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires. L'interaction du TCR avec un peptide antigénique présenté par le CMH de classe I induit un premier signal d'activation lymphocytaire, insuffisant à lui seul pour conférer au LT8 ses fonctions cytotoxiques.

Ce premier signal provoque néanmoins le recrutement de molécules d'adhérence induisant la formation d'une « synapse immunologique », c'est-à-dire une zone de contact rapproché entre le LT8 et la CPA leur permettant d'échanger de nombreux signaux de costimulation ou d'inhibition du LT8.

Le principal signal de costimulation échangé au sein de la synapse implique la liaison du récepteur transmembranaire lymphocytaire CD28 avec ses ligands, les protéines B7-1 et B7-2 (ou CD80 et CD86) présentes à la surface de la CPA (Figure 2). La liaison de CD28 à ses ligands déclenche une cascade de signalisation intracellulaire impliquant la voie PI3K-Akt, aboutissant à l'activation des facteurs de transcription NFκB, NFAT et AP-1. Ces facteurs de transcription induisent la survie, la prolifération et l'acquisition des fonctions cytotoxiques par le LT8. Après activation dans les tissus lymphoïdes, le LT8 effecteur peut migrer vers les tissus périphériques et se réactiver au contact d'une cellule présentant l'antigène tumoral. La réactivation du LT8 effecteur au contact d'une cellule tumorale reste régulée (notamment par PD-L1, voir ci-dessous), mais n'est plus dépendante de la costimulation par CD28/B7-1/2 : le LT8 peut donc mettre en œuvre ses fonctions cytotoxiques (sécrétion de perforine et de granzyme, expression membranaire de Fas-ligand) et induire l'apoptose de la cellule cancéreuse (25).

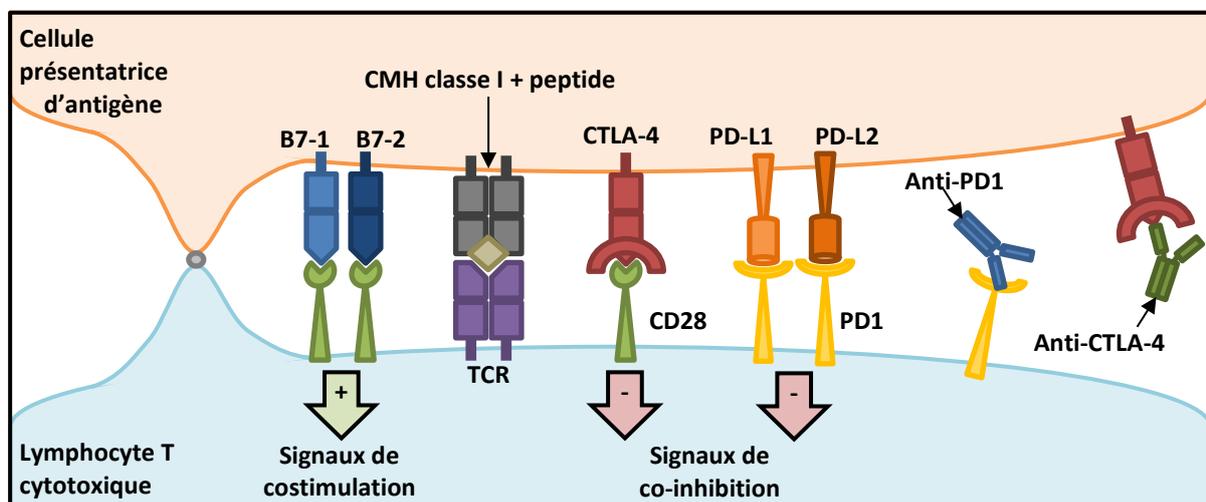


Figure 2. Second signal d'activation lymphocytaire, mécanismes régulateurs et mode d'action des immunothérapies anti-CTLA-4 et anti-PD1

Néanmoins, l'activation du LT8 est modulée par de nombreux signaux inhibiteurs, jouant un rôle dans la tolérance immunitaire périphérique. Deux molécules jouent un rôle majeur dans l'inhibition du LT8 : Cytotoxic T Lymphocyte associated-Antigen 4 (CTLA-4, ou CD152) et Programmed-cell Death 1 (PD1).

CTLA-4 est une protéine transmembranaire, exprimée par le LT8, et impliquée dans l'inhibition du second signal d'activation lymphocytaire, lors du contact avec les CPA dans les organes lymphoïdes secondaires. CTLA-4 est un analogue structurel de CD28, qui possède une meilleure affinité que CD28 pour ses ligands (26). Ainsi, la liaison de CTLA-4 aux protéines B7-1 et B7-2 empêche leur interaction avec CD28 par compétition, et empêche ainsi l'activation du LT8 par les CPA. En l'absence de second signal d'activation lymphocytaire, le LT8 entre en anergie : il devient alors incapable de générer une réponse cytotoxique vis-à-vis des cellules cancéreuses présentant l'antigène tumoral (25). L'expression de CTLA-4 est majorée par la stimulation lymphocytaire prolongée, notamment en cas de néoplasie persistante (27).

PD1 est également une protéine de la famille CD28, exprimée à la surface du LT8. PD1 possède deux ligands, structurellement proches des protéines B7-1/2 : PD-L1 et PD-L2 (ou B7H1 et B7-DC). PD-L1 est exprimé par de nombreuses cellules (lymphocytes T naïfs, CPA, cellules endothéliales, cellules des ilots de Langerhans pancréatique), et participe à la régulation de la fonction lymphocytaire T au niveau des tissus périphériques, tandis que PD-L2 est principalement exprimée par les CPA, et est impliqué dans le contrôle de l'activation lymphocytaire T dans les organes lymphoïdes secondaires (28). La liaison de PD1 à ses ligands induit le blocage de l'activation du LT8 par l'activation de tyrosines phosphatases intracellulaires inhibitrices de la voie PI3K-Akt (25). Tout comme CTLA-4, l'expression de PD1 par les lymphocytes est majorée par la stimulation lymphocytaire prolongée, notamment lors du développement de tumeurs immunogènes (27). Pathologiquement, certaines cellules cancéreuses peuvent exprimer PD-L1 sous l'influence de la sécrétion lymphocytaire d'interféron γ , ou par l'activation de voies oncogéniques encore mal caractérisées, et ainsi échapper à la réponse immunitaire antitumorale en inhibant la réactivation des LT8 à leur contact (28).

2.2.1 Immunothérapie anti-CTLA-4

Les immunothérapies anti-CTLA-4 et anti-PD1 sont dites « bloqueuses de checkpoints immunitaires » : elles visent à restaurer la réponse immunitaire antitumorale par le blocage des signaux inhibiteurs du LT8.

L'ipilimumab est la première immunothérapie à avoir été approuvée, en 2011, pour le traitement du mélanome cutané métastatique. Il s'agit d'une IgG1 ciblant les épitopes du site de liaison de CTLA-4 aux protéines B7-1/2 : la neutralisation de CTLA-4 par l'ipilimumab induit une levée d'inhibition du second signal d'activation lymphocytaire lors du contact LT8-CPA au sein des organes lymphoïdes secondaires. L'ipilimumab a montré son efficacité dans un essai de phase III : 676 patients atteints de mélanomes de stade III non-résécable ou de stade IV ont été randomisés en double aveugle entre 3 bras, selon un ratio 3:1:1 : ipilimumab associé à un vaccin peptidique dérivé d'un antigène tumoral de mélanome, la glycoprotéine 100 (gp100), ipilimumab en monothérapie, et le vaccin gp100 en monothérapie. Les bras ipilimumab seul et ipilimumab + vaccin gp100 ont montré un bénéfice sur la survie globale, avec une survie globale médiane de 10 mois pour ces 2 bras, contre 6,4 mois pour le bras gp100 seul (Figure 3). Les taux de survie associés aux bras ipilimumab + vaccin, ipilimumab seul et vaccin seul étaient, respectivement, de 43,6%, 45,6% et 25,3% à 1 an et 21,6%, 23,5% et 13,7% à deux ans (29). Une étude rétrospective portant sur 1861 patients inclus dans 10 essais thérapeutiques testant l'ipilimumab a montré que le taux de survie globale des patients traités par ipilimumab en monothérapie se stabilisait à environ 20% à partir de la 3^{ème} année, jusqu'à la 10^{ème} année (30). Néanmoins, l'étude des courbes de survie sans progression montre que la majorité des patients ne tire pas de bénéfice d'un traitement par ipilimumab, avec des taux de réponse de 10,9% à 15,2% seulement (29,31).

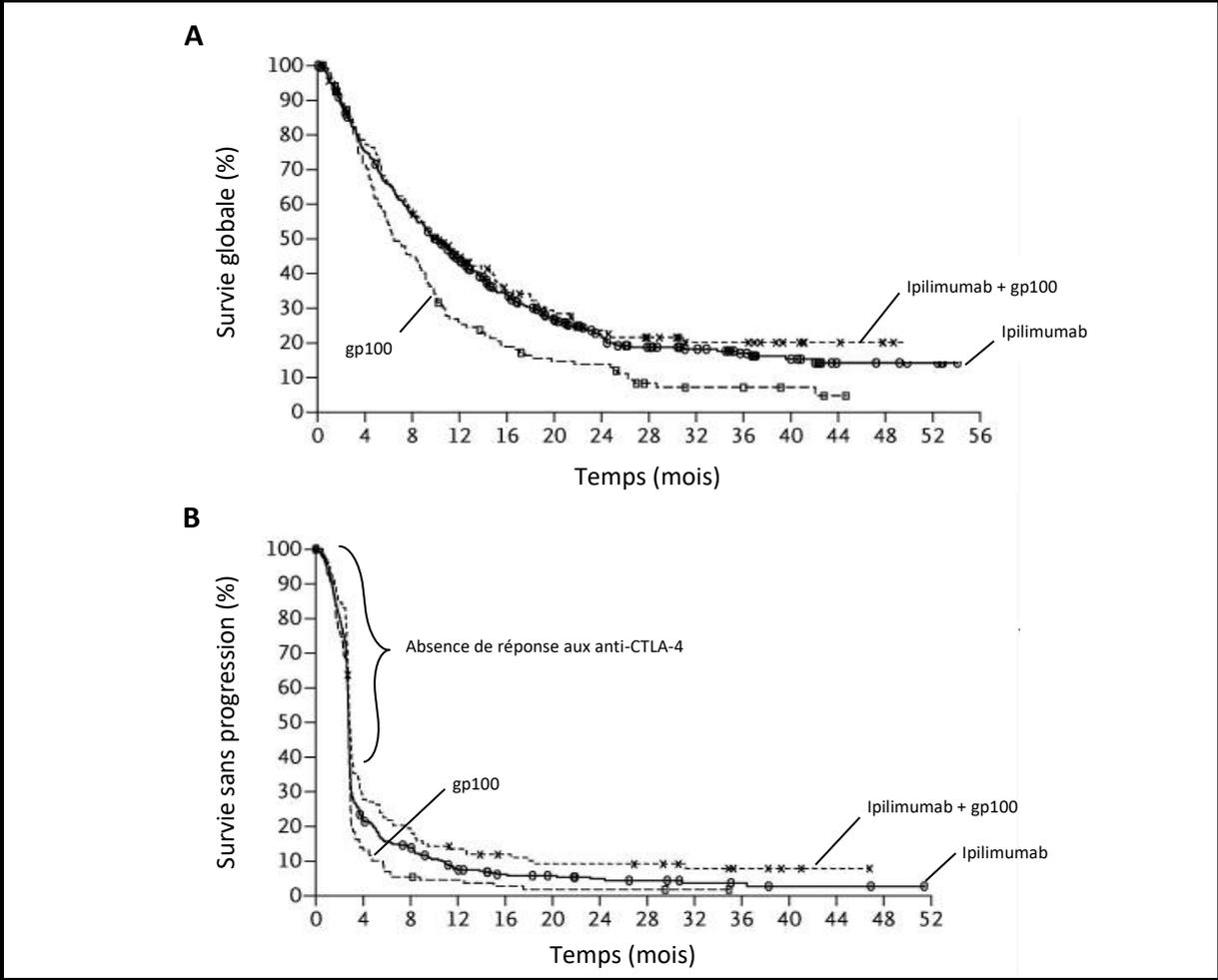


Figure 3. Estimation de Kaplan-Meier de la survie globale (A) et sans progression (B) des patients traités par ipilimumab seul ou par vaccin gp100 seul, ou leur association. D'après Hodi et al. (29)

2.2.2 Immunothérapies anti-PD1

Plus récemment, deux immunothérapies anti-PD1 ont été approuvées pour le traitement du mélanome cutané métastatique : le nivolumab et le pembrolizumab. Ces deux molécules sont des IgG4 monoclonales ciblant le site de liaison du récepteur lymphocytaire PD1 à PD-L1 et PD-L2 : la neutralisation de PD1 permet de lever l'inhibition de la réactivation du LT8 au contact des cellules tumorales exprimant PD-L1, ainsi que l'inhibition du second signal d'activation lymphocytaire lors du contact du LT8 avec des CPA exprimant PD-L2 au sein des organes lymphoïdes secondaires.

Le nivolumab fait la preuve de son efficacité dans un essai de phase III comparant nivolumab et dacarbazine chez 418 patients atteints de mélanome de stade III non-résécable ou de stade IV, non-porteurs de la mutation *BRAF* p.V600E, et naïfs de tout traitement antérieur (Figure 4). Cette étude a montré un bénéfice du nivolumab sur la survie globale à 1 an (72,9%, contre 42,1%), sur la survie sans progression (survie sans progression médiane : 5,1 mois contre 2,2 mois) avec un taux de réponse supérieur à celui de la dacarbazine (40,0% contre 13,9%) (32). Un second essai de phase III, comparant le nivolumab à la chimiothérapie chez 405 patient ayant préalablement progressé sous ipilimumab ou sous inhibiteur de BRAF, a montré que le nivolumab était associé à un taux de réponse supérieur à la chimiothérapie (27% contre 10%), ainsi que des durées de réponse plus longues (médiane : 31,9 mois contre 12,8 mois), suggérant l'efficacité du nivolumab comme traitement de seconde ligne (33). Du fait d'effets confondants liés au cross-over des patients ayant progressé sous chimiothérapie, la méthodologie de cette étude n'a pas pu démontrer de bénéfice du nivolumab sur la survie globale et la survie sans progression en seconde ligne de traitement. Le nivolumab a également démontré sa supériorité par rapport à l'ipilimumab dans une seconde étude portant sur 631 patients atteints de mélanome de stade avancé, et n'ayant pas reçu de traitement antérieur (34). Le traitement par nivolumab était associé à un bénéfice sur la survie sans progression par rapport à l'ipilimumab (survie sans progression médiane : 6,9 mois contre 2,9 mois), avec des taux de réponse de 43,7% et 19,0%, respectivement. Au moment de l'analyse, les données de survie globale n'étaient pas évaluables.

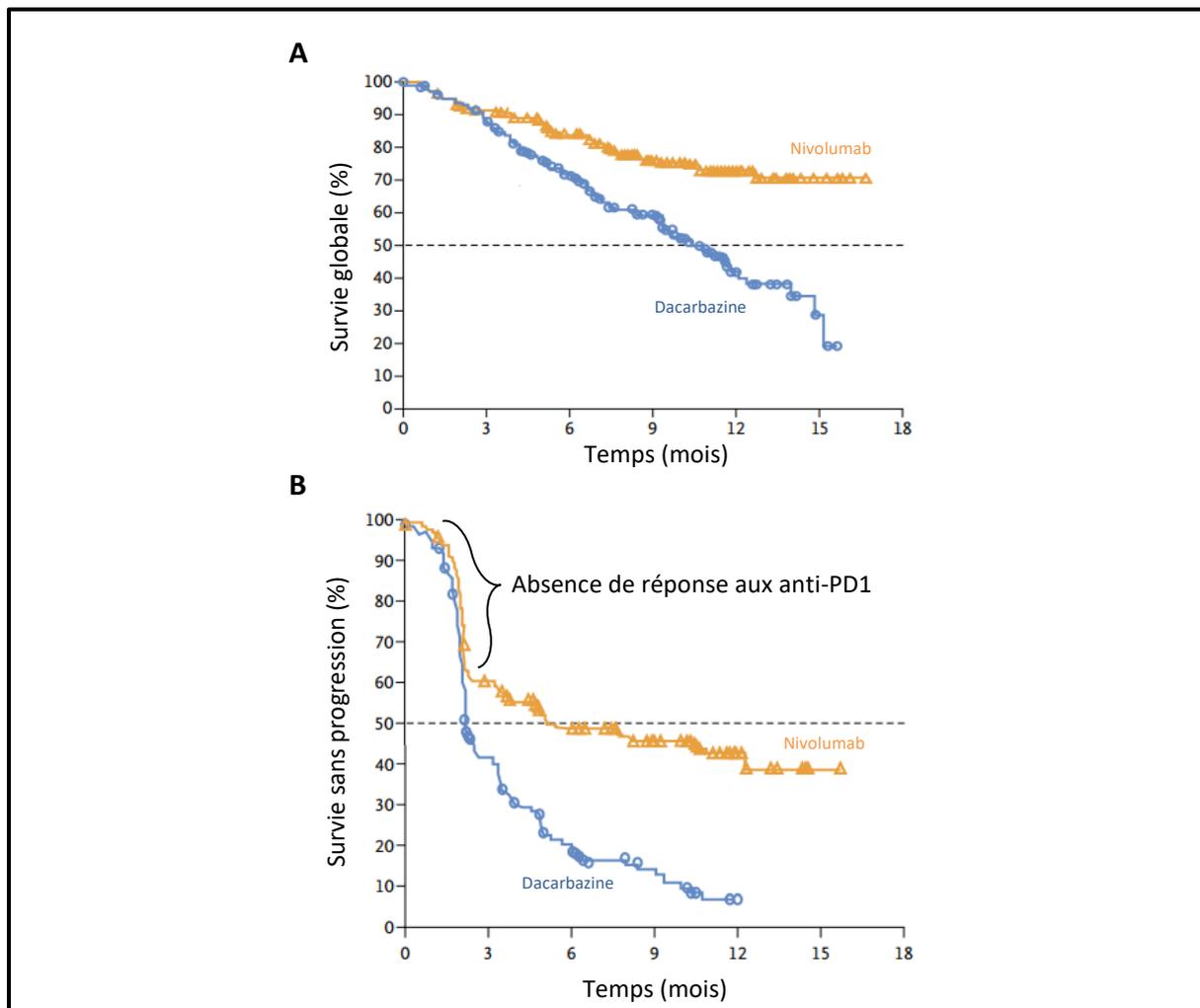


Figure 4. Estimation de Kaplan-Meier de la survie globale (A) et sans progression (B) des patients traités par nivolumab ou dacarbazine.

D'après Robert et al. (32)

Le pembrolizumab a également démontré une supériorité par rapport à la chimiothérapie en seconde ligne de traitement. Dans l'étude de phase II KEYNOTE-002, portant sur 540 patients atteints de mélanome cutané métastatique de stade III non-résécable ou de stade IV, ayant progressé après un traitement par ipilimumab ou par inhibiteur de BRAF, 180 patients ont été traités par pembrolizumab à une dose 2mg/kg, 181 patients ont reçu du pembrolizumab à 10mg/kg, et 179 patients ont été traités par chimiothérapie. Les deux bras pembrolizumab ont montré un bénéfice sur la survie sans progression par rapport à la chimiothérapie, sans différence entre les deux dosages. Le taux de réponse était de 25% pour les deux bras pembrolizumab, contre 12% pour la chimiothérapie (35).

L'efficacité du pembrolizumab a également été comparée à celle de l'ipilimumab au cours de l'essai de phase III KEYNOTE-006. Dans cette étude, 834 patients atteints de mélanome de stade avancé, et naïfs de tout traitement par ipilimumab, ont été randomisés selon un ratio 1:1:1 en 3 bras : pembrolizumab 10mg/kg toutes les 2 semaines, pembrolizumab 10mg/kg toutes les 3 semaines, et ipilimumab. Les bras pembrolizumab toutes les 2 semaines et pembrolizumab toutes les 3 semaines étaient supérieurs à l'ipilimumab sur la survie sans progression, avec des médianes de survie sans progression de 5,5 mois, 4,1 mois et 2,8 mois, pour des taux de réponse de 47,3%, 46,4% et 26,5% respectivement. Les deux bras pembrolizumab étaient aussi associés à un bénéfice sur la survie globale, avec des taux de survie globale à 1 an de 74,1%, 68,4% et 58,2% respectivement (36).

Les études évaluant la survie à long terme des patients traités par immunothérapie anti-PD1 ont montré, de façon similaire à l'ipilimumab, une stabilisation de la survie globale à long terme pour environ 20% des patients traités et, pour les patients ayant présenté une réponse globale, une durée médiane de réponse d'environ 32 mois (33,37).

Plus récemment, plusieurs essais ont testé l'efficacité des immunothérapies anti-PD1 en association à l'ipilimumab. Ainsi, l'association nivolumab-ipilimumab a été évaluée dans une étude de phase III incluant 945 patients atteints de mélanome cutané de stade III non-résécable ou de stade IV, sans métastase cérébrale, avec un état général conservé, et naïfs de toute thérapie systémique. Les patients ont été randomisés entre 3 bras : nivolumab en monothérapie, ipilimumab en monothérapie, ou association nivolumab-ipilimumab. Dans cette étude, l'association nivolumab-ipilimumab a montré des taux de réponse supérieurs au nivolumab et à l'ipilimumab en monothérapies (57,6% contre 43,7% et 19,0%, respectivement), et était associée à un bénéfice sur la survie sans progression (médiane : 11,5 mois, contre 6,9 mois et 2,9 mois, respectivement) (34). La survie globale n'était pas évaluable dans cette étude, au moment de l'analyse, mais une étude de phase II comparant l'association nivolumab-ipilimumab à l'ipilimumab en monothérapie chez 146 patients inclus sur des critères similaires a montré des taux de survie globale à 12 et 18 mois de 79% et 73% pour l'association nivolumab-ipilimumab, contre 62% et 56% pour l'ipilimumab en monothérapie (Figure 5) (38). En revanche ces deux études ont également mis en évidence que l'association des immunothérapies anti-PD1 et anti-CTLA-4 était responsable d'une forte majoration des effets secondaires.

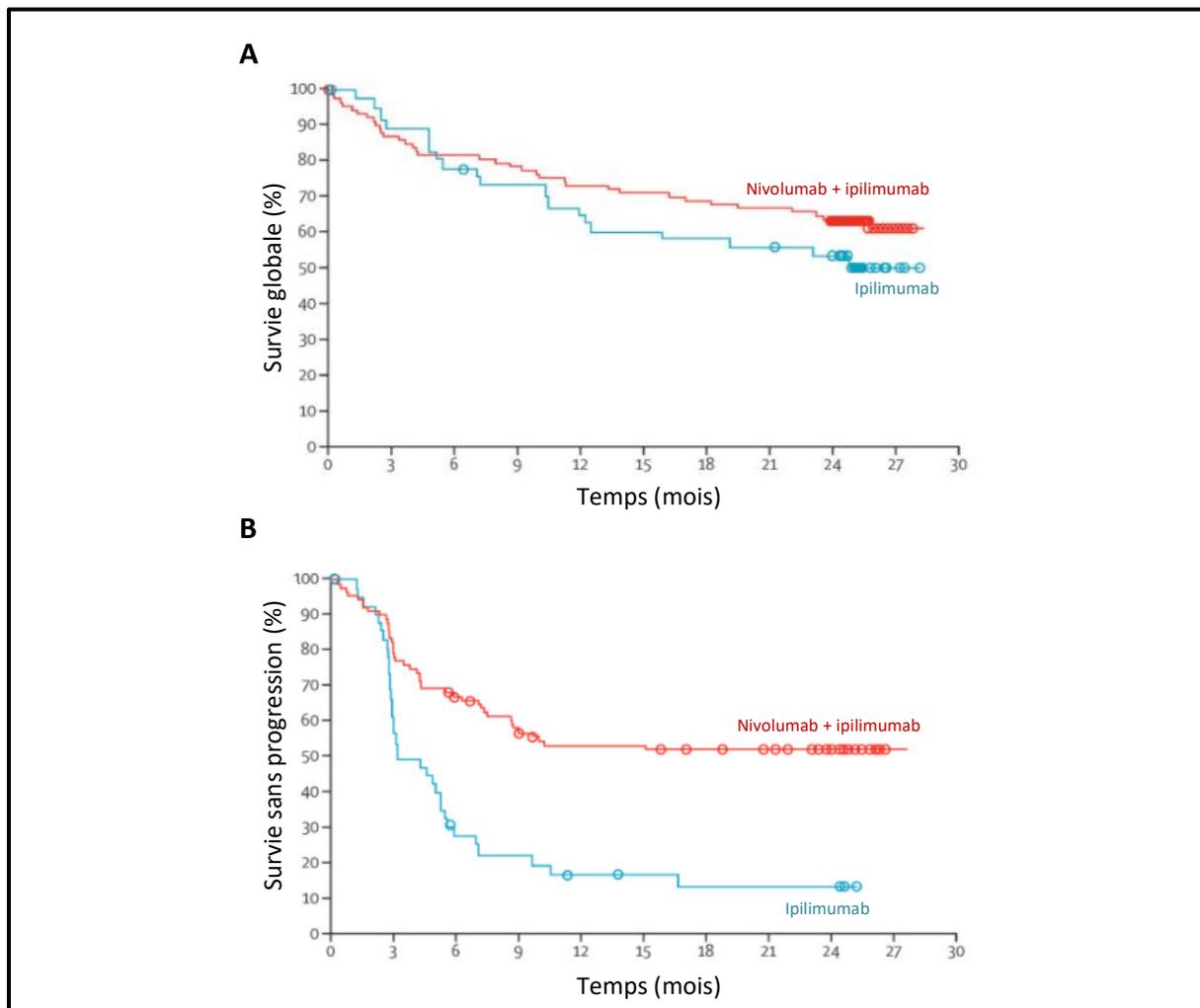


Figure 5. Estimation de Kaplan-Meier de la survie globale (A) et sans progression (B) des patients traités par une association nivolumab-ipilimumab ou ipilimumab seul.

D'après Hodi et al. (38)

Les immunothérapies anti-PD1 sont le plus souvent responsables d'effets indésirables aspécifiques : fatigue, diarrhée, nausée, rash. Cependant, elles peuvent également occasionner des manifestations auto-immunes de sévérité variable, touchant le plus souvent le système digestif (colite, hépatite), la peau (dermatite), les poumons (pneumopathie inflammatoire), les glandes endocrines (hypophysite, thyroïdite) ou le système nerveux (encéphalite, neuropathie, syndrome de Guillain-Barré, syndrome myasthénique) ou les yeux (uvéïte) (39). Si les anti-PD1 présentent, en monothérapie, de meilleurs profils de tolérance que la dacarbazine et que l'ipilimumab, avec, selon les études, 10% à 16% d'effets indésirables de grade 3 ou 4 (32–36), l'association nivolumab-ipilimumab est nettement moins bien tolérée, et occasionne des effets indésirables de grade 3 ou 4 chez environ 55% des patients traités (34,38).

A l'heure actuelle, en France, du fait d'un rapport bénéfice-risque jugé discutable, l'association nivolumab-ipilimumab n'est indiquée en première ligne de traitement que pour une population limitée de patients, atteints de mélanome de stade III non-résécable ou de stade IV, sans métastase cérébrale, en bon état général, non-porteurs d'une mutation *BRAF* p.V600, et traités dans un centre disposant d'un service de réanimation (40). L'association nivolumab-ipilimumab est en revanche approuvée sans restriction d'usage en première ligne de traitement du mélanome cutané métastatique par la FDA aux USA, et par l'Agence Européenne des Médicaments. En monothérapie, les immunothérapies anti-PD1 sont indiquées en première ligne de traitement chez les patients atteints de mélanome de stade avancé (stade III non-résécable ou stade IV) non-porteurs de la mutation *BRAF* p.V600E, et en seconde ligne après échec des inhibiteurs de BRAF chez les patients porteurs de la mutation (41,42). Aucune étude n'ayant comparé directement l'efficacité des anti-PD1 à celle des thérapies ciblées chez les patients porteurs de la mutation *BRAF* p.V600E, la nature du traitement à privilégier en première ligne de traitement reste discutée. Pour cette raison, depuis 2016, chez ces derniers patients, les immunothérapies anti-PD1 peuvent également être administrées en monothérapie dès la première ligne, avant les inhibiteurs de BRAF. Les critères justifiant le choix des anti-PD1 dès la première ligne chez les patients porteurs de la mutation *BRAF* p.V600E ne sont pas établis à l'heure actuelle, néanmoins, les études prouvant l'efficacité des anti-PD1 ayant montré des délais médians avant obtention de la réponse de 2 à 3 mois, l'HAS recommande la prise en compte d'un état général conservé, d'une espérance de vie attendue supérieure à 3 mois et d'un volume tumoral faible ou d'un taux de progression métastatique lent pour décider de l'introduction des anti-PD1 en première ligne chez ces patients (43). L'ipilimumab est indiqué en monothérapie en 2^{ème} ou 3^{ème} ligne, après échec des immunothérapies anti-PD1 (44).

Au total, les immunothérapies anti-PD1 ont révolutionné la prise en charge du mélanome cutané métastatique, en permettant la survie durable d'environ 1 patient traité sur 5. En revanche, l'étude des courbes de survie sans progression révèle que pour une majorité de patients, le traitement n'apporte pas de bénéfice clinique. La détection des patients susceptibles de ne pas répondre aux anti-PD1 est devenue capitale pour pouvoir maximiser le bénéfice thérapeutique, en particulier pour les associations anti-PD1 anti-CTLA-4, pour lesquelles le rapport bénéfice-risque est discuté.

3 BIOMARQUEURS EVALUES POUR LA PREDICTION DE LA REPONSE AUX ANTI-PD1

L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales étant le mécanisme supposé être à l'origine de la tolérance immunitaire induite par la voie PD1, c'est naturellement ce biomarqueur, mesuré par immunohistochimie sur des coupes de biopsies tissulaires tumorales, qui a été le premier développé pour la prédiction de la réponse aux anti-PD1. Plusieurs études ont évalué la valeur prédictive de l'immunomarquage PD-L1 : en considérant un seuil de 5% de cellules cancéreuses exprimant PD-L1, toutes ont démontré que la positivité de l'immunohistochimie PD-L1 était associée à un taux de réponse, une survie sans progression et une survie globale supérieurs à celle des patients PD-L1 négatifs. Néanmoins, l'absence d'expression tumorale de PD-L1 n'est pas prédictive de la non-réponse aux anti-PD1 : ainsi des taux de réponse de 15% à 41% ont été observés chez les patients PD-L1 négatifs traités par nivolumab, et allant jusqu'à 55% chez ceux traités par l'association nivolumab-ipilimumab (32-34,38). La modification du seuil d'expression utilisé n'a pas montré d'amélioration de la valeur prédictive de l'immunohistochimie PD-L1 a posteriori. A l'inverse, l'expression tumorale de PD-L1 ne garantit pas la réponse au traitement : les patients PD-L1 positifs traités par nivolumab en monothérapie présentaient des taux de réponse de 43% à 58%, et jusqu'à 72% pour ceux traités par une association nivolumab-ipilimumab (33,38). Ainsi, avec une valeur prédictive négative estimée à 58% pour le traitement par nivolumab en monothérapie, et même 48% pour l'association nivolumab-ipilimumab, la mesure de l'expression tumorale de PD-L1 apparaît comme un biomarqueur insuffisamment performant pour influencer la stratégie thérapeutique du mélanome cutané métastatique (45).

Les faibles valeurs prédictives de l'immunohistochimie peuvent être expliquées par plusieurs facteurs. Tout d'abord, l'expression de PD-L1 peut être transitoire, peut varier selon les sites tumoraux d'un même patient, et peut même présenter une hétérogénéité intra-tumorale, pouvant ainsi mettre en défaut sa détection sur des coupes tissulaires, en particulier les prélèvements biopsiques de taille réduite. Par ailleurs, en l'absence de consensus technique, plusieurs facteurs analytiques peuvent également influencer sur la détection de PD-L1, en particulier la nature des anticorps utilisés, ou le seuil d'expression considéré.

Ensuite, d'un point de vue biologique, l'immunohistochimie ne permet pas d'exclure une expression de PD-L1 ou de PD-L2 par le micro-environnement tumoral ou par les CPA, susceptible de conférer une sensibilité aux anti-PD1. Enfin, à l'inverse, l'implication d'autres mécanismes de co-inhibition lymphocytaire ou un défaut d'immunogénicité tumorale peuvent expliquer l'absence de réponse chez certains patients PD-L1 positifs.

L'immunogénicité des cellules tumorales est liée à la présence de mutations faux-sens au sein de leur génome, conduisant à l'expression de séquences peptidiques altérées, et à la présentation sur le CMH de classe I de néo-antigènes reconnus par les lymphocytes T. Il a été supposé que la charge mutationnelle, c'est-à-dire la quantité de mutations présentes sur le génome de la cellule tumorale, puisse être prédictive d'une réponse aux immunothérapies anti-PD1. En quantifiant la charge mutationnelle par hybridation-capture et séquençage haut-débit de l'ADN tissulaire tumoral, Johnson et al. ont montré, chez 62 patients atteints de mélanome traité par anti-PD1, qu'un nombre élevé de mutations faux-sens était associé à un meilleur taux de réponse, ainsi qu'à un bénéfice sur la survie sans-progression et sur la survie globale. Néanmoins, la présence d'une charge mutationnelle faible (< 3,3 mutations/Mb) ne permettait pas d'exclure la survenue d'une réponse, avec des taux de réponse observés de 10% à 25% (46). La corrélation entre le taux de réponse et la charge mutationnelle était par ailleurs non-significative, dans une autre étude utilisant le séquençage d'exome pour quantifier les mutations faux-sens des tumeurs de 38 patients atteints de mélanome et traités par anti-PD1 (47). Il apparaît donc que la charge mutationnelle rend compte de façon imparfaite des mécanismes sous-tendant la réponse aux anti-PD1 : elle permet d'évaluer le nombre de néo-antigènes pouvant potentiellement être exprimés par la tumeur, mais elle ne reflète pas leur capacité à déclencher la réponse immunitaire. Il reste pour l'heure difficile d'évaluer, à partir des données de séquençage, la nature des peptides néo-antigéniques présentés par le CMH, ainsi que leur immunogénicité.

Il a aussi été suggéré que la densité de lymphocytes T infiltrant la tumeur puisse être révélatrice de l'existence d'une immunité antitumorale préexistante, et être prédictive de la réponse aux anti-PD1. Tumeh et al. ont ainsi démontré que la densité de lymphocytes T CD8+ au niveau du front d'invasion tumoral, mesurée par immunohistochimie CD8 avant traitement, était significativement corrélée au taux de réponse aux anti-PD1. En considérant un seuil de 1500 LT8/mm³, l'immunohistochimie CD8 du front d'invasion tumoral a permis de prédire, sur une cohorte de validation de 15 patients, 4 patients non-répondeurs sur 5 et 9 patients répondeurs sur 9 (valeur prédictive positive = 90%, valeur prédictive négative= 100%) (48). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude, retrouvant, pour le même seuil, une valeur prédictive positive de 57% et une valeur prédictive négative de 100%, sur une cohorte de 21 patients (49). Néanmoins, pour de nombreux prélèvements tumoraux, en particulier biopsiques, le front d'invasion tumoral n'est pas visualisable, ce qui constitue la principale limitation de ce biomarqueur : ainsi 8 des 21 patients de la précédente étude n'avaient pas pu être évalués pour cette raison, tandis que d'autres études utilisant des prélèvements de taille réduite n'ont pas retrouvé l'association entre la densité de LT8 au front d'invasion et le taux de réponse (50). D'autres populations lymphocytaires ont également été associées à la réponse aux anti-PD1 : Daud et al. ont montré par l'analyse en cytométrie en flux des lymphocytes infiltrant la tumeur, que la présence de lymphocytes « partiellement épuisés », caractérisés par l'expression forte et simultanée de PD1 et CTLA-4, était associée à un meilleur taux de réponse et à un bénéfice sur la survie sans progression (49). Une étude de validation a été menée par la même équipe sur 64 patients traités par nivolumab, et 29 patients traités par l'association nivolumab-ipilimumab. Chez les patients traités par anti-PD1 en monothérapie, la présence de moins de 20% de lymphocytes « partiellement épuisés » était associée à un taux de réponse de 5,6%, contre 66,7% dans le cas inverse. Chez ceux traités par l'association anti-PD1/anti-CTLA-4, le taux de réponse était de 35% en présence de moins de 20% de lymphocytes « partiellement épuisés » contre 70% dans le cas inverse (51). L'une des limitations de cette méthode est technique : elle nécessite la digestion enzymatique de prélèvements tissulaires frais, difficilement réalisable en pratique.

Pour finir, l'analyse du transcriptome tumoral a permis d'établir des signatures d'expression de gènes corrélées à la réponse aux immunothérapies. Ainsi, la réponse du mélanome à l'ipilimumab a été associée, dans 2 études, à une signature incluant l'expression des gènes de la perforine et du granzyme -effecteurs de l'activité cytotoxique des LT8- (24) ainsi que 26 autres gènes codant pour des protéines associées à la fonction lymphocytaire (52). L'expression de l'interféron γ et des gènes dont il induit la transcription a été corrélée à la réponse du mélanome aux anti-PD1 (53). Ribas et al. ont pu établir une signature d'expression de 28 gènes, incluant notamment les gènes de la perforine, du granzyme et de l'interféron γ . Cette signature était associée à la réponse thérapeutique aux anti-PD1 avec une valeur prédictive positive de 59% et une valeur prédictive négative de 90% (54).

Au total, la réponse du mélanome aux immunothérapies anti-PD1 est complexe et multifactorielle. Aucun biomarqueur n'a montré à l'heure actuelle de valeur prédictive suffisante pour pouvoir conditionner l'administration des anti-PD1. Ainsi, s'il n'est pas possible de sélectionner les patients avant l'initiation du traitement, il apparaît essentiel de pouvoir détecter précocement la non-réponse au cours du suivi, afin d'envisager rapidement d'autres alternatives thérapeutiques.

4 SUIVI RADIOLOGIQUE

Le suivi du mélanome cutané métastatique repose essentiellement sur l'évaluation radiologique et clinique des lésions. Néanmoins, cette évaluation est complexe, car la réponse aux immunothérapies peut être atypique. En effet, lors d'un traitement par immunothérapie, la masse tumorale est sous l'influence de deux phénomènes opposés : d'une part, l'infiltration tumorale par les lymphocytes, qui tend à augmenter le volume tumoral apparent, et d'autre part la lyse des cellules tumorales médiée par LT8 activés, qui tend à réduire le volume tumoral. Ainsi, selon l'équilibre existant entre infiltration et lyse tumorale, la réponse thérapeutique peut se présenter sous quatre formes cliniques différentes (Figure 6) : les lésions peuvent diminuer en volume rapidement, mais également rester stables avant une régression lente, augmenter initialement de volume avant régression, voire évoluer de manière dissociée, avec l'apparition de nouvelles lésions simultanément à la réduction du volume tumoral global (55). La réponse thérapeutique aux immunothérapies est mal caractérisée par les échelles d'évaluation standardisées RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) ou WHO (World Health Organization) utilisés communément pour le suivi des tumeurs solides : celles-ci considèrent en effet que l'augmentation du volume tumoral ou le développement de nouvelles lésions constituent des signes de progression de la maladie, et donc d'échec du traitement. On estime que 7% à 15% des patients traités par anti-PD1 présentent une pseudo-progression (56,57).

Afin de pouvoir caractériser la réponse aux immunothérapies, des critères alternatifs ont été établis. Les Immune-related Response Criteria (IrRC), reprennent les critères WHO en modifiant 3 points : i) L'apparition de nouvelles lésions ne définit pas une progression ; ii) les nouvelles lésions, de taille supérieure à 5x5 mm, doivent être incluses dans le calcul du volume tumoral, avec un maximum de 5 lésions cutanées, 10 lésions viscérales et 5 lésions par organe ; iii) la réponse (partielle ou complète) et la progression doivent être attestées par au moins 2 imageries consécutives, séparées d'au moins 4 semaines (Tableau 2) (55).

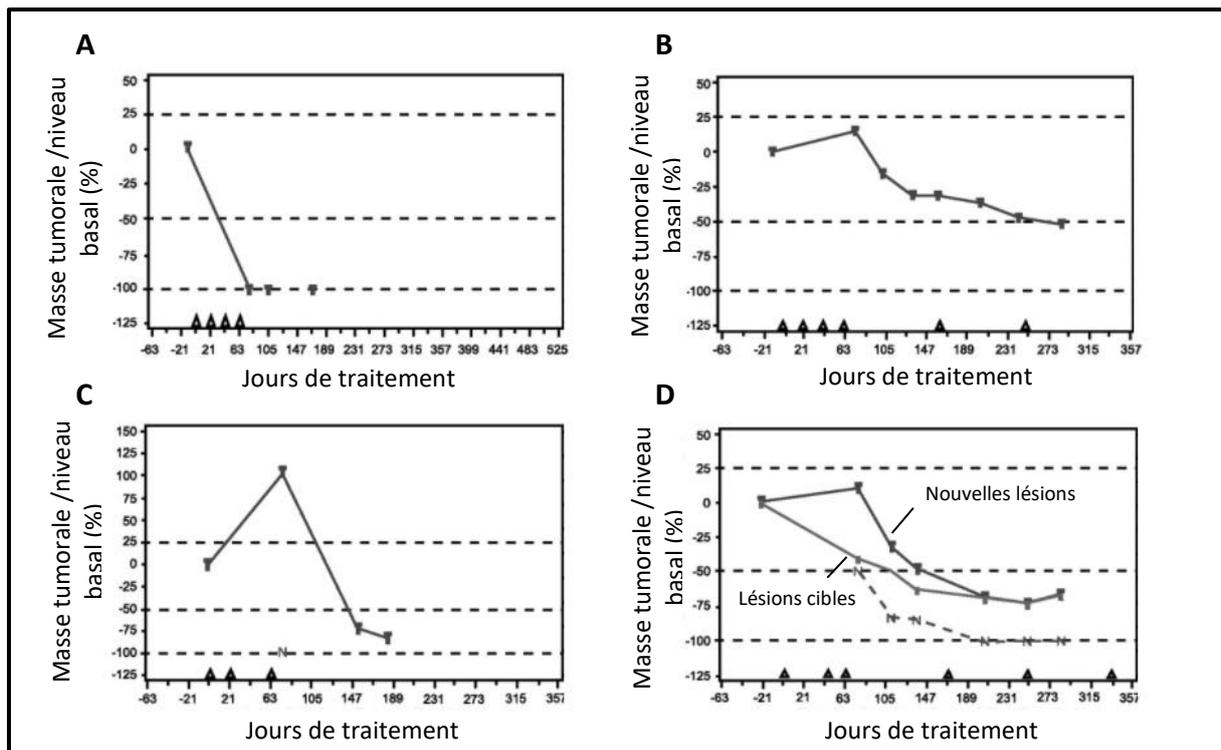


Figure 6. Archétypes de réponse du mélanome métastatique aux anti-PD1. A : réponse initiale. B : stabilité initiale puis réponse lente. C : réponse après progression initiale du volume tumoral. D : réponse dissociée, avec croissance de nouvelles lésions simultanément à la réponse sur d'autres lésions cibles. D'après Wolchok et al. (55)

IMMUNE-RELATED COMPLETE RESPONSE (IRCR)	Disparition complète des lésions cibles et non-cibles. Confirmée par une seconde imagerie à ≥ 4 semaines.
IMMUNE-RELATED PARTIAL RESPONSE (IRPR)	Diminution du volume tumoral $\geq 50\%$ par rapport au niveau basal. Confirmée par une seconde imagerie à ≥ 4 semaines.
IMMUNE-RELATED PROGRESSIVE DISEASE (IRPD)	Augmentation du volume tumoral $\geq 25\%$ par rapport au nadir. Confirmée par une seconde imagerie à ≥ 4 semaines. Statut définitif.
IMMUNE-RELATED STABLE DISEASE (IRSD)	Absence de critères d'IRPR ou d'IRCR ou d'IRPD.

Tableau 2. Caractérisation de la réponse aux immunothérapies par les IrRC.

Les critères IrRC, tout comme les critères WHO, utilisent une mesure bidimensionnelle des lésions cibles (en multipliant le plus long diamètre par le diamètre perpendiculaire). L'usage des IrRC est néanmoins resté limité, la plupart des essais thérapeutiques portant sur les anti-PD1 préférant adapter les critères RECIST v1.1, plus largement utilisés et dont la mesure unidimensionnelle est plus reproductible que celle de l'IrRC, afin d'assurer une meilleure comparabilité inter-études.

Plusieurs adaptations des critères RECIST ont également été proposées (58,59), et reprises récemment dans les recommandations du RECIST working group sous la dénomination de « critères iRECIST ». Les critères iRECIST utilisent la même définition des lésions cibles (lésions de taille supérieure à 10 mm, avec un maximum de 5 lésions au total et 2 lésions par organe) et la même méthode de mesure unidimensionnelle (plus long diamètre) que les critères RECIST v1.1. En revanche, i) l'apparition de nouvelles lésions ne définit pas une progression ; ii) Les nouvelles lésions de taille supérieure à 10 mm sont mesurées séparément des lésions cibles ; iii) l'augmentation de la taille des lésions cibles ou l'apparition de nouvelles lésions définit une « progression non-confirmée » ; iv) l'augmentation de la taille des lésions cibles ou l'augmentation en taille ou en nombre des nouvelles lésions à la visite suivante définit la « progression confirmée » ; v) la réponse (partielle ou complète) est déterminée en fonction de la diminution de la taille des lésions par rapport à la dernière « progression non-confirmée », ou par rapport au niveau basal par défaut ; elle ne nécessite pas de confirmation (60).

IMMUNE COMPLETE RESPONSE (ICR)	Absence de nouvelle lésion. Disparition complète des lésions cibles et non-cibles. Pas de confirmation nécessaire.
IMMUNE PARTIAL RESPONSE (IPR)	Absence de nouvelle lésion. Diminution du volume des lésions cibles $\geq 30\%$ du niveau basal. ou Persistance de lésions non-cibles. Pas de confirmation nécessaire.
IMMUNE UNCONFIRMED PROGRESSIVE DISEASE (IUPD)	Augmentation du volume des lésions cibles $\geq 30\%$ par rapport au nadir ou Augmentation du volume des lésions non-cibles $\geq 30\%$ par rapport au nadir ou Apparition de nouvelles lésions. Statut non-définitif, mais redéfinit le volume tumoral basal.
IMMUNE CONFIRMED PROGRESSIVE DISEASE (ICPD)	A l'évaluation suivant une iUPD : Augmentation du volume des lésions cibles $\geq 30\%$ par rapport à l'iUPD ou Augmentation du volume des lésions non-cibles $\geq 30\%$ par rapport à l'iUPD ou Apparition de nouvelles lésions par rapport à l'iUPD. Statut définitif.
IMMUNE STABLE DISEASE (ISD)	Absence de critères d'iPR ou d'iCR ou d'iUPD.

Tableau 3. Caractérisation de la réponse aux immunothérapies par les critères iRECIST.

Au total, toutes les échelles adaptées à l'évaluation de la réponse aux immunothérapies imposent de confirmer la progression par une seconde évaluation à distance. Ce délai retarde nécessairement la détection des patients non-répondeurs au traitement.

5 BIOMARQUEURS EVALUES POUR LE SUIVI

Ces problématiques de suivi ont généré un fort intérêt pour le développement de marqueurs tumoraux du mélanome métastatique. Plusieurs biomarqueurs protéiques ont été étudiés, en particulier les LDH (lactate déshydrogénases) et la protéine S-100 β .

Les LDH sont des enzymes intracellulaires ubiquitaires impliquées dans la glycolyse anaérobie : elles catalysent la transformation du pyruvate en lactate, de façon réversible. L'activité sérique des LDH augmente au cours de diverses situations impliquant un excès de lyse cellulaire, en particulier certains cancers. Bien que l'activité LDH ne soit pas un marqueur spécifique du mélanome, elle est corrélée à la masse tumorale, et à la survie globale des patients atteints de mélanome cutané métastatique. Ainsi, elle constitue le seul biomarqueur validé par l'AJCC pour la classification pronostique du mélanome cutané métastatique (une valeur élevée définit le stade métastatique M1c) (61). En revanche, l'activité LDH n'est pas corrélée à la réponse thérapeutique aux immunothérapies, et ne peut donc pas être utilisée pour le suivi (62,63).

Les protéines S-100 constituent une famille de protéines intracellulaires dimériques, activées par liaison au calcium, et impliquées dans de nombreuses voies de signalisation régulant notamment la prolifération, la différenciation, la migration et l'apoptose cellulaire. La sous-unité β (protéine S-100 β) est exprimée exclusivement par les cellules dérivées de la crête neurale embryonnaire, notamment par certaines cellules gliales et par les mélanocytes, et dans 98% des cas par les cellules de mélanome (64). En présence de lésions cérébrales ou d'un mélanome cutané, la lyse de ces cellules libère S-100 β dans la circulation. Chez les patients atteints de mélanome de stade IV, la concentration sérique de la protéine S-100 β est corrélée à la masse tumorale, et ses variations au cours du traitement sont associées à la réponse et à la survie sans progression des patients traités par inhibiteurs de BRAF, anti-CTLA-4 ou anti-PD1 (62,65,66). Néanmoins, elle n'est ni suffisamment sensible, ni suffisamment spécifique pour pouvoir détecter de façon fiable les patients non-répondeurs et guider la décision thérapeutique (67).

Au total, il n'existe pour l'heure aucun marqueur protéique validé pour l'évaluation de la réponse du mélanome cutané métastatique aux immunothérapies. Les progrès technologiques des analyses de biologie moléculaire ont permis d'envisager l'utilisation de l'ADN tumoral circulant comme biomarqueur de suivi.

6 L'ADN TUMORAL CIRCULANT

L'ADN circulant correspond à de l'ADN retrouvé dans le compartiment extracellulaire sanguin. Identifiés dès 1948 par Mandel et Métais dans le plasma de sujets atteints de lupus érythémateux, de leucémies et, plus tardivement, de cancers solides (68), nous savons aujourd'hui grâce au développement des techniques de détection que l'ADN circulant est présent dans le sang de tous les individus (69), à une concentration faible, généralement de l'ordre d'une dizaine de ng/mL de plasma (70).

L'ADN circulant est constitué de fragments d'ADN libérés au cours de l'apoptose cellulaire, provenant majoritairement de la lignée hématopoïétique (71). La libération active par les cellules de molécules d'ADN néoformé a également été décrite. La fonction de cette fraction de l'ADN circulant reste encore méconnue (72). Au cours de la pathologie cancéreuse, une fraction variable de l'ADN circulant -généralement très minoritaire- provient de l'apoptose et de la nécrose des cellules tumorales, ou de la lyse des cellules tumorales circulantes présentes dans le compartiment vasculaire (73). L'ADN circulant est constitué essentiellement de fragments d'ADN double brin. Les fragments issus de l'apoptose sont issus de la lyse des portions internucléosomiques de l'ADN : ils ont une taille d'environ 180 pb. Les fragments provenant de la nécrose cellulaire sont plus longs, et de taille très variable, jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de paires de bases (74). L'ADN circulant est présent dans la circulation sous forme de complexes nucléoprotéiques ou adsorbés à la surface des cellules sanguines (75).

La liaison de l'ADN aux protéines permet l'ADN circulant de résister partiellement aux nucléases plasmatiques. In vivo, sa demi-vie a été estimée à 1 h, à partir de l'étude de la clairance de l'ADN fœtal circulant, chez la femme enceinte, après la délivrance (76). Le mode d'élimination de l'ADN circulant reste méconnu : elle s'effectue en deux phases, l'une rapide, sous la dépendance du foie, du rein et de la rate, l'autre lente, par les nucléases plasmatiques (77).

Au total, l'ADN circulant présent dans la circulation au cours de la pathologie cancéreuse est donc partiellement constitué d'ADN d'origine tumorale. L'identification sur ADN circulant d'altérations génétiques spécifiques, similaires à celles observées sur l'ADN de la tumeur, atteste de la présence d'ADN tumoral circulant (ADN_{tc}) et, par conséquent, des cellules cancéreuses dont il est issu.

6.1 FACTEURS PREANALYTIQUES

L'analyse de tout biomarqueur nécessite d'optimiser les conditions de prélèvement, d'acheminement et de stockage, afin d'éviter sa dégradation, ou l'apparition de produits de dégradation interférant avec la mesure.

L'ADNtc est le plus souvent présent en quantité très limitée, et mélangé à des quantités plus importantes d'ADN germlinal circulant. Aussi il convient de bien maîtriser les conditions préanalytiques ainsi que le protocole d'extraction utilisé.

6.1.1 Nature du prélèvement : plasma vs sérum

Dans le cas de l'ADNtc, il est capital de réduire la « contamination » du prélèvement par l'ADN provenant de la lyse des leucocytes circulants. Pour cette raison, l'utilisation de prélèvements sériques doit être évitée, du fait de la libération d'ADN génomique par la lyse in vitro des leucocytes lors de la coagulation (78). Il a en effet été démontré que la quantité d'ADN génomique présente dans le sérum pouvait être 3 à 24 fois supérieure à la quantité présente dans le plasma (78), et s'associait à une diminution de sensibilité de la plupart des techniques de détection de l'ADNtc (79).

La nature de l'anticoagulant utilisé pour le prélèvement plasmatique est variable : l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA) ou le citrate peuvent être utilisés indifféremment. En revanche, le prélèvement hépariné doit être évité, car l'héparine est susceptible d'interférer avec les techniques de PCR réalisées par la suite.

6.1.2 Traitement préanalytique et conservation

L'échantillon prélevé dans un tube EDTA doit être acheminé, centrifugé et décanté dans les 4h qui suivent le prélèvement. Au-delà, on observe une lyse leucocytaire accrue responsable d'une augmentation de la contamination du prélèvement par l'ADN génomique (70,80) [12, 21]. Une conservation à 4°C ne semble pas réduire la lyse (80).

Si la centrifugation n'est pas réalisable dans ces délais, des tubes collecteurs spécifiques peuvent être utilisés. Ils contiennent un stabilisateur permettant de prévenir la lyse cellulaire. Les tubes « Cell-Free DNA BCT blood collection tubes » (Streck, USA) sont les plus utilisés à ce jour. Ils permettent un traitement préanalytique tardif sans contamination par l'ADN leucocytaire, jusqu'à 10 jours après le prélèvement (81-83).

Le plasma est récupéré par centrifugation (1200 à 1600 g pendant 10 min) puis décantation. Il est recommandé de procéder ensuite à une seconde centrifugation du plasma, à vitesse plus élevée (3000 à 16000 g), afin d'éliminer toute contamination cellulaire résiduelle. Cette seconde centrifugation peut être réalisée indifféremment avant ou après congélation de l'échantillon pour stockage (84,85).

Les échantillons plasmatiques doivent être conservés à -20°C ou -80°C. La congélation à -80°C est à privilégier pour le stockage à long-terme : à cette température, l'ADN circulant reste stable pendant au moins 9 mois. Néanmoins, le risque de dégradation significative de l'ADN circulant au cours du temps ne peut pas être exclu, et une conservation trop longue des échantillons semble à éviter. Les cycles de congélation-décongélation représentent également un risque pour la stabilité de l'ADN circulant et doivent être limités : il est recommandé de ne pas excéder 2 à 3 cycles (70).

6.1.3 Extraction de l'ADN circulant

Le choix de la méthode d'extraction de l'ADN circulant est particulièrement déterminant. La littérature rapporte une multitude de protocoles différents, commerciaux ou « maison », basés essentiellement sur la technologie de chromatographie d'échange d'ions, en colonnes à gel de silice ou sur billes magnétiques.

Il n'existe actuellement aucun consensus quant à la méthode d'extraction optimale de l'ADN circulant. Il apparaît néanmoins que toutes les méthodes d'extraction validées pour les prélèvements tumoraux tissulaires ne puissent pas être utilisées pour extraire l'ADN circulant, dont la fragmentation et la faible concentration requiert l'usage de protocoles adaptés.

Deux études comparatives récentes indiquent que les 2 kits les plus fréquemment utilisés (QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit - Qiagen, et Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit - Promega) ont des rendements d'extraction tout à fait comparables (86,87). Les autres systèmes testés permettaient d'obtenir des quantités d'ADN circulant plus faibles.

L'étude prospective non-interventionnelle multicentrique ASSESS, évaluant l'utilité de l'ADNtc pour la recherche de mutations activatrices de l'EGFR dans le cancer bronchique non à petites cellules, a clairement montré que l'utilisation d'une méthode d'extraction non adaptée réduisait significativement le taux de détection des mutations dans le plasma des patients (88).

Le volume de plasma utilisé pour l'extraction est également un paramètre déterminant. La tumeur pouvant ne libérer que de très faibles quantités d'ADN tumoral dans la circulation, il a été démontré que la sensibilité des analyses ultérieures était corrélée au volume de plasma extrait. Ainsi, il est recommandé d'utiliser au moins 2 mL de plasma pour l'extraction de l'ADN circulant. Des volumes plus importants permettent d'obtenir des quantités plus importantes d'ADNtc, mais il n'a pas encore été montré que cela s'accompagnait d'une meilleure sensibilité de détection des altérations génétiques.

6.2 METHODES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION

L'ADNtc est retrouvé dans la circulation à des concentrations extrêmement faibles (de l'ordre de quelques pg/mL), et en présence d'ADN circulant sauvage provenant des cellules saines, en proportion généralement très majoritaire. L'analyse de l'ADNtc nécessite donc l'utilisation de méthodes de détection suffisamment sensibles pour détecter une mutation portée par quelques molécules d'ADN seulement, et capables de s'affranchir du bruit de fond lié à la présence d'une grande quantité d'ADN sauvage (fréquence allélique < 1%). Certaines méthodes classiques, comme le séquençage Sanger (limite de détection \approx 10-20 % de copies mutées) ou le pyroséquençage (limite de détection \approx 5 % de copies mutées) ne sont pas suffisamment sensibles pour être utilisées pour l'analyse de l'ADNtc. Les progrès technologiques récents ont permis de développer plusieurs méthodes d'analyse spécifiques et suffisamment sensibles pour envisager leur application à l'analyse de l'ADNtc.

6.2.1 PCR quantitative

La plupart des études portant sur l'analyse de l'ADNtc sont basées sur des méthodes de PCR temps-réel quantitatives (qPCR) adaptées pour augmenter la sensibilité de détection de l'allèle muté. Leur limite de détection varie de 5 % à 0,001% de copies mutées.

Ces techniques de qPCR utilisent des amorces ou des sondes fluorescentes spécifiques d'allèle, permettant de réaliser l'amplification de l'allèle muté indépendamment de l'allèle sauvage. Plusieurs technologies optimisent ce principe afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité de détection.

L'amplification ARMS (Amplification-Refractory Mutation System PCR) utilise amorce qui est complémentaire, à son extrémité 3', de l'allèle muté. Au cours de la réaction de PCR, l'élongation ne peut être réalisée que si l'extrémité 3' de l'amorce est parfaitement complémentaire du brin matrice, permettant ainsi d'amplifier de façon très préférentielle l'allèle muté sans permettre d'amplification de l'allèle sauvage. C'est le principe utilisé dans les systèmes commercialisés (Therascreen – Qiagen, COBAS - Roche Diagnostics, Entrogen).

Certaines techniques reprennent le même principe de base, mais en ajoutant un PNA (Peptide Nucleic Acid, acide peptidique nucléique) spécifique de l'allèle sauvage dans le milieu réactionnel. Cet analogue nucléotidique, ayant une forte affinité pour l'ADN, permet d'inhiber l'amplification de l'ADN non muté, et ainsi d'améliorer la sensibilité de l'analyse.

La COLD PCR (CO-amplification at Lower Denaturation temperature-PCR) réalise à chaque cycle de la réaction deux étapes de dénaturation-hybridation : une première étape de dénaturation à haute température permet de dissocier l'intégralité des doubles brins d'ADN néoformés. Ensuite, la diminution de la température induit l'hybridation de l'allèle muté, très minoritaire, avec l'allèle sauvage. Les hétéroduplex ainsi obtenus, instables, ont une température de fusion plus basse que les homoduplex de l'allèle sauvage. Une nouvelle étape de dénaturation, à plus basse température, permet la dissociation sélective de ces hétéroduplex, et permet l'amplification spécifique de l'allèle muté.

Au total, les techniques de qPCR permettent une détection simple, rapide et peu coûteuse des mutations d'intérêt sur l'ADNtc. En revanche, il s'agit d'analyses ciblées : malgré la possibilité de multiplexage, le nombre de mutations explorées par ces méthodes reste limité. La qPCR peut permettre une quantification du nombre de copies mutées, le plus souvent relative (quantification en % de copies mutées). Toutefois, une quantification des copies mutées est envisageable en comparant les valeurs obtenues à une gamme étalon.

6.2.2 PCR digitale

Les techniques de PCR digitale (dPCR) ont pour principe commun de partitionner l'extrait d'ADN en plusieurs milliers à plusieurs millions de micro-compartiments, afin d'isoler chaque copie du gène d'intérêt dans un micro-compartiment différent. La nature des micro-compartiments peut varier selon les technologies : il peut s'agir de gouttelettes lipidiques (droplet digital PCR, ddPCR - BioRad), de gouttelettes couplées à des microbilles magnétiques (BEAMing - Sysmex-Inostics) ou de micro-puits (QuantStudio 3D - ThermoFisher). Une PCR en point-final est ensuite réalisée en présence d'une sonde fluorescente spécifique de l'altération recherchée : si un micro-compartiment contient une copie mutée, la réaction produira un signal de fluorescence spécifique, tandis qu'elle émettra un signal différent si le micro-compartiment contient une copie sauvage. La mesure du signal de fluorescence émis par chaque micro-compartiment permet enfin de dénombrer les copies mutées et sauvages du gène d'intérêt. C'est actuellement la seule approche permettant une quantification absolue du nombre de copies d'ADN mutées dans un échantillon.

Les techniques de PCR digitale permettent la détection et la quantification absolue des copies mutées (exprimée en copies/mL plasma), indépendamment du « bruit de fond » causé par la présence de copies sauvages. Leur limite de détection est de l'ordre de quelques copies par réaction, soit 0,01% à 0,001% de copies mutées si un nombre important de copies peut être analysé. En revanche, le multiplexage de la PCR digitale est encore peu développé. Il est en effet plus difficile de rechercher plusieurs mutations simultanément avec les mêmes sensibilités et spécificités.

6.2.3 Next-Generation Sequencing

Le NGS regroupe plusieurs technologies permettant de pré-amplifier, d'isoler, puis de séquencer simultanément plusieurs millions de petits fragments d'ADN en parallèle. Le fait que les régions génomiques d'intérêt soient préalablement amplifiées puis isolées avant séquençage autorise la détection de mutations très faiblement représentées dans l'échantillon. Néanmoins, le risque non-négligeable d'erreur de séquençage pour chacun des fragments n'est pas négligeable, et restreint la sensibilité d'une approche dédiée à l'analyse de prélèvements tissulaires à 1-5% le plus souvent.

La sensibilité du NGS peut être améliorée par certaines techniques d'analyse bio-informatique permettant de prendre en compte le risque d'erreur de séquençage associé à chaque base (89), ou par l'identification de chaque fragment d'ADN par un oligonucléotide servant de « code à barres » unique, permettant de distinguer les altérations introduites artificiellement des vraies altérations présentes à très faible fréquence allélique dans un échantillon (90,91).

Ces approches par NGS présentent l'énorme avantage d'analyser simultanément un grand nombre de gènes. Les adaptations des protocoles mentionnées précédemment permettent d'atteindre une excellente sensibilité. Le coût et le délai de rendu des résultats sont actuellement les 2 points en défaveur de cette approche.

6.3 SUIVI DU MELANOME CUTANE METASTATIQUE

Pour de nombreux cancers, l'ADN circulant a été envisagé comme source d'ADN tumoral alternative aux prélèvements tissulaires pour la recherche de mutations activables par des thérapies ciblées. Les résultats des principales études ayant étudié la détection de mutations de *BRAF* dans le plasma de patients ayant un mélanome métastatique avant traitement sont regroupés dans le tableau 1. L'altération est détectée dans l'ADN circulant par qPCR dans 50 à 75% des cas, et par dPCR dans 65 à 85% des cas environ. Dans la plupart des études la spécificité des tests est très bonne.

Dans un travail récent, nous avons retrouvé les mutations *BRAF* p.V600 chez 29 des 38 patients testés (sensibilité 76,3%) par technologie ARMS [32]. Nous avons pu observer une corrélation entre la détection de l'ADNtc et la survie globale des patients, le nombre de sites métastatiques, l'activité sérique en LDH et la concentration en protéine S-100 β (92).

	STADE	NATURE	VOLUME (mL)	EXTRACTION	ANALYSE	MUTATION		
						TISSULAIRE	SPE.	SEN.
DANIOTTI ET AL., 2007 (93)	III, IV	Sérum	1	QIAamp DNA Blood Mini Kit	qPCR TaqMan	V600E (n = 13) WT (n = 7)	71,4%	38,5%
BOARD ET AL., 2009 (94)	IV	Sérum	1	QIAamp MinElute Virus Spin Kit	qPCR ARMS	V600E (n = 42) V600K (n = 3) WT (n = 49)	93,9%	55,6%
PINZANI ET AL., 2010 (95)	I, II, III, IV	Plasma	0,5	QIAamp DNA Blood Mini Kit	qPCR TaqMan	V600E (n = 29) WT (n = 27)	88,9%	72,4%
AUNG ET AL., 2014 (96)	IV	Plasma Sérum	2	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	qPCR ARMS	V600E (n = 124) WT (n = 84)	96,4%	52,4%
GONZALEZ-CAO ET AL., 2015 (97)	IV	Plasma	NR	NR	qPCR LNA PNA clamp "maison"	V600E (n = 22)	-	57,7%
STADLER ET AL., 2015 (98)	I, II, III, IV	Plasma	4-5	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	qPCR SNPase-ARMS	V600E (n = 9) WT (n = 13)	100%	66,7%
KNOL ET AL., 2016 (92)	IIIc, IV	Plasma	2	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	qPCR ARMS (Therascreen Qiagen)	V600E (n = 29) V600K (n = 7)	100%	75,9%
JANKU ET AL., 2016 (99)	IV	Plasma	NR	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	qPCR TaqMan (Idylla Biocartis)	V600E/K (n = 26) WT (n = 10)	100%	73,1%
SCHREUER ET AL., 2016 (100)	IV	Plasma	NR	Extraction intégrée	qPCR AS (Idylla Biocartis)	V600E/K (n = 16)	-	75,0%
LOUVEAU ET AL., 2017 (101)	III, IV	Plasma	NR	NR	E-ice-COLD PCR	V600E/K (n = 85)	-	68,0%
ASCIERTO ET AL., 2013 (102)	IV	Plasma	NR	NR	PCR digitale (BEAMing Inostics)	V600E (n = 72) V600K (n = 19)	-	79,2%
GRAY ET AL., 2015 (103)	IV	Plasma	1-5	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	PCR digitale (ddPCR BioRad)	V600E (n = 34) WT (n = 22) V600K (n = 8) WT (n = 23) V600R (n = 2) WT (n = 10)	100%	64,7%
SANMAMED, 2015 (104)	IIIc, IV	Plasma	NR	QIAamp DNA Blood Mini Kit	PCR digitale (ddPCR BioRad)	V600E (n = 19)	-	84,3%
CHANG ET AL., 2016 (105)	IIIc, IV	Plasma	1-5	QIAamp DSP Circulating Nucleic Acid Kit	PCR digitale (ddPCR BioRad)	V600E (n = 20) V600K (n = 2)	-	80,0%
SANTIAGO-WALKER ET AL., 2016 (106)	IV	Plasma	NR	NR	PCR digitale (BEAMing Inostics)	V600E (n = 661) V600K (n = 85)	97,6%	76,2%
JANKU ET AL., 2016 (99)	IV	Plasma	NR	QIAamp DNA Purification Kit	PCR digitale (BEAMing Inostics)	V600E/K (n = 24)	100%	75,0%
GARLAN ET AL., 2017 (107)	IV	Plasma	NR	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	PCR digitale (ddPCR RainDrop)	V600E (n = 10) V600K (n = 1)	100%	72,0%

Tableau 4. Performances diagnostiques des protocoles de détection des mutations du codon 600 de BRAF sur ADN tumoral circulant. Spé : spécificité ; Sen : sensibilité.

La quantité d'ADNtc est corrélée à la masse tumorale (104,106). Cette relation a rapidement permis d'envisager l'utilisation de l'ADNtc comme marqueur tumoral spécifique pour le suivi thérapeutique du mélanome métastatique.

La plupart des études ont concerné le monitoring du mélanome traité par inhibiteur de BRAF. Les patients concernés étant nécessairement porteurs d'une mutation *BRAF* p.V600, c'est naturellement cette cible moléculaire qui a été utilisée pour quantifier l'ADNtc. Toutes ces études ont rapporté une corrélation entre les concentrations d'ADNtc mesurées et la réponse clinique aux inhibiteurs de BRAF, mais la plupart d'entre elles incluaient un nombre de patients trop faible pour être statistiquement interprétables. Les travaux de Sanmamed et al., portant sur 20 patients traités par inhibiteur de BRAF, ont montré que la réponse au traitement était associée à une diminution significative de la quantité d'ADNtc par rapport à la concentration basale, puis s'accompagnait d'une ré-augmentation significative de l'ADNtc lors de l'échappement thérapeutique (104). L'étude de Schreuer et al., incluant 36 patients traités par l'association inhibiteur de BRAF – inhibiteur de MEK, retrouvait des résultats similaires. La diminution de l'ADNtc accompagnant la réponse était observable rapidement, après 6 à 40 jours de traitement (médiane = 13 jours). Aucune augmentation de l'ADNtc n'était observable au cours de la réponse, tandis qu'une augmentation de l'ADNtc était observée chez 70% des patients en échappement thérapeutique, et précédait le diagnostic clinique de progression pour 44% des patients (100).

Le monitoring de la réponse aux immunothérapies par l'ADNtc est plus complexe : l'administration des immunothérapies n'étant pas conditionnée par la présence d'une quelconque mutation, il faut au préalable déterminer pour chaque patient quelle mutation somatique sera recherchée au cours du suivi et/ou limiter le suivi à certains patients sélectionnés en fonction des mutations retrouvées sur matériel tumoral. Peu d'études ont évalué l'utilisation de l'ADNtc pour le monitoring du mélanome métastatique traité par immunothérapie. Lipson et al. ont observé une augmentation brève suivie d'une diminution rapide de l'ADNtc précédant la réponse radiologique, chez un patient présentant une fausse progression à la phase initiale de la réponse à l'ipilimumab. De plus, les mêmes auteurs ont constaté, sur 4 patients porteurs de mutations des gènes *BRAF*, *NRAS* ou *TERT*, une augmentation de l'ADNtc associée à la progression (108).

Cette corrélation entre la cinétique de l'ADNtc et la réponse thérapeutique aux immunothérapies a également été constatée par Tsao et al. sur une série de 4 patients porteurs de mutations *BRAF* p.V600E, *BRAF* p.V600K et *NRAS* p.Q61H (109). En revanche, Gray et al. restaient plus réservés sur l'existence de cette corrélation, retrouvant une diminution significative du niveau d'ADNtc associée à la réponse thérapeutique chez seulement 2 patients sur 4 (103). Au total, du fait de leurs faibles effectifs, aucune de ces études n'a pu déterminer si le suivi des concentration d'ADNtc pouvait permettre de prédire la réponse aux anti-PD1.

Récemment, l'étude de Lee et al. a tenté d'établir pour la première fois des critères d'évaluation des cinétiques d'ADNtc, chez sur 76 patients traités par anti-PD1, seuls ou en association à l'ipilimumab. L'ADNtc était indétectable à l'initiation du traitement, ou l'est devenu avant la 12^{ème} semaine pour 58 patients : 43/58 ont présenté une réponse aux anti-PD1, soit un taux de réponse à 3 mois de 74% ; 9/58 (16%) ont en revanche progressé en moins de 3 mois. A l'inverse, l'ADNtc était resté détectable à 12 semaines pour 18 patients : seulement 1/18 patients ont répondu aux anti-PD1, soit un taux de réponse de 6% ; 13/18 (72%) ont progressé en moins de 3 mois. La persistance de la détectabilité de l'ADNtc à la 12^{ème} semaine était associée à un pronostic défavorable en survie sans progression et en survie globale. Ces résultats ont été confirmés sur une cohorte de validation de 29 patients (110).

Malgré des résultats encourageants, les critères proposés par cette étude ne permettent pas de d'exclure la présence d'un bénéfice clinique chez les patients dont l'ADNtc reste détectable, et par ailleurs, la nécessité d'un suivi de 12 semaines pour détecter ces patients limite la précocité de détection des patients non-répondeurs par rapport à l'imagerie. Ces limitations pourraient provenir de l'utilisation d'une donnée qualitative technique-dépendante, la détectabilité, pour la définition de ces critères. En effet, cette notion occulte les variations quantitatives de l'ADNtc décrites dans les études précédentes : elle n'est informative qu'en cas de diminution importante de la concentration d'ADNtc et ne permet pas d'en décrire les éventuelles augmentations. La définition de nouveaux critères d'évaluation semble nécessaire.

Dans ce contexte, nous avons évalué si l'étude quantitative des variations de l'ADNtc permettait de détecter précocement et avec une meilleure discrimination les patients non-répondeurs aux anti-PD1.

Matériel et méthodes

1 PATIENTS ET PRELEVEMENTS

Les patients du service d'onco-dermatologie du CHU de Nantes, porteurs d'une mutation des gènes *BRAF* ou *NRAS*, ayant débuté un traitement par immunothérapie anti-PD1 ou par une association anti-PD1 – anti-CTLA-4 entre novembre 2015 et mars 2017 pour un mélanome cutané métastatique de stade IV ou de stade III non-résécable ont été inclus dans cette étude.

Ont été également inclus, selon les mêmes critères, les patients traités par anti-PD1 antérieurement à novembre 2015 dans le cadre d'essais thérapeutiques, et pour lesquels nous disposions de prélèvements plasmatiques en bio-collection.

Tous les patients ont été traités soit par nivolumab seul, à 3 mg/kg toutes les 2 semaines, soit par l'association nivolumab-ipilimumab à 1 mg/kg et 3 mg/kg respectivement, toutes les 2 semaines, selon les posologies recommandées.

Le suivi clinique du patient a été réalisé à chaque visite en Hôpital de Jour d'onco-dermatologie, toutes les 2 semaines. Parallèlement, le suivi radiologique a été assuré par la réalisation d'un scanner thoraco-abdomino-pelvien et cérébral, et/ou par scintigraphie, toutes les 8 semaines. La réponse tumorale aux anti-PD1 a été mesurée selon les critères radiologiques RECIST v1.1, et évaluée par l'équipe du service d'onco-dermatologie, en tenant compte des particularités liées à l'immunothérapie. Ces données, ainsi que les caractéristiques des patients, nous ont été fournies par le réseau pour la Recherche et l'Investigation Clinique sur le Mélanome (réseau RIC-Mel). La date de clôture de l'étude a été fixée au 27 juin 2017.

Des prélèvements plasmatiques ont été réalisés pour chaque patient à l'initiation du traitement, à 2 et 4 semaines de traitement, puis toutes les 4 semaines jusqu'à arrêt du traitement. Les prélèvements ont été effectués sur tubes EDTA de 5 mL ou 10 mL (Greiner Bio-One), puis acheminés au laboratoire d'immuno-dermatologie de Nantes (équipe 2 du Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, UMR 1232 INSERM-CNRS), puis centrifugés à 2000 g 10 min, décantés et congelés à -80°C dans un délai inférieur à 4 h.

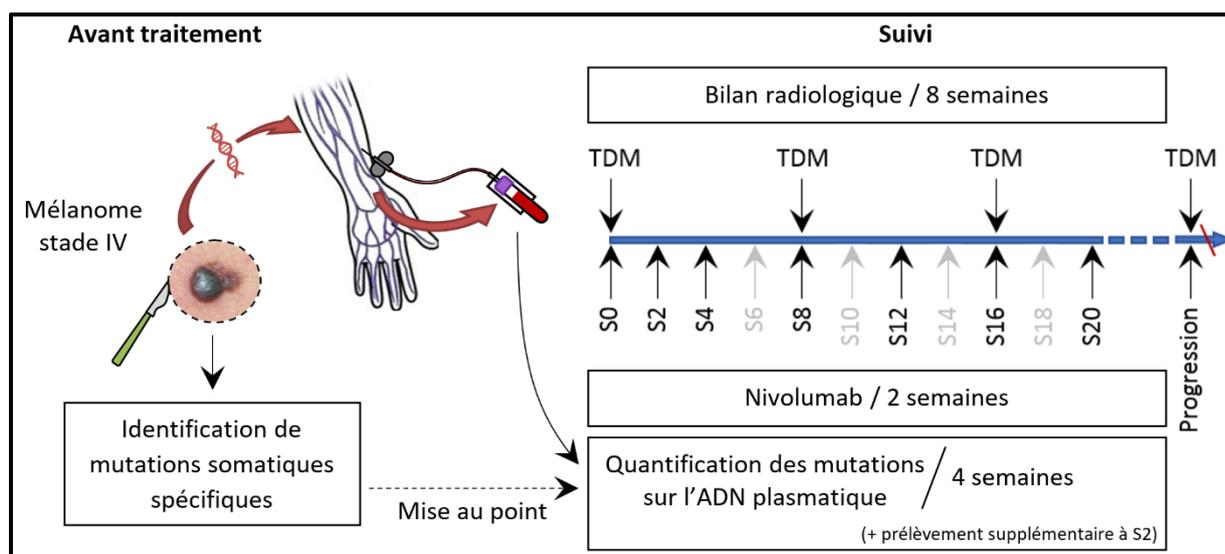


Figure 7. Résumé du protocole expérimental.

2 QUANTIFICATION DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT

L'ADNtc a été extrait à partir de 2 mL de plasma décongelé et re-centrifugé à l'aide du kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN), puis élué dans un volume de 50 μ L de tampon, selon les recommandations du fournisseur. Les extraits d'ADN ont été congelés à -20°C jusqu'à l'analyse (y compris lorsque l'analyse était réalisée le même jour, afin de ne pas induire de biais).

Nous avons ensuite quantifié l'ADNtc pour chaque patient, grâce à une PCR digitale spécifique de la mutation retrouvée sur le tissu tumoral.

Le système de PCR digitale QuantStudio 3D Digitale PCR System (LifeTechnologies) a été utilisé. Pour chaque échantillon, un mélange réactionnel de 15 μ L a été réalisé à partir de 6,5 μ L d'extrait d'ADN, 7,5 μ L d'un mix PCR comprenant une Taq polymérase et des désoxynucléotides-triphosphates, ainsi que 1 μ L d'une solution contenant les amorces adaptées à la région génomique d'intérêt et deux sondes Taqman : l'une, spécifique de la mutation, marquée par le fluorophore FAM, l'autre, spécifique de l'allèle muté, marquée par le fluorophore VIC. Ce mélange a été ensuite partitionné, par étalement, sur une puce de 20 000 puits, à l'aide d'un dispositif semi-automatique permettant de standardiser cette étape.

Le principe de mesure de la PCR digitale est conditionné par ce partitionnement : il permet d'isoler chaque copie du gène d'intérêt dans un puits différent.

Après scellement de la puce, la réaction d'amplification était ensuite réalisée à l'aide d'un thermocycleur adapté, selon le programme suivant : hold 10 min à 96°C, puis 39 cycles alternant 2 min à 60°C et 30 s à 98°C, puis enfin 2 min à 60°C. Au point final de la réaction d'amplification, la fluorescence émise par chaque puits était lue à l'aide d'un lecteur dédié : un signal de fluorescence FAM vert à 518 nm était émis par le puits en présence de l'allèle muté, tandis qu'un signal VIC jaune à 554 nm était émis par le puits en présence de l'allèle sauvage. Ces données de fluorescence étaient ensuite converties en données bio-informatiques, et finalement interprétés sur un logiciel de notre conception, pour fournir un résultat en copies mutées/mL de plasma.

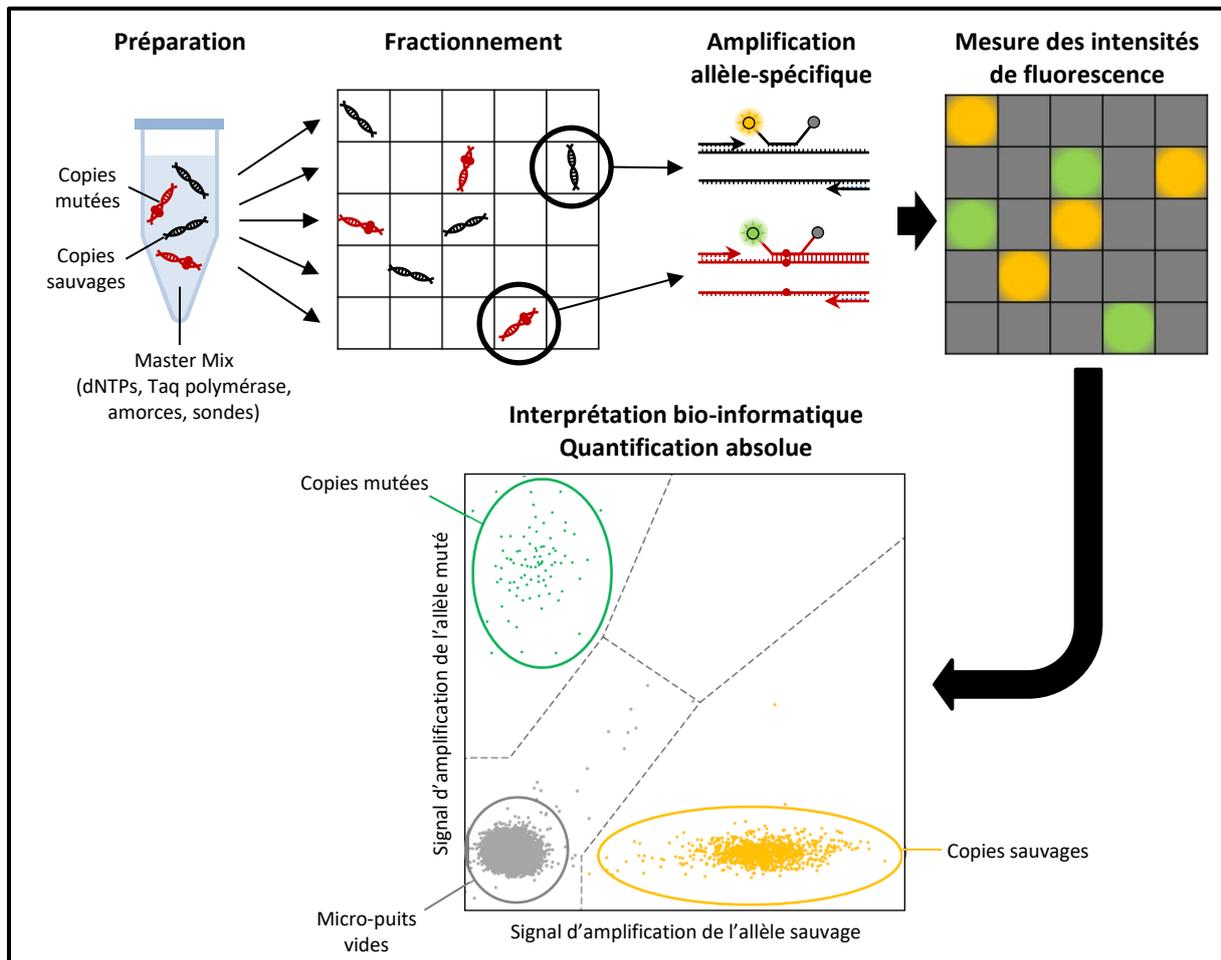


Figure 8. Principe de la PCR digitale. L'ADN à tester est fractionné en plusieurs milliers de micro-compartiments, puis amplifié à l'aide d'amorces spécifiques d'allèle. Pour chaque micro-compartiment, la réaction produit un signal de fluorescence dépendant de la nature, mutée ou sauvage, de la copie qu'il contient. Les copies mutées et les copies sauvages sont quantifiées à partir de leur dénombrement.

L'ADNtc a été quantifié à l'initiation du traitement. Pour des raisons pratiques :

- En l'absence de puits positif, l'ADNtc était indétectable. La concentration d'ADNtc n'a pas été considérée égale à 0 copies mutées/mL, mais inférieure au nombre de copies mutées/mL qui aurait été obtenu en présence d'un seul puits positif (soit < 4 copies mutées/mL, dans nos conditions d'extraction et d'analyse).
- En présence d'un seul puits positif, la concentration d'ADNtc = 4 copies mutées/mL ne permettait pas de quantifier une éventuelle diminution de l'ADNtc : l'ADNtc a été considéré comme indétectable et le suivi biologique n'a pas été poursuivi pour ces patients.
- En présence de plus d'un puits positif (≥ 8 copies mutées/mL), l'ADNtc était détectable, et l'ADNtc a été quantifié aux autres points du suivi.

FOURNISSEUR	REFERENCE	GENE	MUTATION	ALLELE WT (SONDE VIC)	ALLELE MUTANT (SONDE FAM)	
Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific®	AHBKFRM	<i>BRAF</i>	p.V600K	c.1798_1799GT>AA	AC	TT
	AH6R5PH	<i>BRAF</i>	p.V600E	c.1799T>A	A	T
	AHRSR8C	<i>NRAS</i>	p.Q61L	c.181_182CA>TT	TG	AA
	AHI15D6	<i>NRAS</i>	p.G12D	c.35G>A	C	T
	AH1SDFJ	<i>NRAS</i>	p.Q61K	c.181C>A	G	T
	AHD2CUE	<i>NRAS</i>	p.Q61L	c.182A>T	T	A
	AHS1P6Q	<i>NRAS</i>	p.Q61R	c.182A>G	T	C

Tableau 5. Références des sondes oligonucléotidiques de dPCR utilisées au cours de l'étude

FOURNISSEUR	CONSOMMABLE	DESIGNATION	REFERENCE
Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific®	Kit de preparation de puces de dPCR (12 pièces)	QuantStudio3D Digital PCR 20K Chip kit v2	A26316
	Master Mix	QuantStudio3D Digital PCR Master Mix v2 (5 mL)	A26359
		QuantStudio3D Digital PCR Master Mix v2 (1,5 mL)	A26358

Tableau 6. Références des consommables utilisés pour la réalisation des dPCR au cours de l'étude

3 MISE AU POINT DES CRITERES D'EVALUATION

Une fois les concentrations d'ADNtc connues pour chaque point du suivi, chez les patients dont l'ADNtc était détectable à l'initiation du traitement, nous avons cherché à définir des critères permettant d'interpréter ces données longitudinales.

L'objectif du suivi biologique étant essentiellement de détecter de façon précoce les résistances primaires aux anti-PD1, nous avons dû définir quels patients devaient être considérés comme répondeurs ou non-répondeurs. Pour cela, nous avons dans un premier temps stratifié notre cohorte en 2x2 groupes, selon que les patients aient présenté ou non une réponse objective (réponse partielle ou réponse complète) au cours du suivi (patients R+ ou R-), et selon que la maladie ait progressé ou non au cours du suivi (patients P+ et P-). Ainsi, les patients pouvaient appartenir aux groupes R+/P-, R+/P+, R-/P+ ou R-/P-.

	(R+) REPONSE OBJECTIVE	(R-) ABSENCE DE REPONSE OBJECTIVE
PROGRESSION (P+)	Groupe R+/P+	Groupe R-/P+
ABSENCE DE PROGRESSION (P-)	Groupe R+/P-	Groupe R-/P-

Tableau 7. Mode de stratification des patients

Notre objectif principal était d'établir des critères d'évaluation des cinétiques d'ADNtc permettant de distinguer les patients R-/P+ (considérés comme non-répondeurs) des patients R+ (patients répondeurs) de façon spécifique.

Une fois définis, ces critères ont été évalués sur l'ensemble des patients. Le taux de réponse et la survie sans progression constituaient nos critères de jugement principaux.

4 ANALYSES STATISTIQUES

Le test de Kruskal-Wallis et le test du Khi2 ont été utilisés pour comparer les caractéristiques des patients. L'association entre les caractéristiques des patients et la survie globale ou la survie sans progression a été étudiée par un modèle à risques proportionnels de Cox et a été évaluée par le test de Wald. Les critères que nous avons établis pour l'évaluation des cinétiques d'ADNtc ont été définis et évalués à l'aide de courbes ROC. Les probabilités de survie ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier et comparées par un test du log-rank.

Tous les tests ont été réalisés selon des hypothèses bilatérales, et un degré de signification $p < 0,05$ a été utilisé pour établir la significativité de nos observations. Les analyses statistiques de cette étude ont été réalisés à l'aide du logiciel XLSTAT.

5 ASPECTS REGLEMENTAIRES ET ETHIQUES

Cette étude a été autorisée par le Groupe Nantais d'Ethique dans le Domaine de la Santé (GNEDS) ainsi que par la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL). Tous les patients inclus (y compris ceux inclus avant novembre 2015) ont signé un consentement écrit, autorisant la réalisation des prélèvements, leur conservation en bio-collection et leur utilisation à des fins de recherche.

Résultats

1 PATIENTS

Cette étude a inclus 53 patients porteurs de mutations porteurs d'une mutation des gènes *BRAF* ou *NRAS* et traités par immunothérapie nivolumab ou une association nivolumab-ipilimumab pour un mélanome cutané métastatique de stade IV ou de stade III non-résécable. A la date de clôture de l'étude (27 juin 2017), nous disposons d'un recul supérieur à 3,7 mois pour tous les patients, avec un maximum de 25,7 mois (médiane = 6,8 mois).

L'immunothérapie anti-PD1 étant le traitement de première intention des patients non-mutés *BRAF*, les patients porteurs de mutations du gène *NRAS* étaient majoritaires (55%), contrairement aux données de la population générale, où les mutations de *BRAF* sont près de 2 fois plus fréquentes. La plupart des patients étaient traités par monothérapie : seuls 4 patients ont reçu une association anti-PD1 – anti-CTLA-4.

Le taux de réponse était de 35,8% tous traitements confondus, et de 33,3% pour les patients traités par monothérapie. 17 patients n'avaient pas présenté de progression tumorale à la date de clôture de l'étude (groupe R+P-), tandis qu'une progression secondaire avait été observée chez 2 patients (groupe R+P+). 20 patients avaient progressé sans montrer de réponse objective à l'imagerie (groupe R-P+). Enfin, 14 patients étaient sortis de l'étude sans qu'une réponse objective ni une progression n'aient pu être observées (groupe R-P-) : 7 se sont dégradés ou sont décédés avant la première évaluation, 2 patients ont présenté un effet indésirable de grade 4, 1 patient a été perdu de vue, et 4 patients avaient montré une stabilité tumorale et étaient toujours traités à la date de clôture de l'étude.

	(R+) REPONSE OBJECTIVE	(R-) ABSENCE DE REPONSE OBJECTIVE
PROGRESSION (P+)	Groupe R+/P+ n = 2	Groupe R-/P+ n = 20
ABSENCE DE PROGRESSION (P-)	Groupe R+/P- n = 17	Groupe R-/P- n = 14

Tableau 8. Stratification des patients

Les groupes R+ et R-P+ étaient comparables sur la plupart des caractéristiques étudiées, à l'exception des métastases pulmonaires, plus fréquentes chez les patients R-P+ que chez les patients R+ ($p = 0,004$). Ces deux groupes différaient bien entendu en termes de survie globale et de survie sans progression. Les caractéristiques des patients sont résumées dans le Tableau 9.

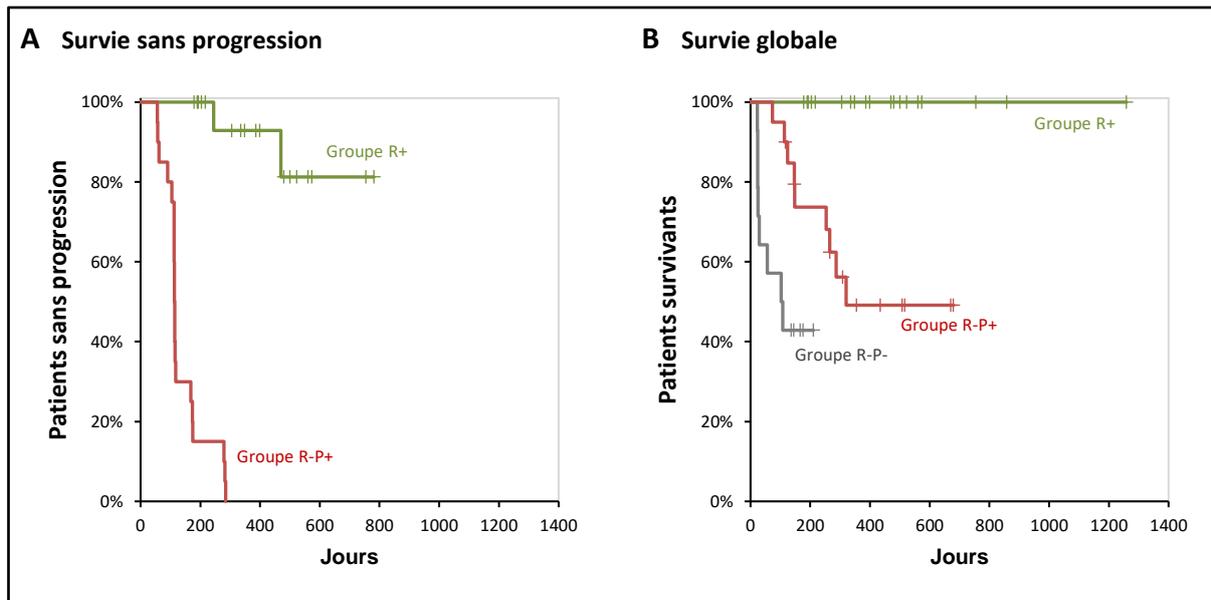


Figure 9. A : Estimation de Kaplan-Meier pour la survie sans progression. La survie sans progression des patients R+ était significativement supérieure à celle des patients R-P+ ($p < 0,0001$). **B : Estimation de Kaplan Meier pour la survie globale.** Les patients R+ avaient une survie globale supérieure aux patients R-P+ et R-P- ($p = 0,001$ et $p = 0,0001$ respectivement). Les patients R-P+ avaient une meilleure survie globale que la patients R-P- ($p = 0,011$).

	GROUPE R+ (n = 19)	GROUPE R-P+ (n = 20)	GROUPE R-P- (n = 14)		TOTAL (n = 53)
AGE - années					
Médiane (étendue)	65 (35-82)	64 (31-90)	61,5 (27-82)	p = 0,837	64 (27-90)
SEXE					
Femme	11 (57,9)	7 (35)	6 (42,9)	p = 0,204	24 (45,3)
Homme	8 (42,1)	13 (65)	8 (57,1)		29 (54,7)
STADE					
III non-résécable	4 (21,1)	3 (15)	4 (28,6)	p = 0,793	11 (20,8)
IV	15 (78,9)	17 (85)	10 (71,4)		42 (79,2)
MUTATION					
<i>BRAF</i> (codon 600)	7 (36,8)	9 (45)	8 (57,1)	p = 0,621	24 (45,3)
<i>NRAS</i> (exon 2 ou 3)	12 (63,2)	11 (55)	6 (42,8)		29 (54,7)
INDICE DE BRESLOW - mm					
Moyenne ± écart-type	2,78 ± 1,25	3,23 ± 2,83	3,08 ± 2,25	p = 0,971	3,04 ± 2,20
ULCERATION					
Non	6 (31,6)	10 (50)	5 (35,7)	p = 0,346	21 (39,6)
Oui	5 (26,3)	4 (20)	6 (42,9)		15 (28,3)
Non connu	8 (42,1)	6 (30)	3 (21,4)		17 (32,1)
TRAITEMENT					
Nivolumab	17 (89,5)	19 (95)	13 (92,9)	p = 0,788	49 (92,5)
Nivo + Ipilimumab	2 (10,5)	1 (5)	1 (7,1)		4 (7,5)
TRAITEMENT PRECEDENT					
Aucun (1 ^{ère} ligne)	11 (57,9)	9 (45)	6 (42,9)	p = 0,664	26 (49,1)
Chimiothérapie	1 (5,3)	1 (5)	0		2 (3,8)
Immunothérapie	3 (15,8)	1 (5)	1 (7,1)		5 (9,4)
Thérapie ciblée	4 (21,0)	9 (45)	7 (50,0)		20 (37,7)
NOMBRE DE SITES METASTATIQUES					
Moyenne ± écart-type	4,4 ± 3,3	5,3 ± 3,4	4,2 ± 3,4	p = 0,340	4,7 ± 3,3
METASTASES GANGLIONNAIRES OU CUTANÉES					
Présence	18 (94,7)	20 (100)	13 (92,9)	p = 0,567	51 (96,2)
Absence	1 (5,3)	0	1 (7,1)		2 (3,8)
METASTASES PULMONAIRES					
Présence	3 (15,8)	13 (65)	5 (35,7)	p = 0,004*	21 (39,6)
Absence	16 (84,2)	7 (35)	9 (64,3)		32 (60,4)
METASTASES CÉRÉBRALES					
Présence	3 (15,8)	4 (20)	5 (34,7)	p = 0,845	12 (22,6)
Absence	16 (84,2)	16 (80)	9 (64,3)		41 (77,4)
METASTASES VISCÉRALES NON-PULMONAIRES					
Présence	10 (52,6)	14 (70)	8 (57,1)	p = 0,393	32 (60,4)
Absence	9 (47,4)	6 (30)	6 (42,9)		21 (39,6)
LDH - UI/L					
Moyenne ± écart-type	185,5 ± 65,8	255,0 ± 148,5	313,5 ± 384,7	p = 0,319	245,9 ± 221,6

Tableau 9 Caractéristiques des patients à l'initiation du traitement

* Différence significative

2 CONCENTRATION BASALE D'ADN TUMORAL CIRCULANT

Nous avons dans un premier temps évalué si la concentration basale d'ADNtc pouvait prédire la réponse aux anti-PD1, et si elle était associée au pronostic.

23 patients sur 53 (43,4%) avaient de l'ADNtc détectable à l'initiation du traitement, soit 6 patients R+ sur 19 (31,6%), 11 patients R-P+ sur 20 (55%) et 6 patients R-P- sur 14 (42,8%). La détectabilité de l'ADNtc ne différait pas significativement entre ces 3 groupes ($p = 0,337$). Par ailleurs, aucune des caractéristiques des patients n'était associée à la détectabilité de l'ADNtc : en particulier, la détectabilité de l'ADNtc n'était pas liée à la ligne thérapeutique ($p = 0,487$), ni au traitement antérieur à l'immunothérapie anti-PD1 ($p = 0,484$), ni à la mutation ($p = 0,707$). La concentration d'ADNtc était en moyenne de 91 copies mutées/mL pour les patients R+, contre 581 copies mutées/mL pour les patients R-P+ ; cette différence n'était cependant pas significative ($p = 0,330$).

	GRUPE R+ (n = 19)	GRUPE R-P+ (n = 20)	GRUPE R-P- (n = 14)		TOTAL (n = 53)
DETECTABILITE					
ADNtc détectable	6 (31,6)	11 (55)	6 (42,8)	$p = 0,337$	23 (43,4)
ADNtc indétectable	13 (70,4)	9 (45)	8 (57,2)		30 (56,6)
CONCENTRATION EN ADNtc (indétectables inclus) – copies mutées/mL					
Moyenne ± écart-type	91,1 ± 194,6	581,2 ± 1078,9	2291 ± 7046,6	$p = 0,330$	857,4 ± 3694,6
CONCENTRATION EN ADNtc (indétectables exclus) – copies mutées/mL					
Moyenne ± écart type	279,1 ± 272,7	1053,3 ± 1291,1	5342,4 ± 10467,2	$p = 0,640$	1970,2 ± 5475,1
Médiane	245,2	356,9	824,8		356,9
Q1-Q3	39,1-456,2	47,6-1665,2	93,2-3242,8		45,0-1402,0

Tableau 10. ADN tumoral circulant à l'initiation du traitement

Malgré une détectabilité et des niveaux moyens d'ADNtc comparables entre les groupes R+ et R-P+, il n'était pas exclu que la concentration d'ADNtc puisse être discriminante pour des valeurs élevées. Nous avons ainsi évalué la capacité de l'ADNtc à identifier les patients R-P+ par rapport aux patients R+, à l'aide d'une courbe ROC. L'aire sous la courbe (Area Under the Curve, AUC) valait 0,590, et ne différait pas significativement de 0,5 ($p = 0,332$) : l'ADNtc ne permettait donc pas d'identifier les patients R-P+ plus efficacement qu'un tri aléatoire.

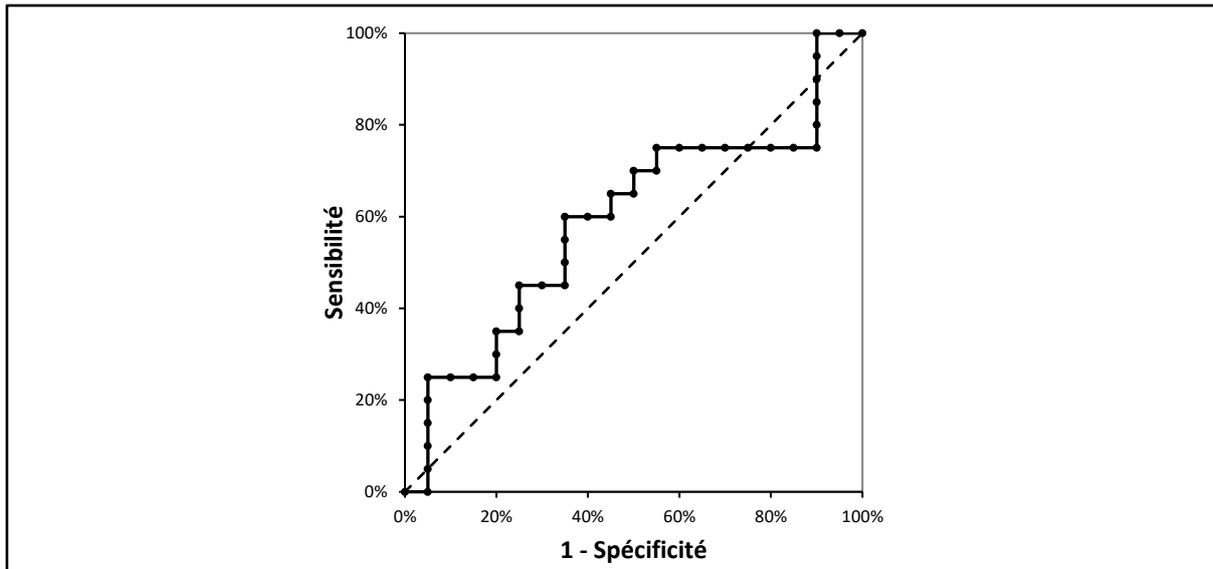


Figure 10. Courbe ROC : Identification des patients R-P+ en fonction de la concentration d'ADNtc. L'AUC de la courbe était égale à 0,590, et ne différait pas significativement de 0,5 ($p = 0,332$).

Malgré l'absence de différence de détectabilité et de concentration en ADNtc entre nos groupes de patients, le niveau basal d'ADNtc était corrélé au pronostic. Ainsi, les patients ayant un ADNtc indétectable à l'initiation du traitement présentaient une meilleure survie globale (survie à 6 mois = 90,0%, contre 56,2% en cas d'ADNtc détectable ; $p = 0,002$), et la concentration basale d'ADNtc était associée négativement à la survie globale, selon un modèle de Cox univarié ($p = 0,002$).

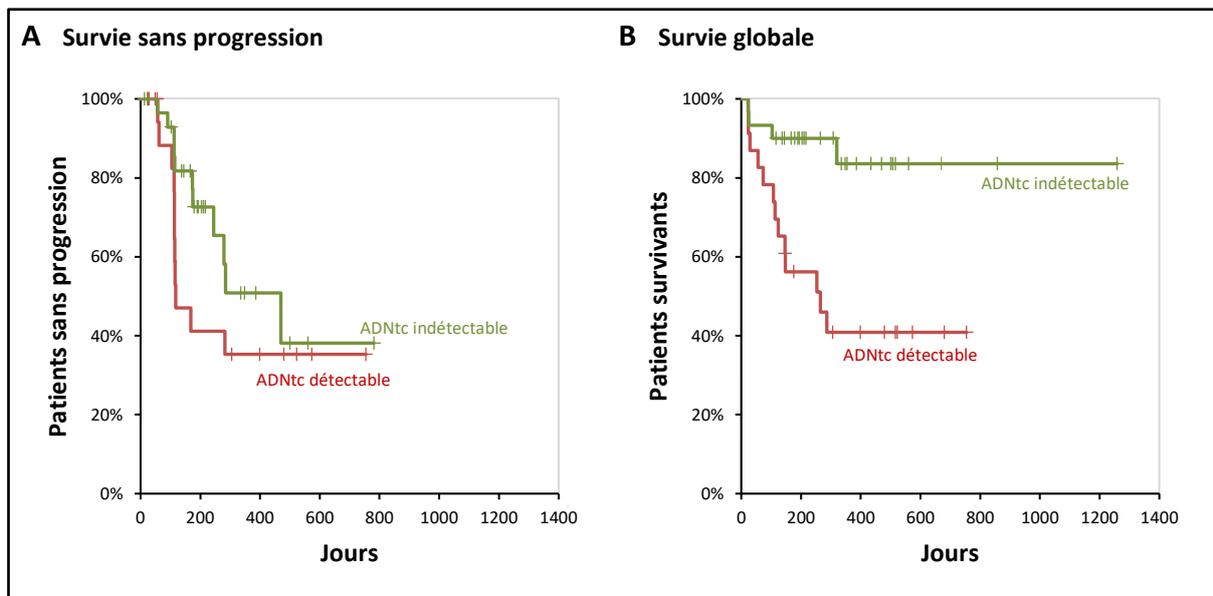


Figure 11. A : Estimation de Kaplan-Meier pour la survie sans progression. La survie sans progression des patients dont l'ADNtc était indétectable à l'initiation du traitement ne différait pas significativement de celle des patients dont l'ADNtc était détectable ($p = 0,187$). **B : Estimation de Kaplan Meier pour la survie globale.** L'indétectabilité de l'ADNtc à l'initiation du traitement était associée à un bénéfice significatif sur la survie globale ($p = 0,002$).

L'analyse de survie univariée des autres caractéristiques de nos patients a montré que la survie globale était également affectée négativement par la présence de métastases pulmonaires ($p = 0,005$), de métastases viscérales non-pulmonaires ($p = 0,048$), et par les taux élevés d'activité LDH ($p = 0,039$).

La présence de métastases pulmonaires, de métastases viscérales non-pulmonaires et les LDH sériques élevées étant des facteurs pronostiques connus du mélanome métastatique, nous avons voulu déterminer si la valeur pronostique de l'ADNtc en était indépendante.

La concentration basale d'ADNtc était corrélée à l'activité LDH de façon significative, mais avec une faible adéquation ($p < 0,0001$; coefficient de détermination $r^2 = 0,537$). Il n'y avait pas d'association entre la concentration d'ADNtc et la présence de métastases pulmonaires ou viscérales non-pulmonaires. Une analyse de survie multivariée a été réalisée : du fait de la corrélation entre ADNtc et LDH, les deux marqueurs avaient perdu leur significativité après ajustement ($p = 0,163$ et $p = 0,751$, respectivement).

En suivant une méthode en pas à pas descendante, les variables les moins associées à la survie globale ont été éliminées tour à tour du modèle : tout d'abord l'activité LDH, puis la présence de métastases viscérales non-pulmonaires. Le modèle multivarié final, associant la concentration d'ADNtc et la présence de métastases pulmonaires, était associé significativement à la survie globale ($p = 0,001$; rapports de risque : [IC 95% : 1,000017 ; 1,000194] et [IC 95% : 1,534 ; 15,493] respectivement).

Dans notre cohorte, ni la détectabilité de l'ADNtc, ni la concentration basale d'ADNtc n'étaient significativement corrélées à la survie sans progression sous anti-PD1 ($p = 0,096$ et $p = 0,074$ respectivement). Parmi les caractéristiques des patients, seule la présence de métastases pulmonaires était associée -négativement- à la survie sans progression ($p = 0,003$). L'activité LDH et la présence de métastases viscérales non-pulmonaires étaient cependant à la limite de la significativité ($p = 0,068$ et $p = 0,086$, respectivement). En analyse de survie multivariée, seule la présence de métastases pulmonaires demeurait significativement associée à la survie sans progression, selon la méthodologie précédente.

Au total, la concentration d'ADNtc à l'initiation du traitement semblait être un facteur pronostic du mélanome cutané métastatique traité par anti-PD1, non-indépendant mais mieux associé à la survie globale que l'activité LDH. Le niveau basal d'ADNtc n'était pas prédictif de la survie sans progression.

3 ANALYSE CINÉTIQUE DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT

3.1 PATIENTS

L'utilisation de l'ADNtc en tant que biomarqueur dynamique repose nécessairement sur l'étude de ses variations au long du suivi. Afin d'étudier ces variations, il apparaissait donc nécessaire que les patients étudiés aient une concentration basale connue d'ADNtc, à laquelle se référer. Pour cette raison, nous avons sélectionné les patients dont l'ADNtc était détectable à l'initiation du traitement.

Parmi les 23 patients ayant présenté une quantité basale détectable d'ADNtc, 22 ont été inclus dans cette seconde partie de l'étude. 1 patient n'avait pas pu être prélevé après l'initiation du traitement et a été exclu.

6 patients provenaient du groupe R+ (6 patients R+P- et aucun patient R+P+), 10 patients du groupe R-P+ et 6 patients du groupe R-P-. Aucune des caractéristiques des patients ne différait significativement entre les 3 groupes (Tableau 11) : en particulier, la proportion de patients ayant une ou des métastases pulmonaires et la concentration moyenne d'ADNtc à l'initiation du traitement ne présentaient pas de différence ($p = 0,457$ et $p = 0,668$ respectivement).

	GROUPE R+ (n = 6)	GROUPE R-P+ (n = 10)	GROUPE R-P- (n = 6)		TOTAL (n = 22)
AGE - années					
Médiane (étendue)	67,2 (53-79)	65 (33-90)	58 (27-79)	p = 0,850	70 (27-90)
SEXE					
Femme	4 (66,7)	8 (80)	3 (50,0)	p = 0,457	15 (68,2)
Homme	2 (33,3)	2 (20)	3 (50,0)		7 (31,8)
STADE					
III non-résécable	1 (16,7)	1(10)	1 (16,7)	p = 0,511	3 (13,6)
IV	5 (83,3)	9 (90)	5 (83,3)		19 (86,4)
MUTATION					
<i>BRAF</i> (codon 600)	4 (66,7)	3 (30)	3 (50,0)	p = 0,350	10 (45,5)
<i>NRAS</i> (exon 2 ou 3)	2 (33,3)	7 (70)	3 (50,0)		12 (54,5)
INDICE DE BRESLOW - mm					
Moyenne ± écart-type	2,80 ± 0,99	3,29 ± 4,05	3,96 ± 1,46	p = 0,262	3,47 ± 2,80
ULCERATION					
Non	4 (66,7)	4 (40)	1 (16,7)	p = 0,102	9 (40,9)
Oui	2 (33,3)	4 (40)	1 (16,7)		7 (31,8)
Non connu	0	2 (20)	4 (66,6)		6 (27,3)
TRAITEMENT					
Nivolumab	6 (100)	10 (100)	5 (83,3)	p = 0,247	21 (95,5)
Nivo + Ipilimumab	0	0	1 (16,7)		1 (4,5)
TRAITEMENT PRECEDENT					
Aucun (1 ^{ère} ligne)	2 (33,3)	7 (70)	3 (50,0)	p = 0,385	12 (54,6)
Chimiothérapie	1 (16,7)	0	0		1 (4,5)
Thérapie ciblée	3 (50,0)	3 (30)	3 (50,0)		9 (40,9)
NOMBRE DE SITES METASTATIQUES					
Moyenne ± écart-type	5,7 ± 2,3	4,8 ± 1,8	3,8 ± 2,2	p = 0,329	4,8 ± 2,0
METASTASES GANGLIONNAIRES OU CUTANÉES					
Présence	6 (100)	10 (100)	5 (83,3)	p = 0,247	21 (95,5)
Absence	0	0	1 (16,7)		1 (4,5)
METASTASES PULMONAIRES					
Présence	2 (33,3)	6 (60)	2 (33,3)	p = 0,457	10 (45,5)
Absence	4 (66,7)	4 (40)	4 (66,7)		12 (54,5)
METASTASES CEREBRALES					
Présence	1 (16,7)	6 (60)	2 (33,3)	p = 0,500	4 (18,2)
Absence	5 (83,3)	4 (40)	4 (66,7)		18 (81,8)
METASTASES VISCÉRALES NON-PULMONAIRES					
Présence	3 (50,0)	7 (70)	4 (66,7)	p = 0,711	14 (63,6)
Absence	3 (50,0)	3 (30)	2 (33,3)		8 (36,4)
LDH BASAL – UI/L					
Moyenne ± écart-type	166,0 ± 103,1	310,7 ± 172,2	471,1 ± 512,9	p = 0,435	322,7 ± 312,1
ADNTc BASAL – copies mutées/mL					
Moyenne ± écart-type	279,1 ± 272,7	831,7 ± 1119,0	5342,4 ± 10467,2	p = 0,668	1911,2 ± 5596,5

Tableau 11. Caractéristiques des patients ayant un ADNtc détectable à l'initiation du traitement

3.2 DETECTABILITE DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT AU COURS DU SUIVI

Afin d'évaluer les performances de l'ADNtc pour le suivi de la réponse thérapeutique, nous avons repris dans un premier temps les critères qualitatifs établis par Lee et al. (110) basés sur la détectabilité de l'ADNtc.

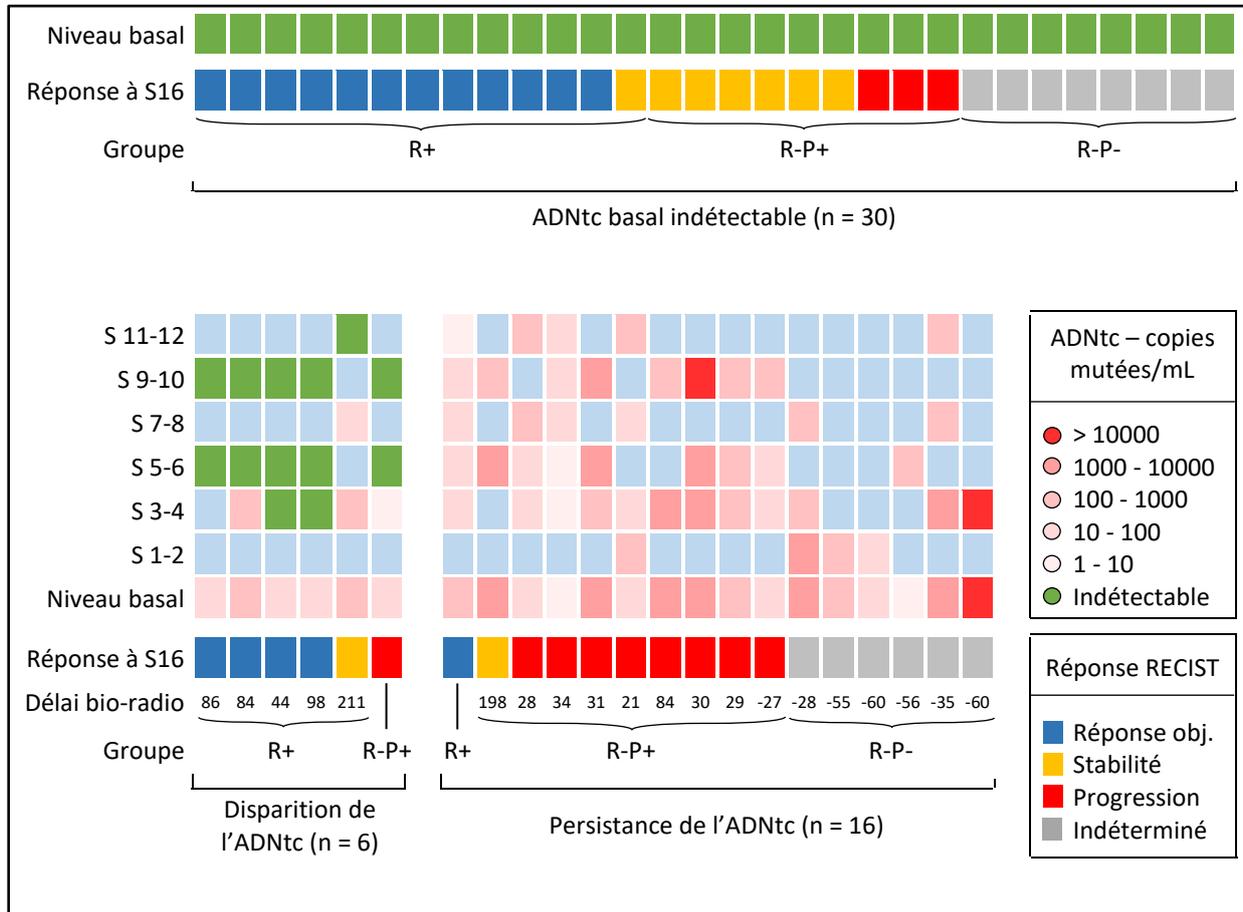


Figure 12. Vue d'ensemble des concentrations d'ADNtc et de la réponse radiologique, au cours des premières semaines de traitement (inspiré de la représentation graphique de Lee et al.). Chaque colonne représente le suivi longitudinal d'un patient et la réponse radiologique à 16 semaines de traitement. Les patients ont été répartis en 3 groupes, selon qu'ils aient présenté un ADNtc indétectable à l'initiation du traitement, avant la 12^{ème} semaine de traitement, ou une persistance de l'ADNtc au cours des 12 premières semaines du suivi.

Délai bio-radio : Délai entre la disparition de l'ADNtc et la date de première réponse objective
ou Délai entre la fin de la 12^{ème} semaine et la progression radiologique (selon le groupe)

Les 22 patients ayant un niveau basal d'ADNtc détectable à l'initiation du traitement ont été répartis en 2 groupes, selon que l'ADNtc soit resté ou non détectable au cours des 12 premières semaines de traitement. 6 patients ont présenté une disparition de l'ADNtc avant la 12^{ème} semaine, dont 5 patients R+ et 1 patient R-P+, soit un taux de réponse de 83,3% à la clôture de l'étude. En revanche, l'ADNtc est resté détectable durant les 12 premières semaines de traitement pour 16 patients, dont 1 patient R+, 9 patients R-P+ et 6 patients R-P-. Le taux de réponse (6,3%) était significativement plus faible

($p = 0,0002$). Le taux de réponse était de 43,3% chez les patients dont l'ADNtc était indétectable dès l'initiation du traitement. La persistance de l'ADNtc était associée à un pronostic défavorable sur la survie globale et la survie sans progression, par rapport aux patients dont l'ADNtc était indétectable initialement ou le devenait sous traitement. L'étude de Lee et al. retrouvait des résultats similaires.

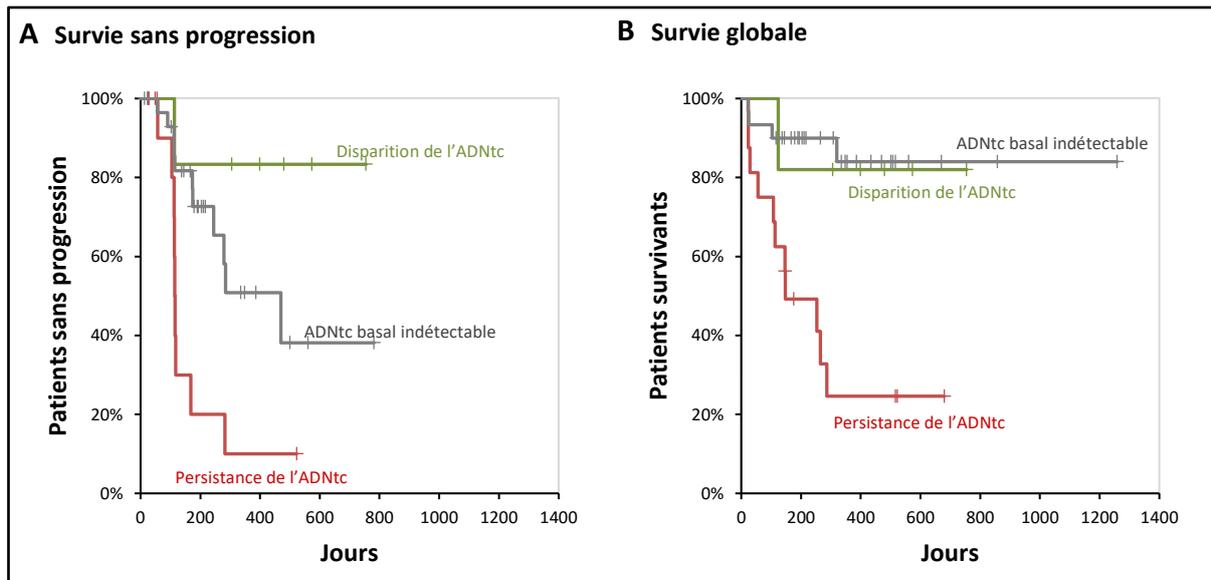


Figure 13. A : Estimation de Kaplan-Meier pour la survie sans progression. La survie sans progression des patients dont l'ADNtc persistait à la phase initiale du traitement était significativement inférieure à celle des patients dont l'ADNtc était initialement indétectable ($p = 0,004$) ou devenait indétectable en moins de 12 semaines ($p = 0,010$). **B : Estimation de Kaplan Meier pour la survie globale.** La persistance de l'ADNtc à la phase initiale du traitement était associée à un pronostic défavorable en survie globale, par rapport aux patients dont l'ADNtc était initialement indétectable ($p = 0,0002$) ou devenait indétectable en moins de 12 semaines ($p = 0,035$).

1 patient R+ avait un niveau d'ADNtc détectable à l'issue de la 12^{ème} semaine de traitement. Ce cas n'était pas équivoque, puisque ce patient était encore traité à la clôture de l'étude, avec une survie sans progression censurée à 523 jours.

La persistance de l'ADNtc à la 12^{ème} semaine permettait de distinguer les patients R-P+ des patients R+ avec une spécificité, une sensibilité et des valeurs prédictives positive et négative de 83,3%, 90,0%, 90,0% et 83,3% respectivement. Il faut noter néanmoins que l'un des patients R-P+ détecté par ces critères biologiques avait déjà progressé 27 jours avant la fin de la 12^{ème} semaine : le suivi de l'ADNtc n'a pas apporté de bénéfice par rapport à l'imagerie dans ce cas. Pour les autres patients R-P+, la persistance de l'ADNtc a été confirmée 21 à 198 jours avant la progression de la maladie (médiane = 30 jours).

Enfin, tous les patients sortis de l'étude prématurément, avant identification d'une réponse objective ou d'une progression (patients R-P-), ont montré une persistance de l'ADNtc. Néanmoins, tous sont sortis de l'étude avant la 12^{ème} semaine : l'analyse de l'ADNtc selon ces critères d'évaluation était trop tardive pour être informative.

Au total, les critères qualitatifs de Lee et al., appliqués à notre cohorte, présentaient des limites en termes de spécificité et de précocité de détection des patients non-répondeurs. Nous avons défini et évalué dans la suite de cette étude des critères quantitatifs, basés sur l'interprétation des variations de concentration de l'ADNtc.

3.3 SUIVI QUANTITATIF DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT

3.3.1 Corrélation entre variations de l'ADNtc et évolution clinique

Nous avons tenté de déterminer dans un premier temps si les variations de la concentration d'ADNtc étaient liées à l'évolution clinique des patients de notre cohorte.

La concentration basale d'ADNtc a été comparée à la concentration observée à la date de première réponse objective, chez les patients du groupe R+. Les 6 patients R+ ont obtenu leur première réponse objective après 58 à 282 jours de traitement (médiane = 112,5 jours). Leur concentration initiale d'ADNtc était comprise entre 27 et 659 copies mutées/mL (médiane = 246 copies mutées/mL). A la date de première réponse, l'ADNtc était devenu indétectable pour tous les patients, soit une diminution des concentrations d'ADNtc de $< -82,3\%$ à $< -99,4\%$.

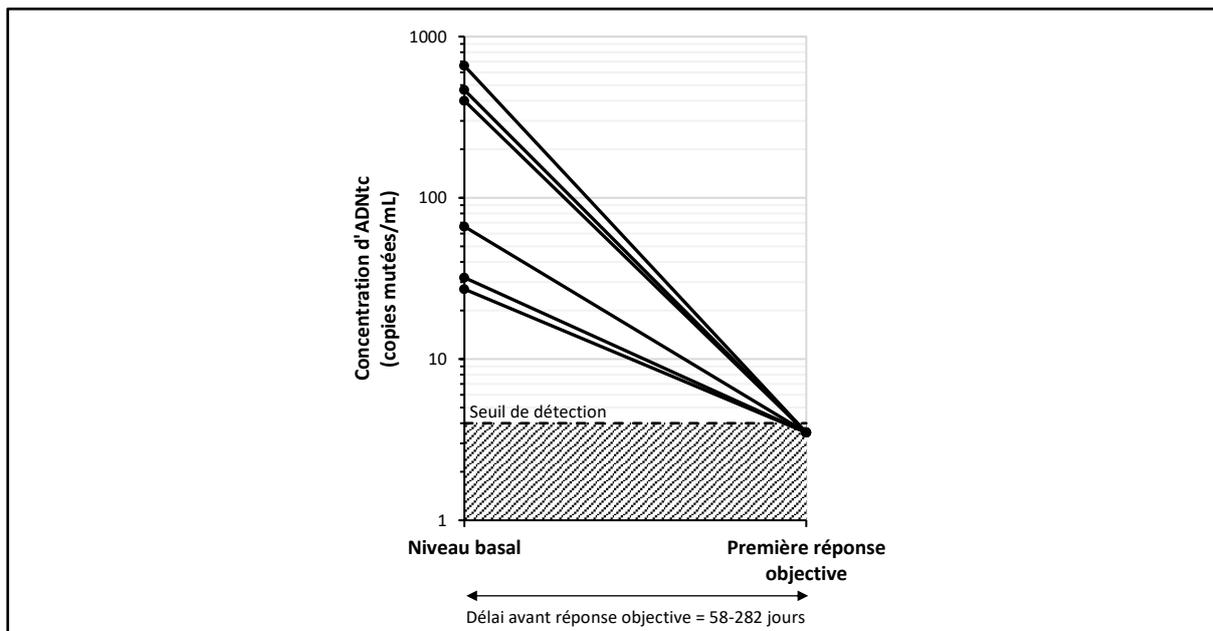


Figure 14. Variation de la concentration d'ADNtc entre l'initiation du traitement et la date de première réponse objective, pour les patients R+. L'ADNtc des patients R+ était indétectable à la date de première réponse objective, soit une diminution d'au moins $-82,3\%$ à $-99,4\%$ par rapport au niveau basal.

Pour les 10 patients R-P+, la concentration basale d'ADNtc a été comparée à la concentration mesurée à la date de progression. Les 10 patients R-P+ avaient des survies sans progression (i. e. délais avant progression) comprises entre 57 et 282 jours (médiane = 113,5 jours). Avec 9 à 3333 copies mutées/mL à l'initiation du traitement (médiane = 212 copies/mL), les concentrations basales d'ADNtc des patients R-P+ ne différaient pas de celles observées chez les patients R+ ($p = 0,664$). A la date de progression, l'ADNtc était détectable pour tous les patients. Avec des variations comprises entre -67,6% et +113668,4% (médiane = +150,6%), la concentration d'ADNtc avait augmenté pour 8 patients.

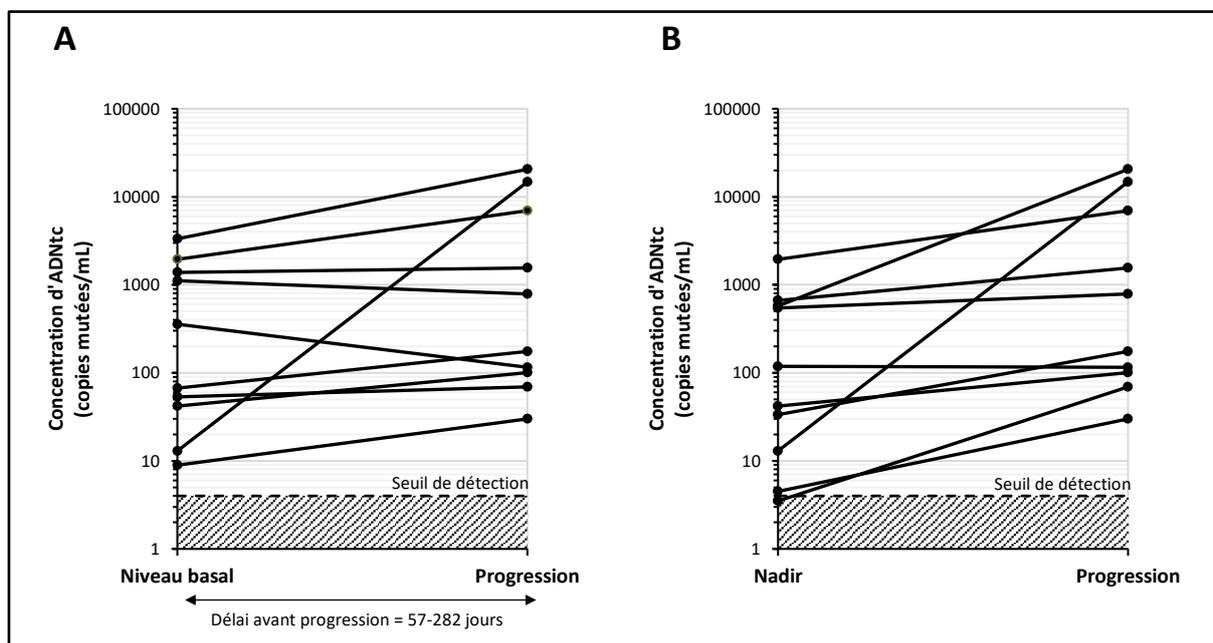


Figure 15. A : Variation de la concentration d'ADNtc entre l'initiation du traitement et la date de progression, pour les patients R-P+. A la date de progression, l'ADNtc des patients R-P+ variait de -67,6% à +113668% par rapport au niveau basal. **B : Variation de la concentration d'ADNtc entre le nadir de la cinétique et la date de progression, pour les patients R-P+.** A la date de progression, l'ADNtc des patients R-P+ variait de -2,5% à +113668% par rapport au nadir de la cinétique.

Au total, les variations d'ADNtc étaient très significativement corrélées à l'évolution clinique des patients (régression logistique : $p < 0,0001$). Cette différence était encore plus marquée en considérant comme concentration de référence le nadir (c'est-à-dire la concentration minimale observée aux points de suivi antérieurs) plutôt que le niveau basal : avec ce modèle, la concentration d'ADNtc augmentait de +44,4% à +113668,4% pour 9 patients, et restait stable (-2,5%) pour 1 patient.

Considérant ces données, il apparaissait que l'augmentation de la concentration d'ADNtc par rapport à son nadir définissait une « progression biologique », associée à la progression de la maladie, tandis qu'une diminution de la concentration d'ADNtc par rapport à son niveau basal définissait une « réponse biologique », associée à la réponse objective aux anti-PD1. Une définition précise de ces deux notions, basée sur l'étude de l'ensemble des points de suivi biologique, était nécessaire avant de pouvoir en évaluer la valeur prédictive.

3.3.2 Mise au point des critères d'évaluation

Nous avons tout d'abord tenté de définir une progression biologique (Pb) et une réponse biologique (Rb) permettant de caractériser les variations de l'ADNtc.

La définition de la Pb et de la Rb par des seuils de variation relative fixes nécessiterait que la précision de la mesure soit constante quelle que soit la concentration d'ADNtc. Or, ce n'est pas le cas : pour de faibles concentrations d'ADNtc, les variations de quelques copies mutées/mL -de l'ordre de grandeur de l'imprécision de la PCR digitale à cette concentration- peuvent produire des variations relatives importantes. Cette contrainte imposerait soit la définition de seuils de variation élevés, au détriment de la sensibilité et de la précocité de détection, soit la définition de seuils plus modérés, avec un risque de faux positifs. Face à cette limitation, nous avons tenté de développer des critères prenant en compte l'imprécision de la PCR digitale.

3.3.2.1 Précision de la PCR digitale

L'imprécision de mesure de la dPCR peut être modélisée mathématiquement, car la quantification de l'ADNtc en PCR digitale repose en réalité sur une méthode calculatoire.

En effet, le nombre de copies mutées présentes sur la puce ne peut pas être directement déduit par dénombrement des puits émettant le signal de fluorescence FAM (associé à la présence de la mutation), car lorsque le nombre de copies mutées devient important, la probabilité qu'un puits puisse contenir plus d'une copie mutée n'est pas négligeable. Dès lors, il convient de convertir le nombre de puits en nombre de copies par le calcul.

Brièvement, la probabilité qu'un puits contienne 0, 1, 2, 3, ..., x copies mutées suit une loi de Poisson. Cette loi est caractérisée par un seul paramètre, son espérance λ , c'est-à-dire le nombre moyen de copies mutées par puits.

$$\text{Loi de Poisson : } P(X = k) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}$$

Le paramètre λ peut être calculé à partir de la probabilité qu'un puits ne contienne aucune copie mutée $P(X=0)$ par la relation suivante :

$$\text{si } k = 0 : \quad P(X = 0) = e^{-\lambda} \quad \Leftrightarrow \quad \lambda = -\ln(P(X = 0))$$

Or, $P(X=0)$ peut être estimé par la proportion p de puits ne contenant pas de copie mutée (puits FAM négatifs), ce qui nous permet d'estimer λ :

$$P(X = 0) \approx p = \frac{\text{nombre de puits FAM négatifs}}{\text{nombre total de puits}} \quad \Leftrightarrow \quad \lambda \approx -\ln(p)$$

Le nombre de copies mutées/mL de plasma est calculé à partir de la valeur estimée de λ , et des paramètres de l'analyse et de l'extraction (calculs non-montrés).

La précision de la concentration d'ADNtc mesurée par PCR digitale est donc dépendante des fluctuations d'échantillonnage de la proportion estimée p . Or, la variance d'une proportion estimée peut être calculée et vaut :

$$\text{Var}(p) = \frac{p \times (1 - p)}{\text{nombre total de puits}}$$

Connaissant la variance de p , il est possible de modéliser l'imprécision de la concentration d'ADNtc (dépend de la variance du logarithme de p , calculs non-montrés). L'imprécision de cette mesure augmente pour des concentrations faibles d'ADNtc, du fait du caractère aléatoire du pipetage d'un extrait d'ADN pauvre en copies mutées.

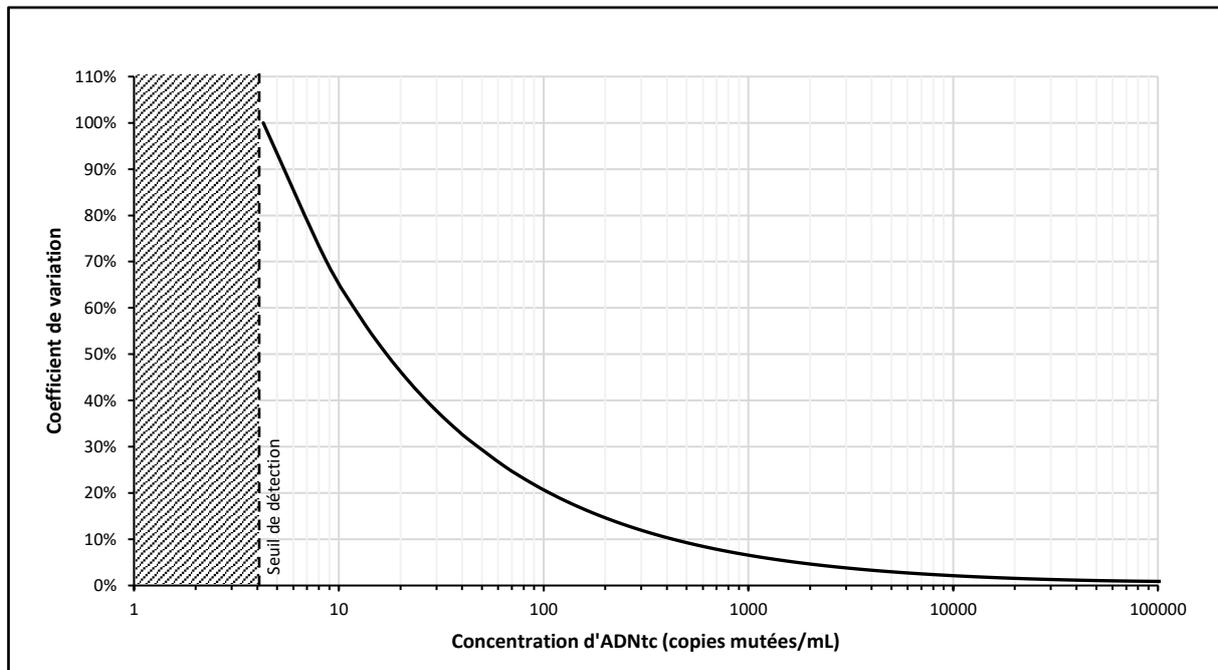


Figure 16. Précision de la mesure de la concentration d'ADNtc en PCR digitale. Les valeurs du coefficient de variation montrées ici à titre indicatif : elles sont calculées pour une puce de 20 000 puits totalement remplie et doivent être recalculées pour chaque puce en fonction des résultats.

3.3.2.2 Significativité des variations de concentrations d'ADNtc

L'imprécision de la PCR digitale est donc liée aux fluctuations d'échantillonnage de p , la proportion de puits ne contenant pas de copie mutée (puits FAM négatifs).

Soient p_1 et p_2 les proportions p mesurées à 2 points du suivi d'un patient. Si les proportions p_1 et p_2 sont statistiquement différentes, pour un risque de première espèce α donné, alors les concentrations d'ADNtc mesurées à ces 2 points du suivi le seront également.

Nous pouvons donc déterminer, par un simple Z-test de comparaison de proportions, si les concentrations d'ADNtc diffèrent entre 2 points du suivi, pour un risque d'erreur α donné, en comparant aux valeurs limites de la loi normale centrée réduite le paramètre Z tel que :

$$Z = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{\frac{p_1(1-p_1)}{nb \text{ puits total}_1} + \frac{p_2(1-p_2)}{nb \text{ puits total}_2}}} \text{ suit une loi normale centrée réduite } N(0 ; 1)$$

3.3.2.3 Critères d'évaluation

Nous avons défini dans ce modèle la progression biologique (Pb) et la réponse biologique (Rb) en fonction de la significativité des variations :

- Une augmentation significative de l'ADNct par rapport au nadir, pour un risque d'erreur α , définissait la Pb. La Pb était considérée comme un statut définitif.

$$H_0 : P(X = 0) \geq P(X = 0)_{nadir} \Leftrightarrow [ADNtc] \leq [ADNtc]_{nadir}$$

$$H_1 : P(X = 0) < P(X = 0)_{nadir} \Leftrightarrow [ADNtc] > [ADNtc]_{nadir}$$

$$Z = \frac{p - p_{nadir}}{\sqrt{\frac{p(1-p)}{nb \text{ puits total}} + \frac{p_{nadir}(1-p_{nadir})}{nb \text{ puits total}_{nadir}}}}$$

$$Si Z > Z_\alpha \Rightarrow \text{Rejet de } H_0 \Rightarrow Pb$$

$$Si Z \leq Z_\alpha \Rightarrow \text{Acceptation de } H_0 \Rightarrow \text{pas de Pb}$$

- En l'absence de Pb antérieure, une diminution significative de l'ADNct par rapport au niveau basal, pour un risque d'erreur α , définissait la Rb.

$$H_0 : P(X = 0) \leq P(X = 0)_{basal} \Leftrightarrow [ADNtc] \geq [ADNtc]_{basal}$$

$$H_1 : P(X = 0) > P(X = 0)_{basal} \Leftrightarrow [ADNtc] < [ADNtc]_{basal}$$

$$Z = \frac{p - p_{basal}}{\sqrt{\frac{p(1-p)}{nb \text{ puits total}} + \frac{p_{basal}(1-p_{basal})}{nb \text{ puits total}_{basal}}}}$$

$$Si Z < Z_\alpha \Rightarrow \text{Rejet de } H_0 \Rightarrow Rb$$

$$Si Z \geq Z_\alpha \Rightarrow \text{Acceptation de } H_0 \Rightarrow \text{pas de Rb}$$

- En l'absence de Pb ou de Rb, le patient était considéré en stabilité biologique (Sb)

Dans ce modèle, un seul paramètre était à établir : le risque de première espèce α à utiliser pour établir la significativité de variations d'ADNtc observées. De façon similaire à l'étude des seuils de variation relative, nous avons testé pour chaque patient R+ et R-P+ diverses valeurs de risque α , afin d'établir, pour chaque valeur, la sensibilité et la spécificité de la Pb pour la détection des patients R-P+, et la sensibilité et la spécificité de la Rb pour l'identification des patients R+, ainsi que les délais de détection par rapport à l'imagerie. Ces données ont été évaluées à l'aide de courbes ROC.

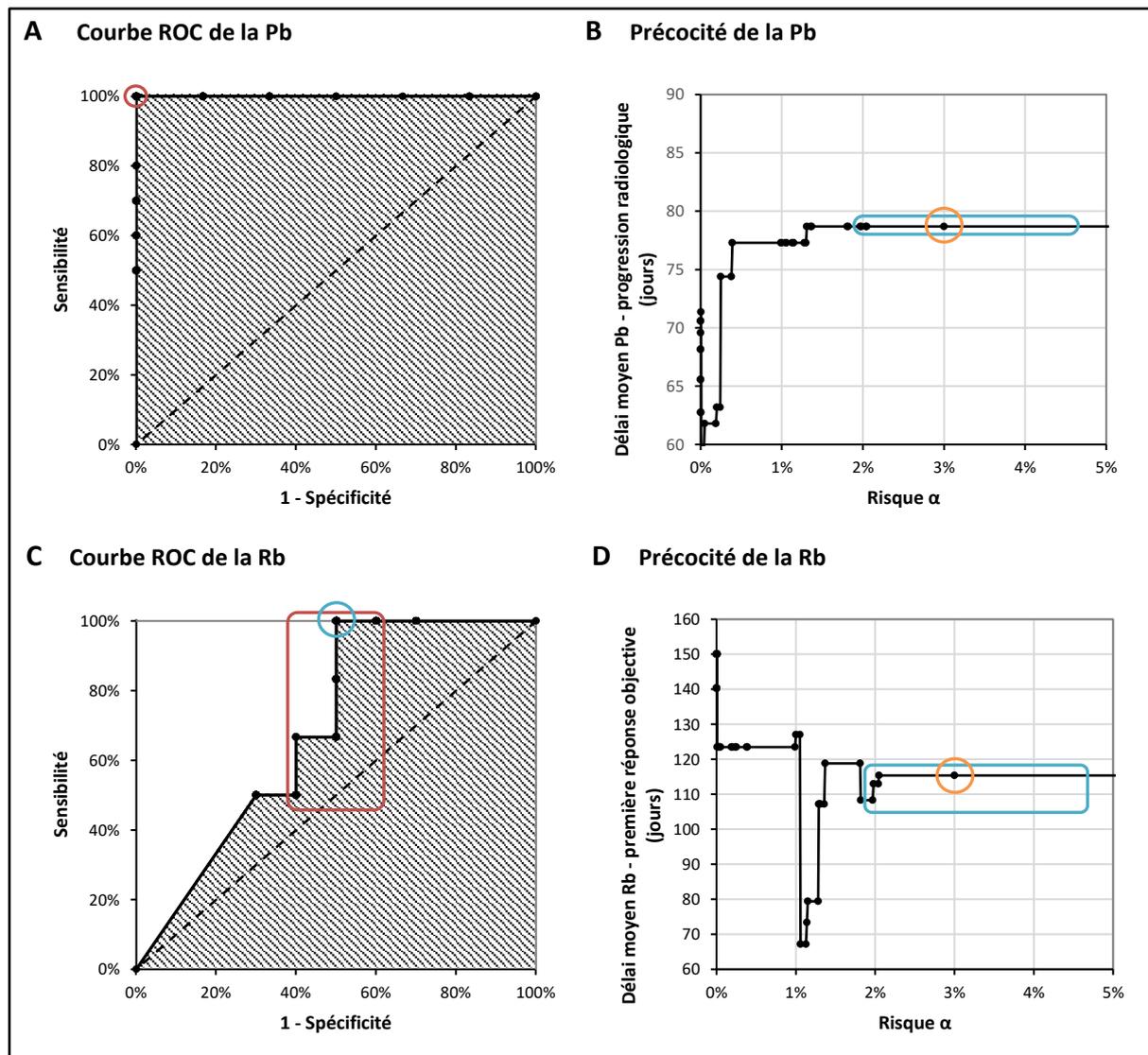


Figure 17. A : Courbe ROC de la Pb, pour l'identification des patients R-P+. AUC = 1. B : Délai moyen entre la détection de la Pb et la progression radiologique. C : Courbe ROC de la Rb, pour l'identification des patients R+. AUC = 0,692. D : Délai moyen entre la détection de la Rb et la date de première réponse objective. La Pb identifiait les patients R-P+ avec une sensibilité = 100% et une spécificité = 100% pour un risque α compris entre 0,007% et 24% (zones rouges). Pour un risque α compris entre 1,82% et 4,45%, la Rb identifiait les patients R+ avec une sensibilité = 100% et une spécificité = 50% (zones bleues). Un risque α = 3% permettait une détection de la Pb en moyenne 78,7 jours avant la progression chez les patients R-P+, et une détection de la Rb en moyenne 115,3 jours avant la première réponse objective, chez les patients R+ (cercles oranges).

La Pb permettait, dans ce modèle, la détection des patients R-P+ selon une courbe ROC d'AUC = 1. Pour risque α compris entre 0,007% et 24%, la Pb identifiait les patients R-P+ avec une sensibilité et une spécificité de 100%, en moyenne 78,7 jours avant la progression radiologique (min = 0 jour, max = 169 jours)).

La Rb permettait, dans ce modèle, la détection des patients R-P+ selon une courbe ROC d'AUC = 0,692. Pour risque α compris entre 2,05% et 4,45%, la Pb identifiait les patients R-P+ avec une sensibilité de 100 % et une spécificité de 50%, en moyenne 115,3 jours avant la date de première réponse objective (min = 44 jours, max = 268 jours)).

Un risque α égal à 3% a été retenu pour la suite de l'étude.

PROGRESSION BIOLOGIQUE (PB)	Augmentation significative de la concentration d'ADNtc par rapport au nadir, à un risque α = 3% ou Pb antérieure
REPONSE BIOLOGIQUE (RB)	En l'absence de Pb : Diminution significative de la concentration d'ADNtc par rapport au niveau basal, à un risque α = 3% ou Rb antérieure
STABILITE BIOLOGIQUE (SB)	Absence de Pb ou de Rb

Tableau 12. Caractérisation de la réponse aux immunothérapies par nos critères biologiques.

Au total, la prise en compte de l'imprécision de la technique de PCR digitale permet d'améliorer la sensibilité et la précocité de détection des patients non-répondeurs aux anti-PD1. Nous avons donc retenu ces critères pour l'évaluation des cinétiques d'ADNtc au cours du suivi des patients traités par anti-PD1.

Afin d'évaluer la pertinence clinique de notre biomarqueur, nous avons évalué la survie sans progression des patients en fonction de la première évaluation biologique.

3.3.3 Réponse biologique à la première évaluation biologique

A la première évaluation biologique, aux alentours du 15^{ème} jour de traitement par anti-PD1, aucun patient R+ n'a présenté de Pb ou de Sb.

5 patients ont présenté une Pb à 15 jours de traitement : 3 patients étaient R-P+ et 2 patients étaient R-P- (patients à réponse indéterminée), soit un taux de réponse de 0%. Aucun de ces patients n'a présenté de survie sans progression supérieure à 115 jours, excluant sans équivoque un éventuel bénéfice clinique associé au traitement par anti-PD1. La Pb était détectée chez les patients R-P+ 92 à 98 jours avant la progression radiologique.

5 patients ont montré une Sb au 15^{ème} jour de traitement : 2 patients appartenaient au groupe R-P+ et 3 patients appartenaient au groupe R-P-. Le taux de réponse de ces patients était également de 0%. Aucun de ces patients n'a présenté de survie sans progression supérieure à 120 jours sous anti-PD1. Par ailleurs, ces patients ne différaient pas significativement des patients en Pb au 15^{ème} jour, en termes de survie sans progression et survie globale ($p = 0,610$ et $p = 0,961$).

Enfin, 12 patients ont présenté une Rb après 15 jours de traitement, dont 6 patients R+, 5 patients R-P+ et 1 patient R-P- décédé prématurément après 56 jours de suivi. Le taux de réponse aux anti-PD1 était de 50%, et le taux de survie sans progression à 1 an était de 54,5%. La survie sans progression était significativement meilleure que celle des patients avec Pb à 15 jours et avec Sb à 15 jours ($p = 0,001$ et $p = 0,030$, respectivement). Dans un modèle de Cox multivarié, la présence d'une Rb à 15 jours était le seul facteur pronostic indépendant associé à la survie sans progression ($p = 0,021$), après ajustement sur les autres facteurs pronostics précédemment étudiés (présence de métastases pulmonaires, présence de métastases viscérales non-pulmonaires, activité LDH, concentration basale d'ADNtc). La présence d'une Rb au 15^{ème} jour était également associée à un pronostic favorable en survie globale par rapport aux patients Pb ou Sb à 15 jours ($p = 0,049$ et $p = 0,041$, respectivement). Néanmoins, l'analyse de survie multivariée n'a pas pu montrer l'indépendance de la Rb au 15^{ème} jour par rapport aux autres facteurs pronostics associés survie globale ($p = 0,079$).

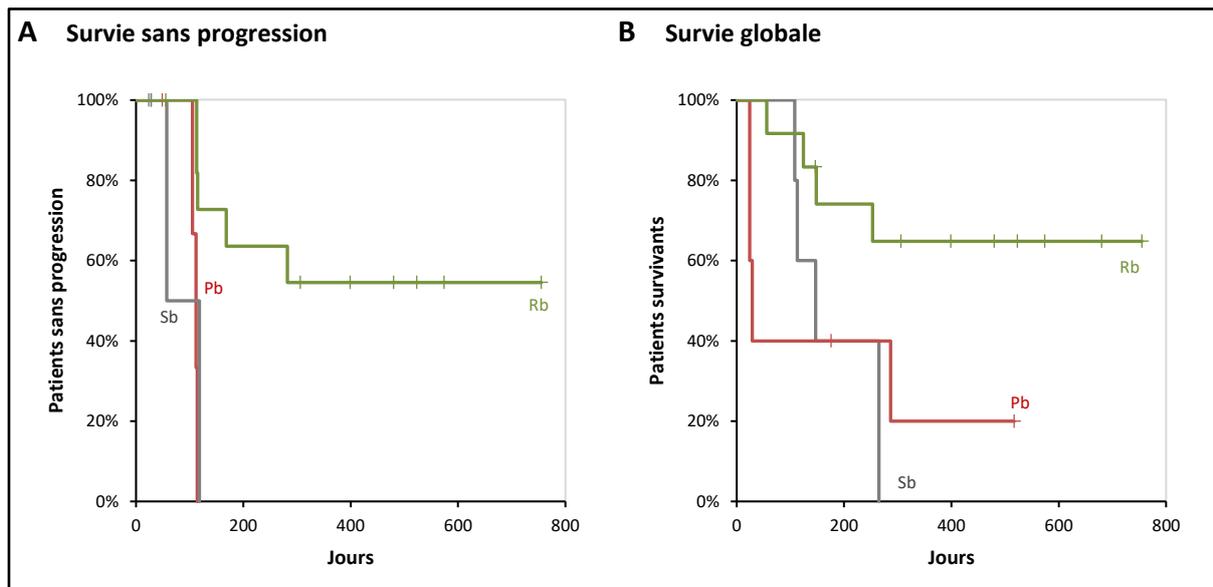


Figure 18. A : Estimation de Kaplan-Meier pour la survie sans progression, en fonction de la réponse biologique au 15^{ème} jour. La détection d'une Pb ou la Sb au 15^{ème} jour de traitement étaient associées à une survie sans progression <120 jours, significativement inférieure à la survie sans progression des patients en Rb au 15^{ème} jour ($p = 0,001$ et $p = 0,030$ respectivement). **B : Estimation de Kaplan Meier pour la survie globale, en fonction de la réponse biologique au 15^{ème} jour.** La détection d'une Rb au 15^{ème} jour est associée à un pronostic favorable en survie globale, par rapport aux patients présentant Pb ou une Sb initialement ($p = 0,049$ et $0,041$ respectivement).

Au total, l'absence de Rb au 15^{ème} jour était un prédicteur indépendant, dans notre cohorte, d'une absence de bénéfice clinique aux anti-PD1, avec une survie sans progression inférieure à 120 jours pour la totalité des 10 patients non-Rb au 15^{ème} jour de traitement.

Néanmoins, la moitié des patients Rb à 15 jours n'a pas présenté de réponse objective à l'imagerie, et a progressé au cours du suivi. Deux hypothèses pouvaient expliquer la détection d'une Rb chez ces patients : soit le traitement n'avait effectivement eu aucun effet, auquel cas il s'agissait d'un défaut de spécificité de notre biomarqueur, soit les anti-PD1 avaient eu un effet thérapeutique faible ou transitoire, détecté par l'ADNtc, et non par l'imagerie. Ces patients présentaient une survie sans progression légèrement supérieure à celle des patients Pb et Sb à 15 jours, néanmoins, cette différence n'était pas assez marquée pour être significative ($p = 0,105$). En revanche, du fait de notre faible effectif, la puissance du test était faible, calculée a posteriori à 4,3%, ce qui nous a conduit à ne pas remettre en cause, pour l'heure, la spécificité de notre analyse pour la détection de la réponse aux anti-PD1.

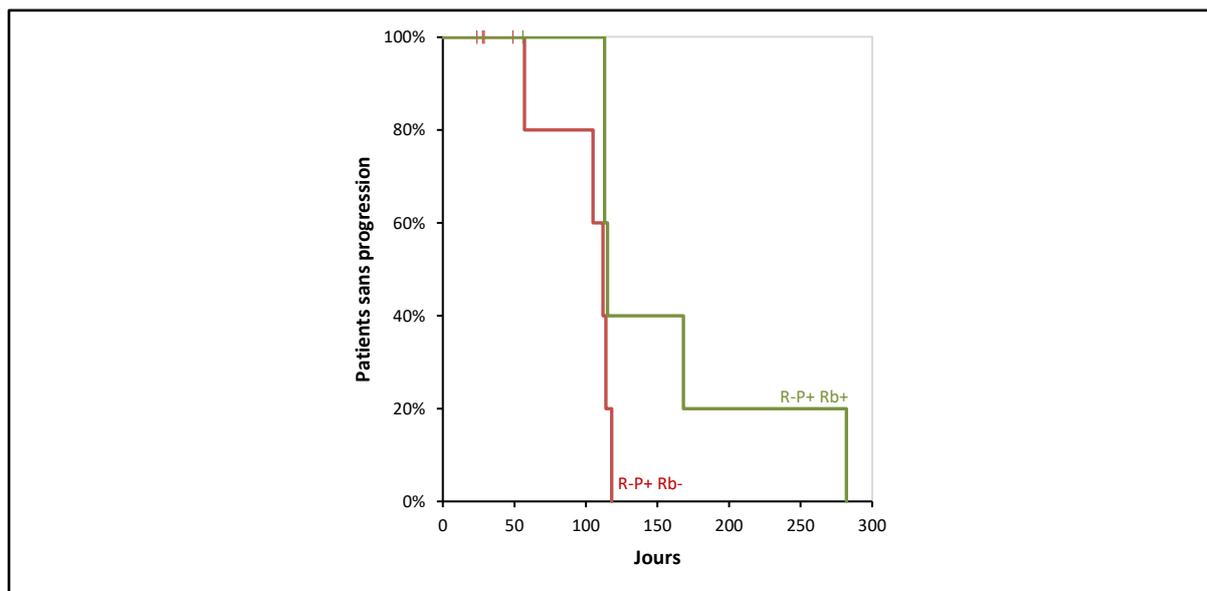


Figure 19. Courbes de Kaplan-Meier pour la survie sans progression des patients R-P+, selon qu'ils aient ou non présenté une Rb. Il n'y avait pas de différence significative en survie sans progression entre les patients R-P+, selon qu'ils aient présenté ou non une Rb.

Par ailleurs, aucune caractéristique des patients Rb à 15 jours n'était associée à la survenue d'une progression ultérieure. En revanche, les 5 patients ayant progressé après la Rb, ainsi que le patient R-P+ décédé prématurément, ont tous présenté une Pb au cours de leur suivi : la poursuite du suivi biologique au-delà de la première évaluation semblait donc nécessaire pour la détection précoce de la progression chez ces patients.

3.3.4 Stratégie de suivi

La nécessité de poursuivre le suivi biologique au-delà de la première évaluation soulevait deux questions : combien de points de suivi réaliser ? Et quand effectuer de nouveaux dosages d'ADNtc ?

La Pb étant à la fois dépendante de la détection du nadir de la cinétique et de la détection de l'augmentation de la concentration d'ADNtc, plus le nombre de points de suivi est important, plus il y a de chances d'identifier une Pb chez un patient R-P+ initialement Rb. En revanche, augmenter le nombre de dosages d'ADNtc réalisés au cours du suivi est également source de contraintes liées au prélèvement, au stockage et à l'analyse d'un nombre élevé de prélèvements. Il convenait donc de définir une stratégie de suivi limitant les re-prélèvements aux seuls points de suivi utiles pour la détection précoce de la progression de la maladie.

Afin de déterminer la stratégie optimale à adopter, nous avons effectué des simulations de suivi biologique, en faisant varier le nombre et les temps de re-prélèvement. Dans chaque configuration, nous avons évalué pour chaque patient Rb à 15 jours si une Pb était détectée, et avec quel délai la Pb permettait d’anticiper la progression radiologique.

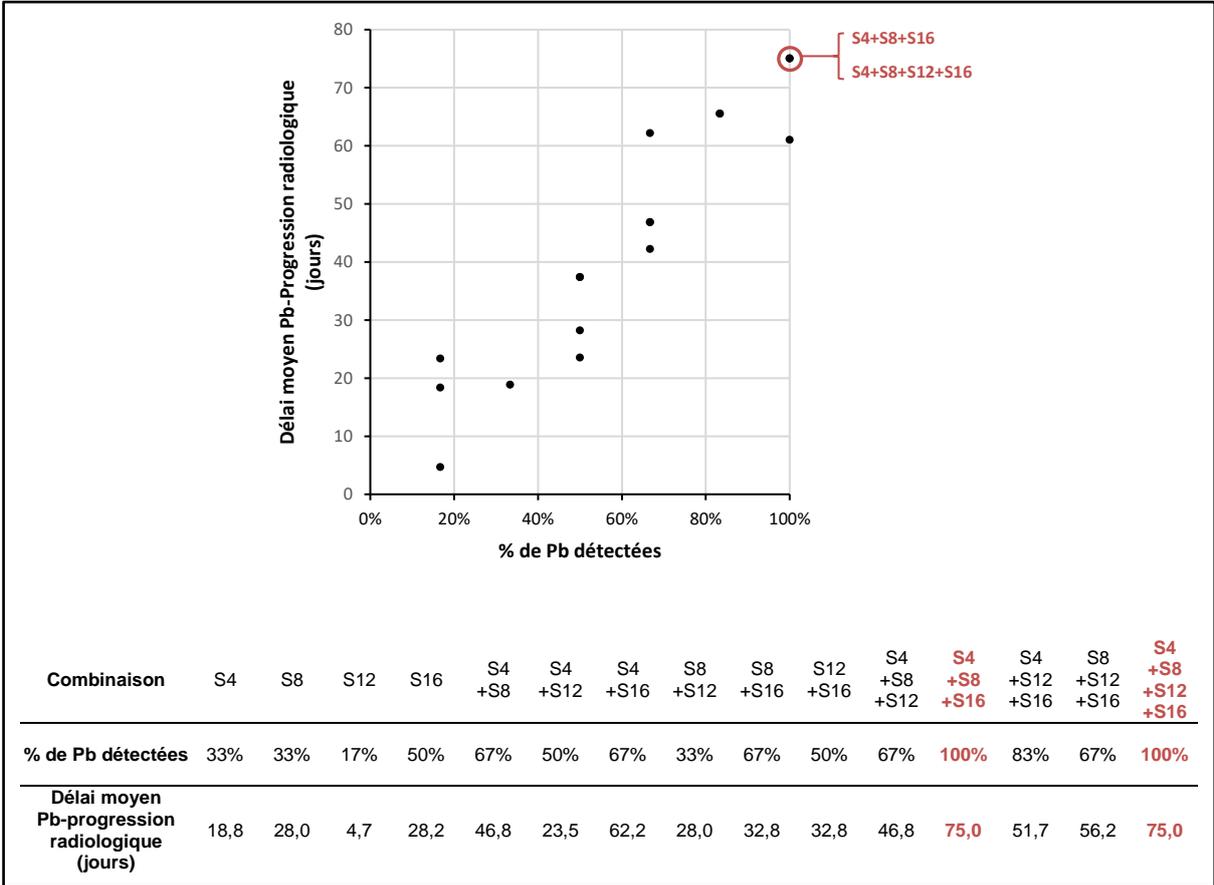


Figure 20. Evaluation des stratégies de suivi, après la 2^{ème} semaine. Les stratégies impliquant le dosage de l’ADNtc à 4, 8 et 16 semaines permettent de détecter la Pb chez tous les patients R-P+ ayant présenté une Rb à 2 semaines, en moyenne 75 jours avant la progression radiologique.

Au total, aucune des stratégies testées n’a montré de Pb chez les patients Rb à 15 jours et n’ayant pas progressé ultérieurement.

Les stratégies impliquant un seul nouveau dosage entre le 1^{er} et le 4^{ème} mois étaient insuffisantes : elles ne permettaient de détecter la Pb que chez 1 à 3 patients sur les 6 attendus, et ne permettaient de gagner que 4,7 à 28,2 jours par rapport à l’imagerie, en moyenne.

Les stratégies impliquant 2 nouveaux dosages au-delà du 15^{ème} jour semblaient plus intéressantes : elles permettaient la détection d'une Pb chez 2 à 4 patients sur les 6 attendus, avec un gain 23,5 à 62,2 jours en moyenne par rapport à la détection radiologique de la progression. En particulier, la stratégie impliquant un re-dosage au 2^{ème} et au 4^{ème} mois semblait particulièrement intéressante, puisqu'elle permettait de détecter la Pb chez 4 patients, tout en présentant l'avantage organisationnel d'être concomitante aux évaluations thérapeutiques, habituellement réalisées tous les 2 mois.

Les stratégies impliquant 3 re-dosages entre le 1^{er} et le 4^{ème} mois amélioraient encore la détection de la Pb. En particulier, le re-dosage à 1 mois, 2 mois et 4 mois permettait de détecter une Pb chez la totalité des 6 patients Rb à 15 jours présentant une progression ou un décès précoces, en moyenne 75 jours avant leur survenue. Cette stratégie présentait en outre l'avantage, cité précédemment, d'être concomitante aux évaluations thérapeutiques des 2^{ème} et 4^{ème} mois. L'ajout d'un dosage à 3 mois n'apportait pas de bénéfice.

En conséquence, le modèle de suivi que nous avons retenu comportait jusqu'à 5 points de suivi, avec un prélèvement à l'initiation du traitement, puis, lorsque l'ADNtc basal était détectable, un prélèvement à la 2^{ème} semaine. En présence d'une Rb à la première évaluation, l'ADNtc était redosé à la 4^{ème}, la 8^{ème} et la 16^{ème} semaine, ou jusqu'à détection d'une Pb.

3.3.5 Evaluation du modèle de suivi

Au total, dans notre stratégie de suivi, la survie sans progression et la survie globale des patients présentant une Pb à 4, 8 ou 16 semaines ne différait pas significativement de celle des patients sans Rb à 2 semaines ($p = 0,105$ et $p = 0,605$ respectivement). En revanche, le maintien d'une Rb jusqu'à la 16^{ème} semaine de traitement était associé à des taux de survie sans progression et de survie globale de 100% à la clôture de l'étude, pour des durées de suivi de 306 à 755 jours. La survie sans progression et la survie globale des patients maintenant une Rb jusqu'à la 16^{ème} semaine étaient nettement supérieures à celles des patients Pb à 4, 8 ou 16 semaines ($p = 0,001$ et $p = 0,010$ respectivement) et à celles des patients sans Rb à 2 semaines ($p = 0,001$ et $p = 0,002$ respectivement).

L'analyse de survie multivariée a montré que la persistance d'une Rb à la 16^{ème} semaine était associée à la survie sans progression ($p < 0,0001$) et à la survie globale ($p = 0,004$) indépendamment des autres facteurs pronostiques précédemment évalués (présence de métastases pulmonaires, présence de métastases viscérales non-pulmonaires, activité LDH, concentration basale d'ADNtc) après ajustement (modèle de Cox avec vraisemblance pénalisée de Firth).

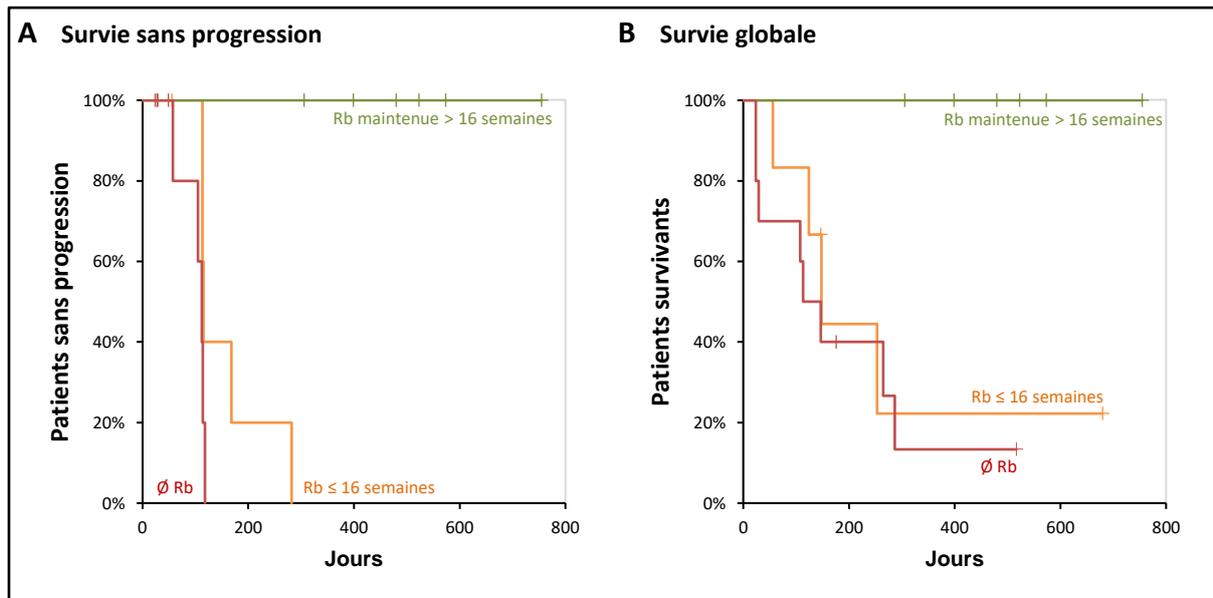


Figure 21. A : Estimation de Kaplan-Meier pour la survie sans progression, en fonction du suivi biologique. Aucun patient ayant maintenu une Rb jusqu'à la 16^{ème} semaine n'a présenté de progression, avec une survie sans progression significativement supérieure à celle des patients n'ayant pas présenté de Rb ou n'ayant pas maintenu de Rb jusqu'à la 16^{ème} semaine ($p = 0,001$ et $p = 0,001$ respectivement). **B : Estimation de Kaplan Meier pour la survie globale, en fonction du suivi biologique.** Aucun patient ayant maintenu une Rb jusqu'à la 16^{ème} semaine n'a présenté de décès, avec une survie globale significativement supérieure à celle des patients n'ayant pas présenté de Rb ou n'ayant pas maintenu de Rb jusqu'à la 16^{ème} semaine ($p = 0,002$ et $p = 0,010$ respectivement).

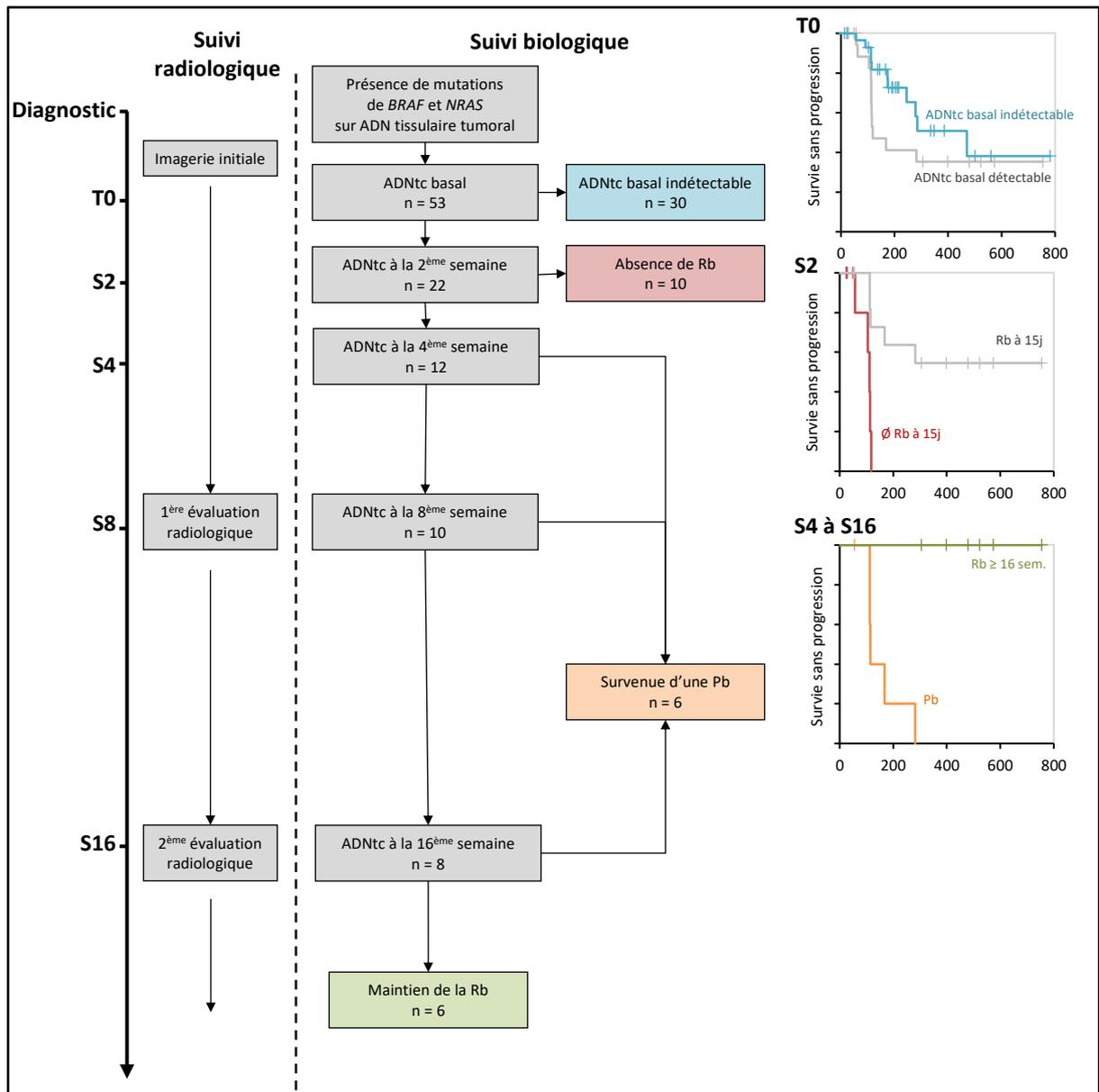


Figure 22. Modèle de suivi biologique final

Discussion

Notre étude propose le premier modèle de surveillance biologique de la réponse du mélanome cutané métastatique traité par immunothérapie anti-PD1, basé sur le suivi quantitatif de l'ADNtc.

Le maintien jusqu'à la 16^{ème} semaine d'une réponse biologique, définie par une diminution significative de l'ADNtc plasmatique par rapport au niveau basal, était prédictive d'une réponse et d'une survie prolongées du mélanome cutané métastatique aux immunothérapies anti-PD1, indépendamment des autres facteurs pronostics.

Inversement, l'absence de réponse biologique à la 2^{ème} semaine était prédictive d'une résistance primaire au traitement, avec une survie sans progression inférieure à 120 jours. La survenue jusqu'à la 16^{ème} semaine d'une progression biologique, définie par une augmentation significative de l'ADNtc par rapport au nadir, permettait de prédire la résistance aux anti-PD1 en moyenne 75 jours avant la progression clinique.

Le suivi de l'ADNtc impose en premier lieu d'avoir connaissance d'une mutation somatique spécifique identifiée sur le tissu tumoral, afin d'identifier et de quantifier la fraction de l'ADN circulant d'origine tumorale. A cet égard, le mélanome cutané semble être un modèle particulièrement adapté : d'une part, car il s'agit du cancer porteur de la charge mutationnelle moyenne la plus élevée, en particulier sur les hotspots des gènes *BRAF* ou *NRAS*, où une mutation est retrouvée dans 60% à 70% des cas, et d'autre part car la recherche des mutations de *BRAF* et de *NRAS* est d'ores et déjà réalisée en routine pour tout mélanome cutané métastatique, afin de poser l'indication d'un traitement par inhibiteurs de BRAF. Néanmoins, en l'absence de mutation de *BRAF* ou *NRAS*, notre modèle de suivi ne peut pas être utilisé.

La recherche sur le tissu tumoral d'autres mutations, par NGS, pourrait être une alternative intéressante dans les cas où les gènes *BRAF* et *NRAS* ne seraient pas mutés. Néanmoins, cette pratique soulève une problématique quant au choix de la cible moléculaire à rechercher sur l'ADN circulant : en effet, le marqueur idéal pour la détection et le suivi de l'ADNtc serait une mutation présente dans la totalité des lignées cellulaires cancéreuses et absente dans les cellules saines, mais cette caractéristique reste difficile à

déterminer en pratique. Ainsi, même des mutations oncogéniques apparaissant précocement au cours de la transformation tumorale peuvent ne pas répondre totalement à ces critères : c'est notamment le cas de la mutation *BRAF* p.V600E, dont une hétérogénéité entre les différents sites métastatiques est décrite dans 14 à 18% des mélanomes cutanés métastatiques (111,112), tandis que 80% des naevi bénins sont porteurs de cette altération (bien que cela n'entraîne pas l'émission d'une quantité d'ADN muté détectable dans la circulation des sujets sains) (10). Cette problématique peut cependant être nuancée, dans le cas des immunothérapies anti-PD1, puisqu'en l'absence de lien *a priori* entre la présence d'une mutation individuelle et la réponse au traitement, on peut supposer qu'une sous-population de cellules tumorales non-porteuse de la mutation réponde de la même manière que la lignée cellulaire suivie par la mutation. Au demeurant, il semble capital de choisir une mutation susceptible d'être portée par la majorité -à défaut de la totalité- des cellules tumorales, afin de garantir sa présence en quantité importante dans l'ADN circulant.

Le suivi de mutations rares identifiées par NGS sur le tissu tumoral serait néanmoins associé à d'importantes contraintes techniques : cela impliquerait la mise au point et la validation, pour chaque patient, d'une technique de dPCR personnalisée adaptée à la quantification de la mutation, avant l'initiation du traitement anti-PD1. Pour pallier à cette contrainte, l'utilisation du NGS pourrait également être envisagée pour quantifier l'ADNtc au cours du suivi, à la place de la dPCR. Cette méthode présente néanmoins plusieurs limitations : en premier lieu, le NGS ne permet pas de mesurer directement la concentration absolue de l'ADNtc, mais uniquement son abondance relative par rapport à la quantité totale d'ADN circulant. Or, la quantification relative de l'ADNtc est influencée par les multiples facteurs physiopathologiques ou préanalytiques induisant une augmentation de la libération d'ADN non-tumoral dans le plasma, notamment l'inflammation, la stimulation de l'immunité antitumorale, la lyse du parenchyme sain au cours de la progression tumorale, les procédures médicales ou chirurgicales invasives ou encore la lyse leucocytaire *in vitro*. Bien que la concentration absolue d'ADNtc puisse être évaluée à partir de sa quantification relative, par la mesure au préalable de la concentration totale d'ADN circulant, cette approche reste moins précise que la dPCR. Ce n'est d'ailleurs pas la seule source d'imprécision de la quantification de l'ADNtc en NGS : à celle-ci s'ajoutent également les fluctuations d'échantillonnage liées au pipetage de l'extrait d'ADN (de façon similaire à la dPCR), ainsi qu'une variabilité de mesure de la

fréquence allélique en rapport avec l'existence d'erreurs de séquençage. Au total, l'existence de ces trois sources d'imprécision rendent complexe l'extrapolation de nos critères d'évaluation au NGS, puisqu'ils sont basés sur l'évaluation de la significativité des variations d'ADNtc par rapport à la précision de la technique employée.

En présence d'une mutation de *BRAF* ou de *NRAS* sur le tissu tumoral, le suivi de la concentration d'ADNtc nécessitait que la mutation soit détectable dans l'ADN circulant dès l'initiation du traitement. Dans notre cohorte, 23/53 patients (43,4%) présentaient une concentration basale d'ADNtc détectable, soit un taux de détection nettement inférieur à ceux rapportés dans la littérature (99,102–107) pour des techniques similaires. Ces études portaient sur une population différente de celle étudiée dans notre étude : il s'agissait de patients atteints de mélanome cutané métastatique de stade IV ou de stade III non-résécable, porteurs de mutations du codon 600 de *BRAF* et naïfs de tout traitement systémique ; la mutation *BRAF* p.V600E était retrouvée sur l'ADN circulant dans 65 à 84% des cas. Lors de la mise au point de notre technique de dPCR, nous avons obtenu, sur une population similaire, un taux de détection de 82,9% (29/35 patients), ce qui semble pouvoir mettre hors de cause un éventuel défaut de sensibilité de notre analyse de dPCR. En revanche, l'utilisation dans notre étude d'un volume d'extrait d'ADN faible (6,5 µL, contre 13 µL répartis sur 2 puces dans notre mise au point) et un seuil de détectabilité élevé (> 4 copies mutées/mL, contre ≥ 2 copies mutées/mL dans notre mise au point) pourraient expliquer en partie le faible taux de détection. En incluant les patients ayant une concentration d'ADNtc égale à 4 copies mutées/mL, la mutation était détectée pour 28 patients sur 53 (52,8%), soit un taux de détection similaire à celui obtenu par Lee et al. sur une population comparable à celle de notre étude (40/76 patients, 52,6%) (110). Les caractéristiques de la population ne semblent toutefois pas être un facteur déterminant, puisque nous n'avons pas trouvé d'association entre l'indétectabilité de l'ADNtc et la ligne thérapeutique, la nature du traitement antérieur, ou encore la mutation recherchée.

Lorsque l'ADNtc était initialement indétectable ou présent en faible quantité (4 copies mutées/mL), il n'était pas possible de quantifier une éventuelle diminution de sa concentration au cours du suivi : la Rb ne pouvait donc pas être objectivée. Pour cette raison, nous avons pris le parti, dans notre étude, de ne pas poursuivre le suivi biologique chez ces patients, bien que cela n'empêchait pas la quantification d'éventuelles

augmentations de l'ADNtc, et donc détection potentielle d'une Pb. Cette décision a été motivé par la faible sensibilité de détection de la Pb chez ces patients, mise en évidence à la phase de mise au point de notre étude : sur 11 patients dont l'ADNtc était initialement indétectable (2 patients R+P-, 2 patients R+P+, 5 patients R-P+, 2 patients R-P-), l'ADNtc était resté indétectable durant la totalité du suivi pour 10 patients, ou à une concentration très faible (8 copies mutées/mL) pour 1 patient, indépendamment de la réponse aux anti-PD1. La durée de suivi médiane était de 140 jours (23 à 245 jours), 81 prélèvements avaient été analysés (médiane : 8 prélèvements/patient). Rétrospectivement, aucune Pb n'avait été identifiée selon les critères que nous avons établis *a posteriori*. Notre observation avait par ailleurs été confirmée par l'étude de Lee et al. : au cours des 12 premières semaines de traitement, l'ADNtc était resté indétectable pour la totalité des 36 patients dont l'ADNtc était indétectable initialement, indépendamment de la réponse aux anti-PD1. L'étude avait analysé 120 prélèvements (médiane : 3 prélèvements/patient) (110).

Le faible taux de détection à l'initiation du traitement constitue l'une des principales limitations de notre modèle de suivi biologique. Augmenter isolément le taux de détection aurait cependant peu d'intérêt : cela conduirait à la détection de concentrations très faibles d'ADNtc, non-contributives pour le suivi, comme nous l'avons vu précédemment. Seule une augmentation conjointe du taux de détection et de la précision de la dPCR pourrait permettre la détection d'une Rb pour des concentrations basales faibles d'ADNtc. Or, comme la précision de quantification de la dPCR est dépendante de la concentration en copies mutées de la solution d'ADN analysée, il apparaît que seule l'utilisation d'extraits d'ADN plus concentrés, par l'extraction d'un volume de plasma plus important et/ou par la mise en œuvre de procédures de concentration par évaporation, pourrait permettre d'améliorer l'accès au suivi biologique. L'efficacité de telles procédures reste à déterminer.

En outre, la limitation liée à la détectabilité de l'ADNtc est à nuancer : en effet, l'intérêt du suivi biologique est ici de détecter les résistances primaires aux anti-PD1 plus précocement que l'imagerie. Cet intérêt s'exprime donc avant tout pour les patients dont le pronostic est défavorable, pour lesquels une survie courte nécessite d'évaluer rapidement la réponse tumorale aux anti-PD1. Or, nous avons montré que l'indétectabilité de l'ADNtc était un facteur de bon pronostic en survie globale (toutefois non-indépendant

de l'activité LDH) : ce résultat est par ailleurs confirmé par plusieurs études (104,110), et reflète vraisemblablement l'association entre concentration d'ADNtc et masse tumorale précédemment décrite (104,106). Ainsi, dans notre cohorte, les patients récusés du suivi biologique du fait d'un ADNtc indétectable avaient un taux de survie globale à 6 mois de 90,0% : la survie de ces patients semblait donc *a priori* compatible avec un suivi radiologique seul. A l'inverse, la possibilité d'utiliser l'ADNtc pour évaluer précocement de la réponse thérapeutique aux anti-PD1 semblait pertinente pour les patients ayant un niveau basal d'ADNtc détectable, dont le taux de survie globale à 6 mois était évalué à seulement 56,2%.

En reproduisant les résultats de Lee et al. avec nos données, nous avons montré que des critères d'évaluation qualitatifs, basés sur l'étude de l'indétectabilité de l'ADNtc au cours du suivi, ne permettaient pas d'identifier la résistance aux anti-PD1 de façon suffisamment spécifique, sensible et précoce pour pouvoir envisager leur utilisation pour la décision thérapeutique. L'existence d'une variabilité de mesure rend néanmoins le suivi quantitatif difficile, en particulier pour des valeurs faibles d'ADNtc, où les fluctuations liées à l'échantillonnage du prélèvement sont à l'origine de variations importantes à cette échelle, quelle que soit la technique de dPCR utilisée. Nos critères d'évaluation, basés sur la significativité des variations de l'ADNtc compte-tenu de la précision de la mesure, permettent une interprétation rationnelle des cinétiques d'ADNtc, *a priori* extrapolable à toutes les plateformes de dPCR.

Au cours du suivi biologique, la réponse thérapeutique aux anti-PD1 était systématiquement associée à des cinétiques d'ADNtc décroissantes (Annexe, patients 1-6), tandis que les cinétiques d'ADNtc associées à la résistance au traitement était beaucoup plus hétérogènes, mais présentaient toutes une ou plusieurs phases croissantes (Annexe, patients 7-16). De façon surprenante, la plupart des patients ayant présenté une progression clinique sous anti-PD1 ont montré des phases de décroissance de l'ADNtc après la détection de la Pb (voir Annexe, patients 7, 8, 10, 11, 15 et 16). Dans l'hypothèse où ces fluctuations seraient représentatives de la dynamique tumorale, ces données semblent suggérer l'existence d'une alternance entre échappement thérapeutique et reprise d'activité des anti-PD1, chez ces patients. Dans ce cas, la progression clinique sous anti-PD1 pourrait ne pas être nécessairement associé à l'échec du traitement. Les récents résultats d'une étude ancillaire de Long et al. semblent aller dans ce sens : parmi

85 patients ayant poursuivi un traitement par nivolumab après la progression clinique, une réduction du volume tumoral au-delà de -30% du niveau basal a été observée pour 24 patients (28%). Le taux de survie globale à 2 ans était de 59%, contre 25% pour un groupe contrôle non-traité par nivolumab après la progression (113). Cette hypothèse nécessite d'être confirmée par une étude clinique prospective : le cas échéant, la progression biologique ne permettrait plus d'exclure un bénéfice clinique, et notre modèle de suivi devrait être adapté. L'identification de cinétiques d'échappement thérapeutique/reprise d'activité par l'analyse de l'ADNtc pourrait alors présenter un intérêt pour prédire le bénéfice clinique associé à la poursuite des anti-PD1 après la progression clinique.

La place du suivi quantitatif de l'ADNtc dans la stratégie thérapeutique reste à déterminer. L'intérêt de la détection précoce de la résistance aux anti-PD1 est en partie conditionnée par l'existence d'alternatives thérapeutiques efficaces. A cet égard, l'utilisation de notre modèle de suivi biologique pourrait être particulièrement intéressante pour les patients atteints d'un mélanome cutané métastatique porteur d'une mutation *BRAF* p.V600 et recevant une immunothérapie anti-PD1 dès la première ligne de traitement. En effet, dans cette population de patients, porteurs par définition d'une mutation somatique permettant son suivi sur l'ADN circulant, les critères déterminant le choix entre inhibiteurs de *BRAF* et anti-PD1 en première ligne ne sont pas établis à l'heure actuelle. Dans ce contexte, une administration large des anti-PD1 associée au suivi biologique de la réponse thérapeutique permettrait de distinguer précocement les patients pour lesquels un bénéfice clinique durable est à attendre de l'immunothérapie, tout en permettant aux patients non-répondeurs d'avoir rapidement accès à un traitement efficace par inhibiteurs de *BRAF* en seconde ligne. Dans un autre contexte, le l'ADNtc pourrait être particulièrement utile pour le suivi du traitement par les associations anti-PD1 – anti-CTLA-4. En effet, l'administration de combinaisons d'immunothérapies en première ligne de traitement reste actuellement limitée, en particulier en France, en raison de la fréquence et de la sévérité des effets indésirables immunologiques qu'elle entraîne. L'utilisation de notre modèle de suivi biologique pourrait permettre de détecter précocement les patients résistants à la combinaison anti-PD1 – anti-CTLA-4, réduire dans le temps d'exposition de ces patients au risque d'intolérance, et ainsi améliorer le rapport bénéfice-risque global associé à ce traitement.

L'intérêt clinique de l'ADNtc pour le suivi de la réponse du mélanome cutané métastatique aux immunothérapies anti-PD1 doit être confirmé par des études cliniques prospectives, comparant en survie globale la stratégie de surveillance radio-clinique conventionnelle à une stratégie intégrant le suivi biologique, dans des protocoles thérapeutiques standardisés.

Conclusion

Le suivi quantitatif de l'ADN tumoral circulant est prédictif de la réponse du mélanome cutané métastatique à l'immunothérapie anti-PD1. Nous proposons un modèle de suivi biologique simple et non invasif, permettant d'identifier de manière sensible, spécifique et précoce les résistances primaires et les réponses durables, afin d'améliorer la prise en charge et le suivi des patients sous anti-PD1, pour lesquels les marqueurs prédictifs sont encore très limités.

Bibliographie

1. INCa. Les cancers en France, édition 2016 [Internet]. Les cancers en France. Disponible sur: http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=78
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD [Internet]. [cité 10 août 2017]. Disponible sur: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/
3. Eggermont AMM. Advances in systemic treatment of melanoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. oct 2010;21 Suppl 7:vii339-344.
4. Eggermont AMM, Kirkwood JM. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur J Cancer*. 1 août 2004;40(12):1825-36.
5. Avril MF, Aamdal S, Grob JJ, Hauschild A, Mohr P, Bonerandi JJ, et al. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 15 mars 2004;22(6):1118-25.
6. Chan XY, Singh A, Osman N, Piva TJ. Role Played by Signalling Pathways in Overcoming BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *Int J Mol Sci* [Internet]. 14 juill 2017 [cité 9 août 2017];18(7). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5536016/>
7. Lee J-H, Choi J-W, Kim Y-S. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol*. 1 avr 2011;164(4):776-84.
8. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 27 juin 2002;417(6892):949-54.
9. Brash DE. UV Signature Mutations. *Photochem Photobiol*. janv 2015;91(1):15-26.
10. Roh MR, Eliades P, Gupta S, Tsao H. Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res*. nov 2015;28(6):661-72.
11. Michaloglou C, Vredeveld LCW, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CMAM, et al. BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*. 4 août 2005;436(7051):720-4.
12. 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*. 30 juin 2011;364(26):2507-16.
13. McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol*. mars 2014;15(3):323-32.

14. Hauschild A, Grob J-J, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 28 juill 2012;380(9839):358-65.
15. Poulidakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature.* 18 mars 2010;464(7287):427-30.
16. Liste des tests de génétique somatique réalisés par les plateformes de génétique moléculaire des cancers [Internet]. [cité 11 août 2017]. Disponible sur: <http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/Soins/Les-tests-de-genetique-somatique/Les-tests-de-genetique-somatique/Liste-des-tests-de-genetique-somatique-realises-par-les-plateformes-de-genetique-moleculaire-des-cancers>
17. Chan XY, Singh A, Osman N, Piva TJ. Role Played by Signalling Pathways in Overcoming BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *Int J Mol Sci.* 14 juill 2017;18(7).
18. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, et al. Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med.* 12 juill 2012;367(2):107-14.
19. Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Di Giacomo AM, et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* sept 2016;17(9):1248-60.
20. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 1 août 2015;386(9992):444-51.
21. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 4 mars 2011;144(5):646-74.
22. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 3 avr 2015;348(6230):69-74.
23. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* 22 août 2013;500(7463):415-21.
24. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science.* 9 oct 2015;350(6257):207-11.
25. Janeway's immunobiology - NLM Catalog - NCBI [Internet]. [cité 12 août 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/nlmcatalog/101568727>

26. Linsley PS. Distinct roles for CD28 and cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 receptors during T cell activation? *J Exp Med.* 1 août 1995;182(2):289-92.
27. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol.* janv 2009;10(1):29-37.
28. Dolan DE, Gupta S. PD-1 pathway inhibitors: changing the landscape of cancer immunotherapy. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent.* juill 2014;21(3):231-7.
29. 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.
30. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 9 févr 2015;
31. 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.* 30 juin 2011;364(26):2517-26.
32. 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.
33. 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.* 3 juill 2017;JCO2016718023.
34. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2 juill 2015;373(1):23-34.
35. Puzanov I, Dummer R, Schachter J, Kang SP. Efficacy based on tumor PD-L1 expression in KEYNOTE-002, a randomized comparison of pembrolizumab (pembro; MK-3475) versus chemotherapy in patients (pts) with ipilimumab-refractory (IPI-R) advanced melanoma (MEL). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 mai 2015;33(15):3012-3012.
36. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 25 juin 2015;372(26):2521-32.
37. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 avr 2014;32(10):1020-30.

38. Hodi FS, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann KF, McDermott DF, et al. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* nov 2016;17(11):1558-68.
39. Volpe VO, Klufas DM, Hegde U, Grant-Kels JM. The new paradigm of systemic therapies for metastatic melanoma. *J Am Acad Dermatol.* août 2017;77(2):356-68.
40. Haute Autorité de Santé - OPDIVO - mélanome en association à YERVOY [Internet]. [cité 15 août 2017]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2770199/fr/opdivo-melanome-en-association-a-yervoy?xtmc=&xtcr=2
41. Haute Autorité de Santé - OPDIVO (nivolumab), anticorps anti-PD1 [Internet]. [cité 15 août 2017]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2639665/fr/opdivo-nivolumab-anticorps-anti-pd1
42. Haute Autorité de Santé - KEYTRUDA (pembrolizumab), anticorps anti-PD1 [Internet]. [cité 15 août 2017]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2639673/fr/keytruda-pembrolizumab-anticorps-anti-pd1?xtmc=&xtcr=1
43. Recommandation pour la prise en charge du mélanome par les nouvelles immunothérapies Anti-PD1 OPDIVO et KEYTRUDA [Internet]. [cité 15 août 2017]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2016-06/la_recommandation_prise_en_charge_du_melanome_par_les_nouvelles_immunotherapies_anti-pd1_opdivo_et_keytruda.pdf
44. Haute Autorité de Santé - YERVOY Mélanome 1ère et 2ème ligne [Internet]. [cité 15 août 2017]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2769366/fr/yervoy-melanome-1ere-et-2eme-ligne?xtmc=&xtcr=1
45. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* déc 2016;17(12):e542-51.
46. Johnson DB, Frampton GM, Rioth MJ, Yusko E, Xu Y, Guo X, et al. Targeted Next Generation Sequencing Identifies Markers of Response to PD-1 Blockade. *Cancer Immunol Res.* nov 2016;4(11):959-67.
47. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell.* 24 mars 2016;165(1):35-44.
48. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 27 nov 2014;515(7528):568-71.

49. Daud AI, Loo K, Pauli ML, Sanchez-Rodriguez R, Sandoval PM, Taravati K, et al. Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma. *J Clin Invest*. 1 sept 2016;126(9):3447-52.
50. Chen P-L, Roh W, Reuben A, Cooper ZA, Spencer CN, Prieto PA, et al. Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov*. août 2016;6(8):827-37.
51. Loo K, Tsai KK, Mahuron K, Liu J, Pauli ML, Sandoval PM, et al. Partially exhausted tumor-infiltrating lymphocytes predict response to combination immunotherapy. *JCI Insight*. 20 juill 2017;2(14).
52. Ji R-R, Chasalow SD, Wang L, Hamid O, Schmidt H, Cogswell J, et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother CII*. juill 2012;61(7):1019-31.
53. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 27 nov 2014;515(7528):563-7.
54. Ribas A, Robert C, Hodi FS, Wolchok JD, Joshua AM, Hwu W-J, et al. Association of response to programmed death receptor 1 (PD-1) blockade with pembrolizumab (MK-3475) with an interferon-inflammatory immune gene signature. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 mai 2015;33(15_suppl):3001-3001.
55. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 déc 2009;15(23):7412-20.
56. Hodi FS, Hwu W-J, Kefford R, Weber JS, Daud A, Hamid O, et al. Evaluation of Immune-Related Response Criteria and RECIST v1.1 in Patients With Advanced Melanoma Treated With Pembrolizumab. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 mai 2016;34(13):1510-7.
57. Chiou VL, Burotto M. Pseudoprogression and Immune-Related Response in Solid Tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 nov 2015;33(31):3541-3.
58. Nishino M, Giobbie-Hurder A, Gargano M, Suda M, Ramaiya NH, Hodi FS. Developing a common language for tumor response to immunotherapy: immune-related response criteria using unidimensional measurements. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 juill 2013;19(14):3936-43.
59. Bohnsack O, Hoos A, Ludajic K. Adaptation and modification of the immune related response criteria (IRRC): IrRECIST. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 mai 2014;32(15_suppl):e22121-e22121.
60. Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, Ford R, Schwartz LH, Mandrekar S, et al. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol*. 1 mars 2017;18(3):e143-52.

61. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, 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*. 20 déc 2009;27(36):6199-206.
62. Sanmamed MF, Fernández-Landázuri S, Rodríguez C, Lozano MD, Echeveste JI, Pérez Gracia JL, et al. Relevance of MIA and S100 serum tumor markers to monitor BRAF inhibitor therapy in metastatic melanoma patients. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 15 févr 2014;429:168-74.
63. Egberts F, Kotthoff EM, Gerdes S, Egberts JH, Weichenthal M, Hauschild A. Comparative study of YKL-40, S-100B and LDH as monitoring tools for Stage IV melanoma. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. mars 2012;48(5):695-702.
64. Alegre E, Sammamed M, Fernández-Landázuri S, Zubiri L, González Á. Circulating biomarkers in malignant melanoma. *Adv Clin Chem*. 2015;69:47-89.
65. Felix J, Cassinat B, Porcher R, Schlageter M-H, Maubec E, Pages C, et al. Relevance of serum biomarkers associated with melanoma during follow-up of anti-CTLA-4 immunotherapy. *Int Immunopharmacol*. nov 2016;40:466-73.
66. Barak V, Leibovici V, Peretz T, Kalichman I, Lotem M, Merims S. Assessing Response to New Treatments and Prognosis in Melanoma Patients, by the Biomarker S-100 β . *Anticancer Res*. déc 2015;35(12):6755-60.
67. 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*. 1 oct 2013;23(5):396-401.
68. 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.
69. Steinman CR. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest*. août 1975;56(2):512-5.
70. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 23 sept 2013;424:222-30.
71. Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev*. oct 2002;28(5):255-71.
72. 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 Int J Clin Chem*. nov 2001;313(1-2):139-42.
73. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci*. avr 2000;906:161-8.
74. Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. janv 2008;387(1-2):55-8.

75. Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol.* juin 1987;23(6):707-12.
76. Yu SCY, Lee SWY, Jiang P, Leung TY, Chan KCA, Chiu RWK, et al. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clin Chem.* août 2013;59(8):1228-37.
77. Emlen W, Mannik M. Effect of DNA size and strandedness on the in vivo clearance and organ localization of DNA. *Clin Exp Immunol.* avr 1984;56(1):185-92.
78. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion (Paris).* févr 2001;41(2):276-82.
79. Vallée A, Marcq M, Bizieux A, Kouri CE, Lacroix H, Bennouna J, et al. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer Amst Neth.* nov 2013;82(2):373-4.
80. Parpart-Li S, Bartlett B, Popoli M, Adleff V, Tucker L, Steinberg R, et al. The Effect of Preservative and Temperature on the Analysis of Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 mai 2017;23(10):2471-7.
81. Denis MG, Knol A-C, Théoleyre S, Vallée A, Dréno B. Efficient Detection of BRAF Mutation in Plasma of Patients after Long-term Storage of Blood in Cell-Free DNA Blood Collection Tubes. *Clin Chem.* juin 2015;61(6):886-8.
82. Norton SE, Lechner JM, Williams T, Fernando MR. A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during blood sample storage and shipping as determined by digital PCR. *Clin Biochem.* oct 2013;46(15):1561-5.
83. Norton SE, Luna KK, Lechner JM, Qin J, Fernando MR. A new blood collection device minimizes cellular DNA release during sample storage and shipping when compared to a standard device. *J Clin Lab Anal.* juill 2013;27(4):305-11.
84. Swinkels DW, Wiegerinck E, Steegers EAP, de Kok JB. Effects of blood-processing protocols on cell-free DNA quantification in plasma. *Clin Chem.* mars 2003;49(3):525-6.
85. Normanno N, Denis MG, Thress KS, Ratcliffe M, Reck M. Guide to detecting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in ctDNA of patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Oncotarget.* 14 févr 2017;8(7):12501-16.
86. Pérez-Barrios C, Nieto-Alcolado I, Torrente M, Jiménez-Sánchez C, Calvo V, Gutierrez-Sanz L, et al. Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Transl Lung Cancer Res.* déc 2016;5(6):665-72.

87. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Roeyen G, Lardon F, Rolfo C, et al. A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits: Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma. *J Mol Diagn JMD*. janv 2017;19(1):162-8.
88. Reck M, Hagiwara K, Han B, Tjulandin S, Grohé C, Yokoi T, et al. ctDNA Determination of EGFR Mutation Status in European and Japanese Patients with Advanced NSCLC: The ASSESS Study. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. oct 2016;11(10):1682-9.
89. Pécuchet N, Rozenholc Y, Zonta E, Pietraz D, Didelot A, Combe P, et al. Analysis of Base-Position Error Rate of Next-Generation Sequencing to Detect Tumor Mutations in Circulating DNA. *Clin Chem*. nov 2016;62(11):1492-503.
90. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 juin 2011;108(23):9530-5.
91. Schmitt MW, Kennedy SR, Salk JJ, Fox EJ, Hiatt JB, Loeb LA. Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 sept 2012;109(36):14508-13.
92. 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*. oct 2016;25(10):783-8.
93. Daniotti M, Vallacchi V, Rivoltini L, Patuzzo R, Santinami M, Arienti F, et al. Detection of mutated BRAFV600E variant in circulating DNA of stage III-IV melanoma patients. *Int J Cancer*. 1 juin 2007;120(11):2439-44.
94. Board RE, Ellison G, Orr MCM, Kemsley KR, McWalter G, Blockley LY, et al. Detection of BRAF mutations in the tumour and serum of patients enrolled in the AZD6244 (ARRY-142886) advanced melanoma phase II study. *Br J Cancer*. 17 nov 2009;101(10):1724-30.
95. Pinzani P, Salvianti F, Cascella R, Massi D, De Giorgi V, Pazzagli M, et al. Allele specific Taqman-based real-time PCR assay to quantify circulating BRAFV600E mutated DNA in plasma of melanoma patients. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 6 sept 2010;411(17-18):1319-24.
96. Aung KL, Donald E, Ellison G, Bujac S, Fletcher L, Cantarini M, et al. Analytical validation of BRAF mutation testing from circulating free DNA using the amplification refractory mutation testing system. *J Mol Diagn JMD*. mai 2014;16(3):343-9.
97. 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.

98. Stadler J, Eder J, Pratscher B, Brandt S, Schneller D, Müllegger R, et al. SNPase-ARMS qPCR: Ultrasensitive Mutation-Based Detection of Cell-Free Tumor DNA in Melanoma Patients. *PloS One*. 2015;10(11):e0142273.
99. Janku F, Huang HJ, Claes B, Falchook GS, Fu S, Hong D, et al. BRAF Mutation Testing in Cell-Free DNA from the Plasma of Patients with Advanced Cancers Using a Rapid, Automated Molecular Diagnostics System. *Mol Cancer Ther*. juin 2016;15(6):1397-404.
100. 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.
101. Louveau B, Tost J, Mauger F, Sadoux A, Podgorniak M-P, How-Kit A, et al. Clinical value of early detection of circulating tumour DNA-BRAF(V600mut) in patients with metastatic melanoma treated with a BRAF inhibitor. *ESMO Open*. 2017;2(2):e000173.
102. Ascierto PA, Minor D, Ribas A, Lebbe C, O'Hagan A, Arya N, et al. Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 sept 2013;31(26):3205-11.
103. 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.
104. 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*. janv 2015;61(1):297-304.
105. 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*. janv 2016;10(1):157-65.
106. 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 Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 févr 2016;22(3):567-74.
107. Garlan F, Blanchet B, Kramkimel N, Puszkiel A, Golmard J-L, Noe G, et al. Circulating Tumor DNA Measurement by Picoliter Droplet-Based Digital PCR and Vemurafenib Plasma Concentrations in Patients with Advanced BRAF-Mutated Melanoma. *Target Oncol*. juin 2017;12(3):365-71.
108. Lipson EJ, Velculescu VE, Pritchard TS, Sausen M, Pardoll DM, Topalian SL, et al. Circulating tumor DNA analysis as a real-time method for monitoring tumor burden in melanoma patients undergoing treatment with immune checkpoint blockade. *J Immunother Cancer*. 2014;2(1):42.

109. 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.
110. 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 Off J Eur Soc Med Oncol.* 1 mai 2017;28(5):1130-6.
111. Saint-Jean M, Quéreux G, Nguyen J-M, Peuvrel L, Brocard A, Vallée A, et al. Is a Single BRAF Wild-Type Test Sufficient to Exclude Melanoma Patients from Vemurafenib Therapy? *J Invest Dermatol.* 1 mai 2014;134(5):1468-70.
112. Heinzerling L, Baiter M, Kühnapfel S, Schuler G, Keikavoussi P, Agaimy A, et al. Mutation landscape in melanoma patients clinical implications of heterogeneity of BRAF mutations. *Br J Cancer.* 26 nov 2013;109(11):2833-41.
113. Long GV, Weber JS, Larkin J, Atkinson V, Grob J-J, Schadendorf D, et al. Nivolumab for Patients With Advanced Melanoma Treated Beyond Progression: Analysis of 2 Phase 3 Clinical Trials. *JAMA Oncol.* 29 juin 2017;

Annexe : Cinétiques individuelles

Les figures présentées dans cette annexe représentent les cinétiques d'ADNtc observées au cours du suivi des 22 patients pour lesquels l'ADNtc était détectable à l'initiation du traitement par anti-PD1.

Les concentrations d'ADNtc sont représentées par la courbe noire ; les pointillés indiquent un ADNtc indétectable. Conformément au risque d'erreur $\alpha = 3\%$ utilisé par nos critères d'évaluation, les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 94% de la mesure d'ADNtc (la concentration réelle d'ADNtc a ainsi 3% de chances d'être plus élevée que la borne supérieure de l'intervalle, et 3% de chances d'être plus basse que la borne inférieure de l'intervalle). Lorsqu'il était disponible, le score RECIST a été indiqué par une courbe rouge.

Les barres présentes à la partie haute du graphique représentent la réponse biologique, interprétée selon nos critères, et la réponse radio-clinique, telle qu'elle a été évaluée, en intention de traiter, au cours du suivi (Pb : Progression biologique, Sb : Stabilité biologique, Rb : Réponse biologique, P : Progression clinique, S : Stabilité clinique, RP : Réponse clinique partielle, RC : Réponse clinique complète).

PATIENTS R+

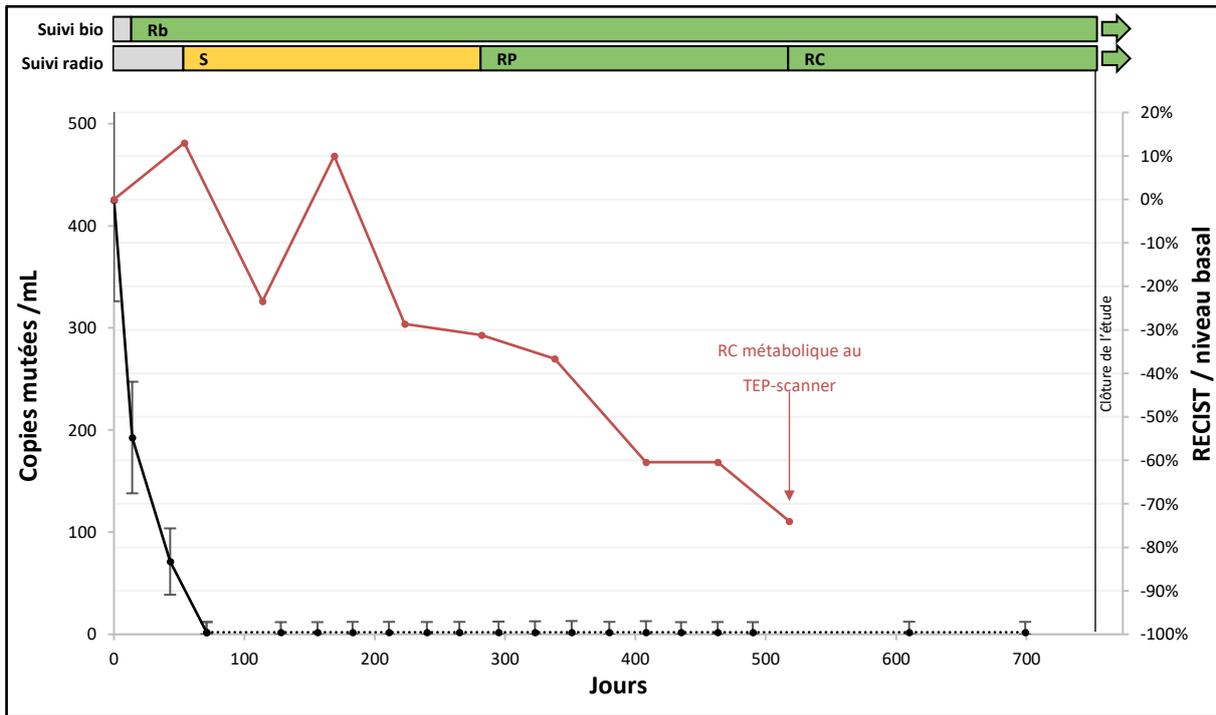


Figure 23. Patient 1. Homme de 79 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *BRAF* p.V600E. Stabilité tumorale initiale, puis réponse partielle au 282^{ème} jour, et réponse complète au 509^{ème} jour. Réponse biologique au 14^{ème} jour, 268 jours avant la date de première réponse objective. Survie sans progression et survie globale censurées à 755 jours de suivi.

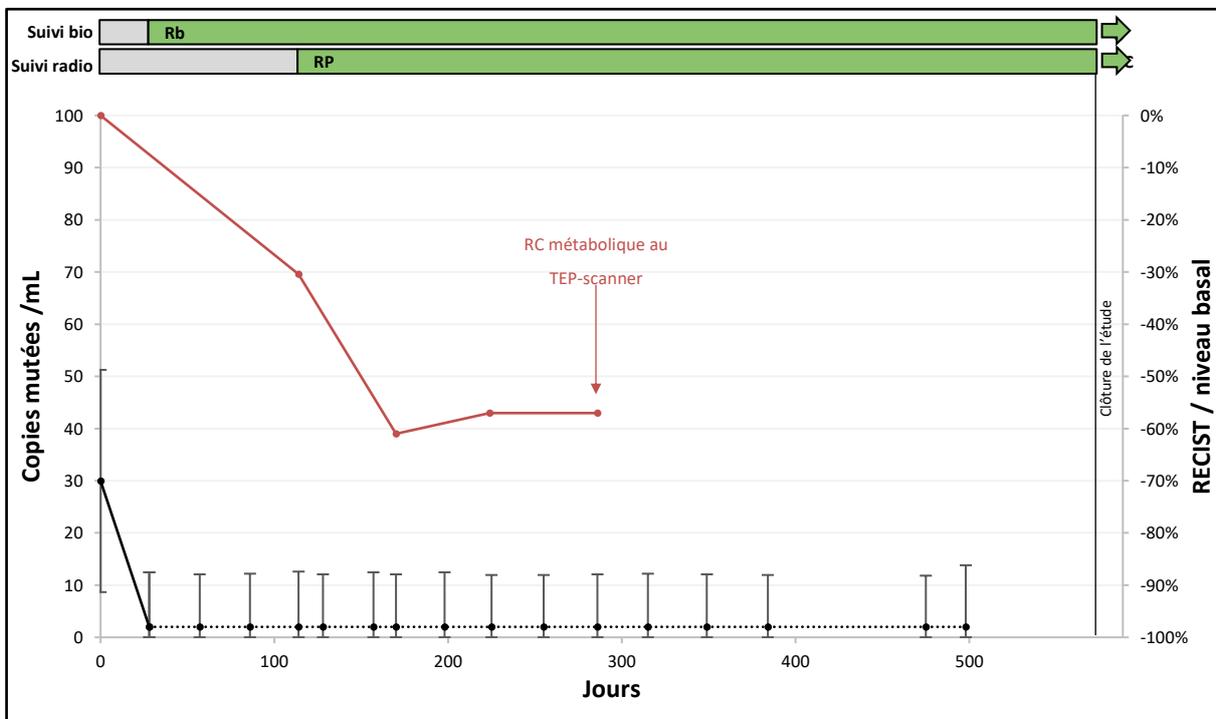


Figure 24. Patient 2. Homme de 62 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade III non-résécable avec mutation *BRAF* p.V600E. Réponse partielle à la première évaluation radiologique, au 114^{ème} jour, et réponse complète au 286^{ème} jour. Réponse biologique au 28^{ème} jour, 86 jours avant la date de première réponse objective. Survie sans progression et survie globale censurées à 574 jours de suivi.

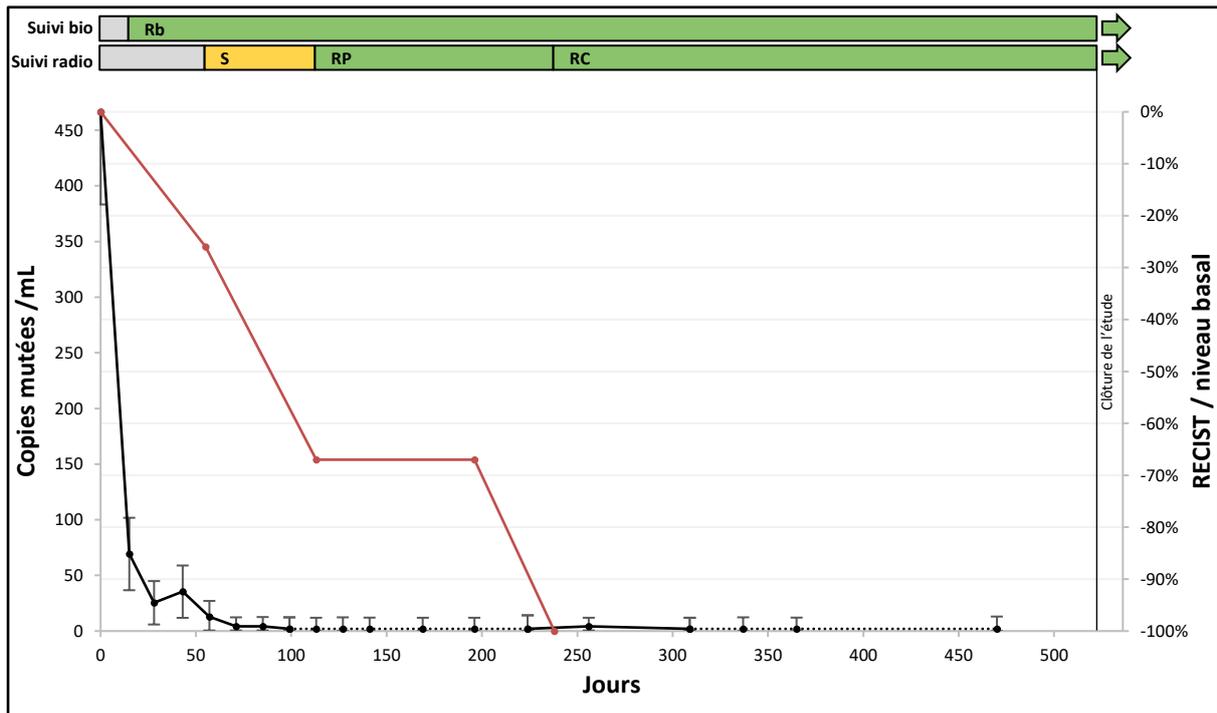


Figure 25. Patient 3. Homme de 53 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *BRAF* p.V600E. Stabilité tumorale initiale, puis réponse partielle au 113^{ème} jour, et réponse complète au 238^{ème} jour. Réponse biologique au 28^{ème} jour, 85 jours avant la date de première réponse objective. Survie sans progression et survie globale censurées à 523 jours de suivi.

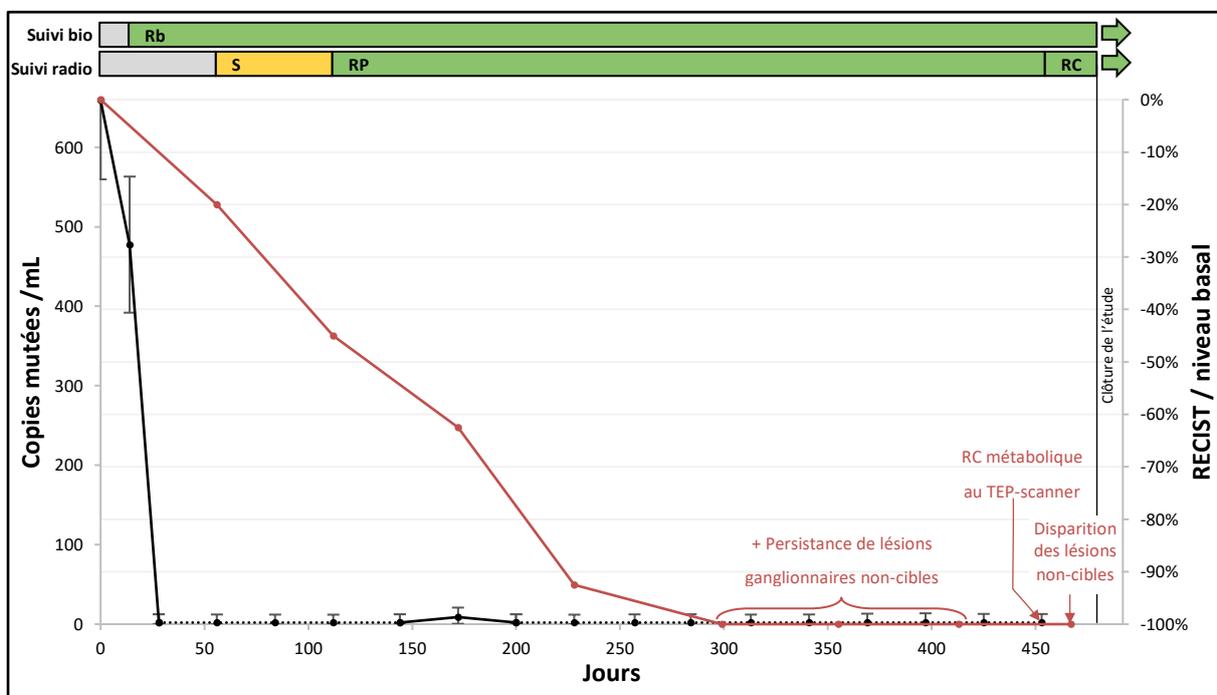


Figure 26. Patient 4. Femme de 74 ans, traitée par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *BRAF* p.V600K. Stabilité tumorale initiale, puis réponse partielle au 112^{ème} jour, et réponse complète au 455^{ème} jour. Réponse biologique au 14^{ème} jour, 98 jours avant la date de première réponse objective. Survie sans progression et survie globale censurées à 480 jours de suivi.

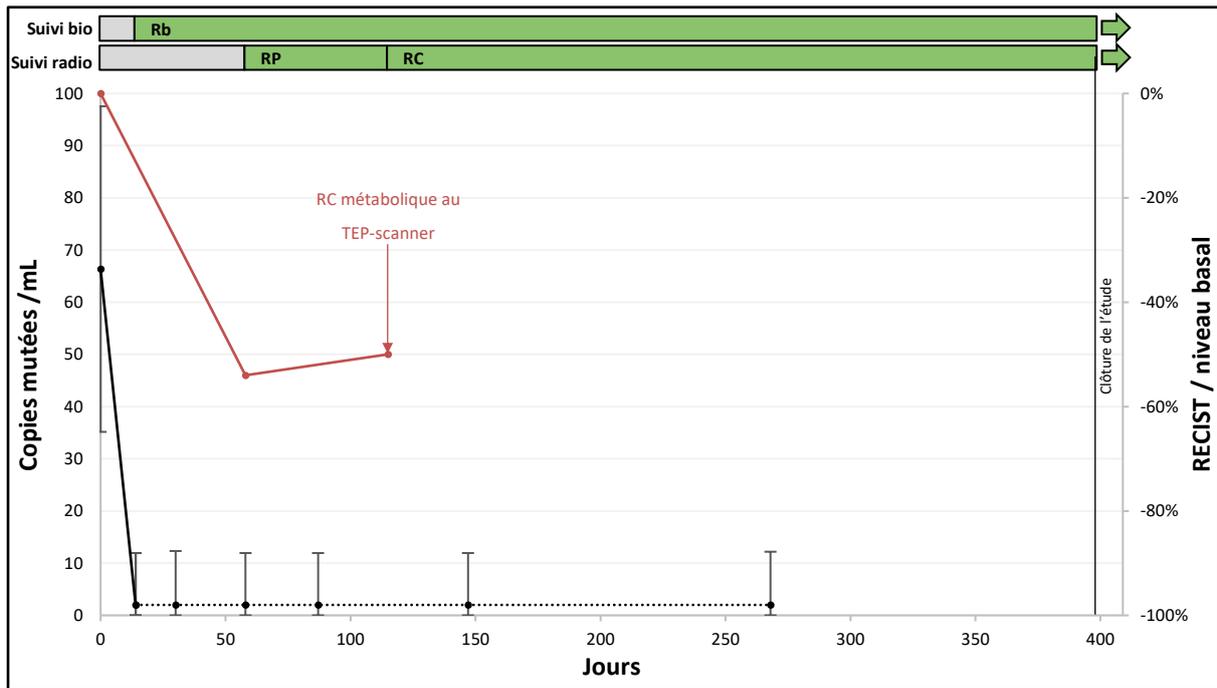


Figure 27. Patient 5. Homme de 71 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *NRAS* p.Q61L. Réponse partielle à la première évaluation radiologique, au 58^{ème} jour, et réponse complète au 115^{ème} jour. Réponse biologique au 14^{ème} jour, 44 jours avant la date de première réponse objective. Survie sans progression et survie globale censurées à 399 jours de suivi.

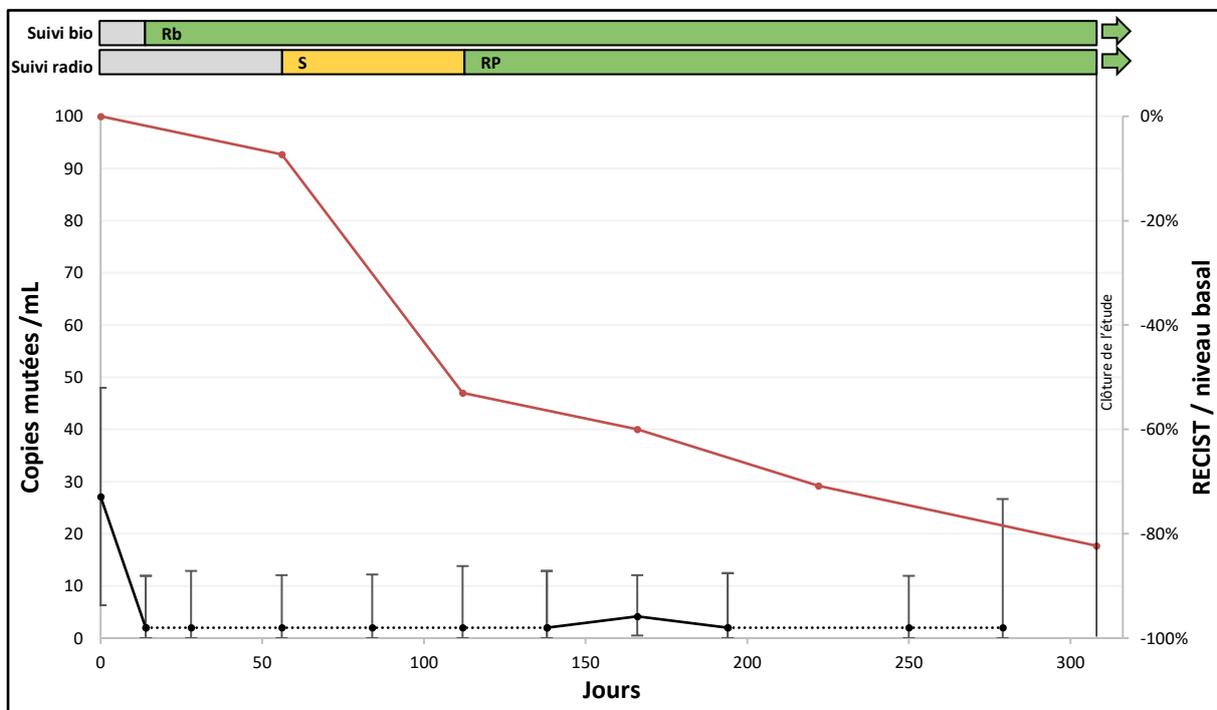


Figure 28. Patient 6. Femme de 64 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1b avec mutation *NRAS* p.Q61R. Stabilité tumorale initiale, puis réponse partielle au 112^{ème} jour. Réponse biologique au 14^{ème} jour, 98 jours avant la date de première réponse objective. Survie sans progression et survie globale censurées à 306 jours de suivi.

PATIENTS R-P+

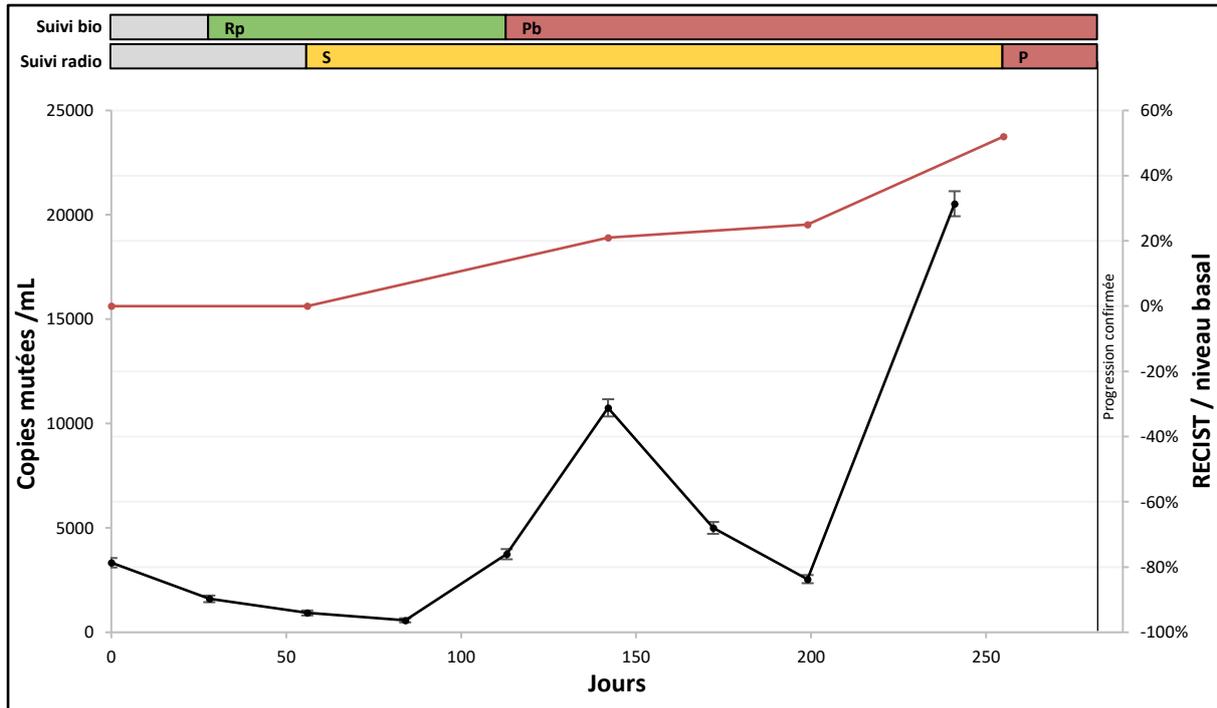


Figure 29. Patient 7. Homme de 79 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1a avec mutation *BRAF* p.V600K. Stabilité tumorale initiale, puis progression lente au 255^{ème} jour, confirmée cliniquement au 282^{ème} jour avec la survenue d'une péricardite carcinomateuse. Réponse biologique au 28^{ème} jour, puis progression biologique au 113^{ème} jour, 169 jours avant la progression clinique. Survie globale censurée à 323 jours.

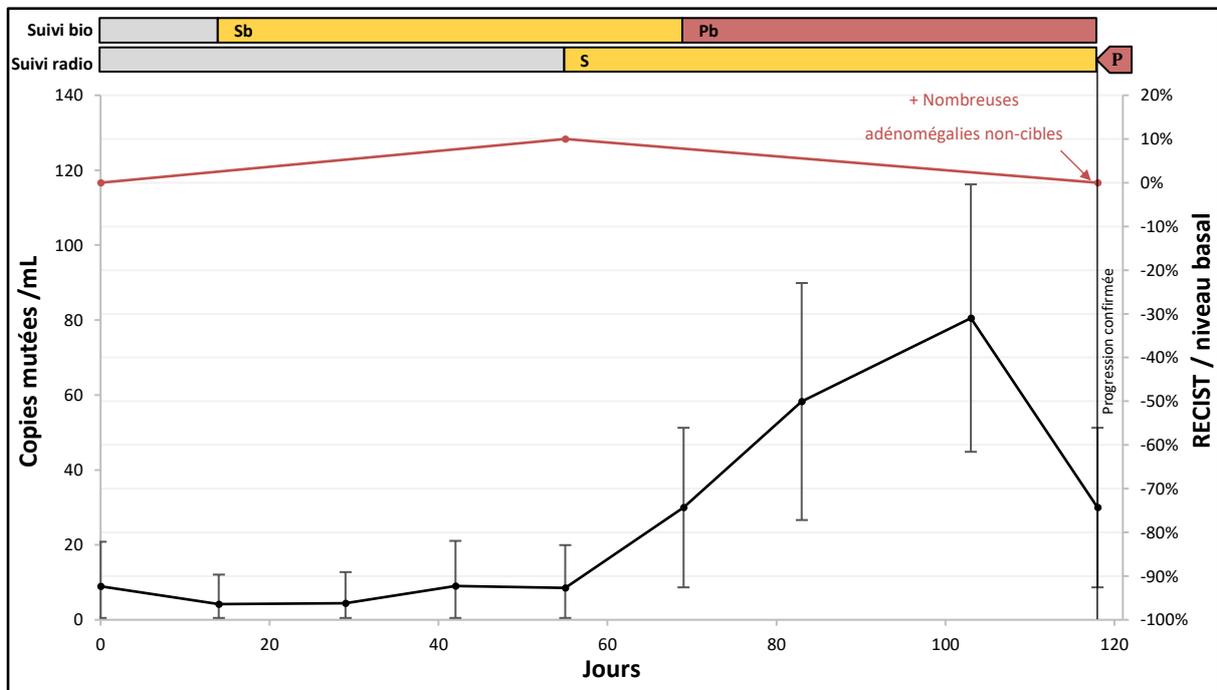


Figure 30. Patient 8. Homme de 73 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1a avec mutation *BRAF* p.V600E. Stabilité tumorale initiale, puis progression au 118^{ème} jour devant l'apparition de nombreuses lésions non-cibles. Stabilité biologique initiale, puis progression biologique au 69^{ème} jour, 49 jours avant la progression clinique. Survie censurée au 517^{ème} jour de suivi.

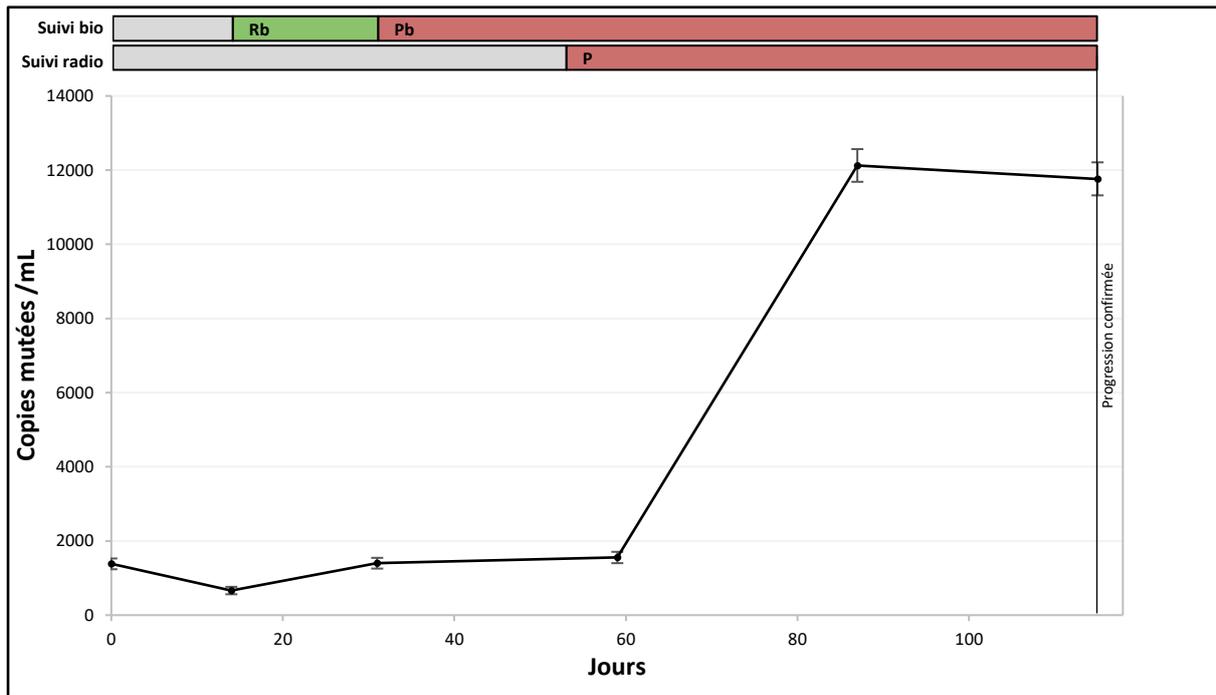


Figure 31. Patient 9. Femme de 33 ans, traitée par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1a avec mutation *NRAS* p.Q61K. Patiente enceinte, RECIST non-calculable, en l'absence d'imagerie réalisable à l'étage abdominal. Progression tumorale à la première évaluation, confirmée par une seconde évaluation au 115^{ème} jour. Réponse biologique initiale, puis progression biologique au 31^{ème} jour, 84 jours avant la progression clinique. Décès après 148 jours de suivi.

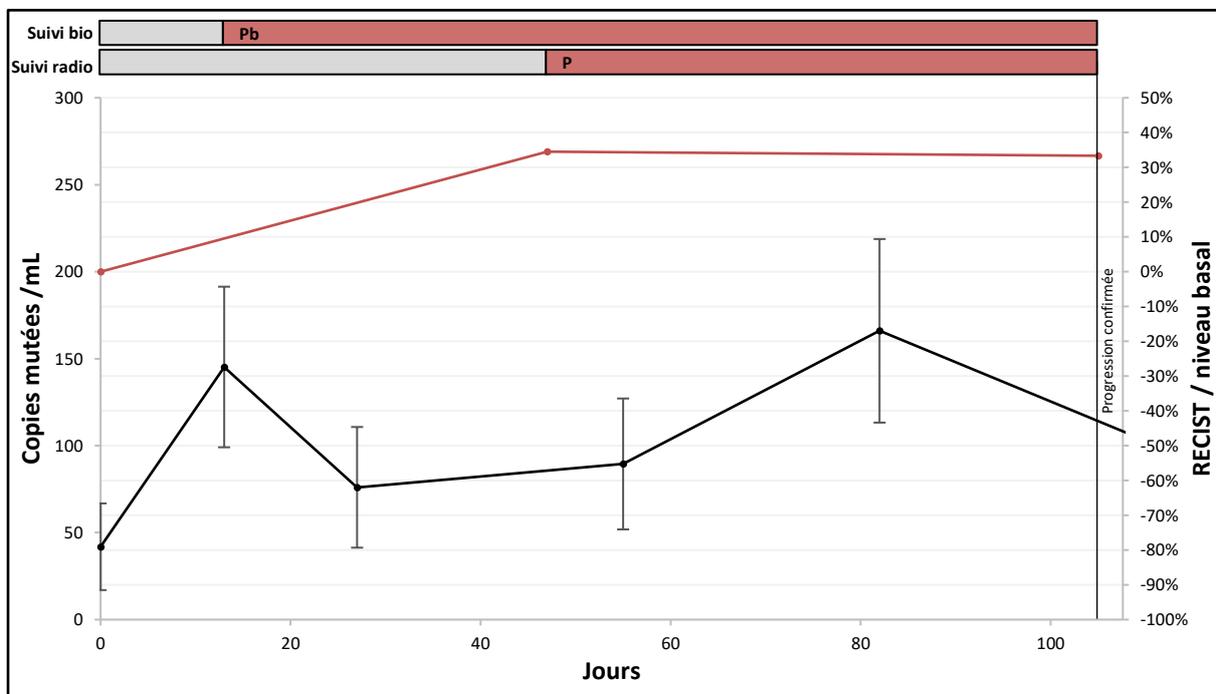


Figure 32. Patient 10. Homme de 69 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1b avec mutation *NRAS* p.Q61R. Progression tumorale à la première évaluation, confirmée par une seconde évaluation au 105^{ème} jour. Progression biologique d'emblée, au 13^{ème} jour, 92 jours avant la progression clinique. Décès après 265 jours de suivi.

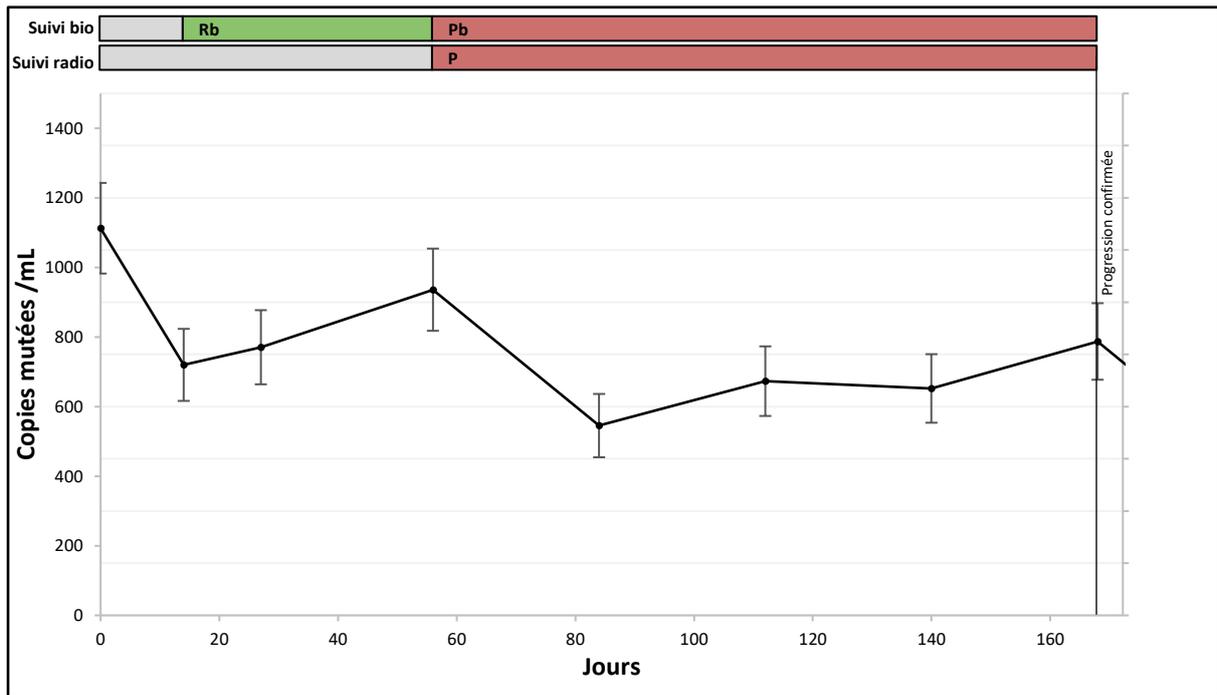


Figure 33. Patient 11. Homme de 71 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *NRAS* p.Q61K. RECIST non-évaluable en raison de discordances entre les imageries réalisées avant l'initiation du traitement. Progression tumorale présumée à la première évaluation, confirmée au 168^{ème} jour. Réponse biologique initiale, puis progression biologique au 56^{ème} jour, 112 jours avant la progression clinique. Décès après 253 jours de suivi.

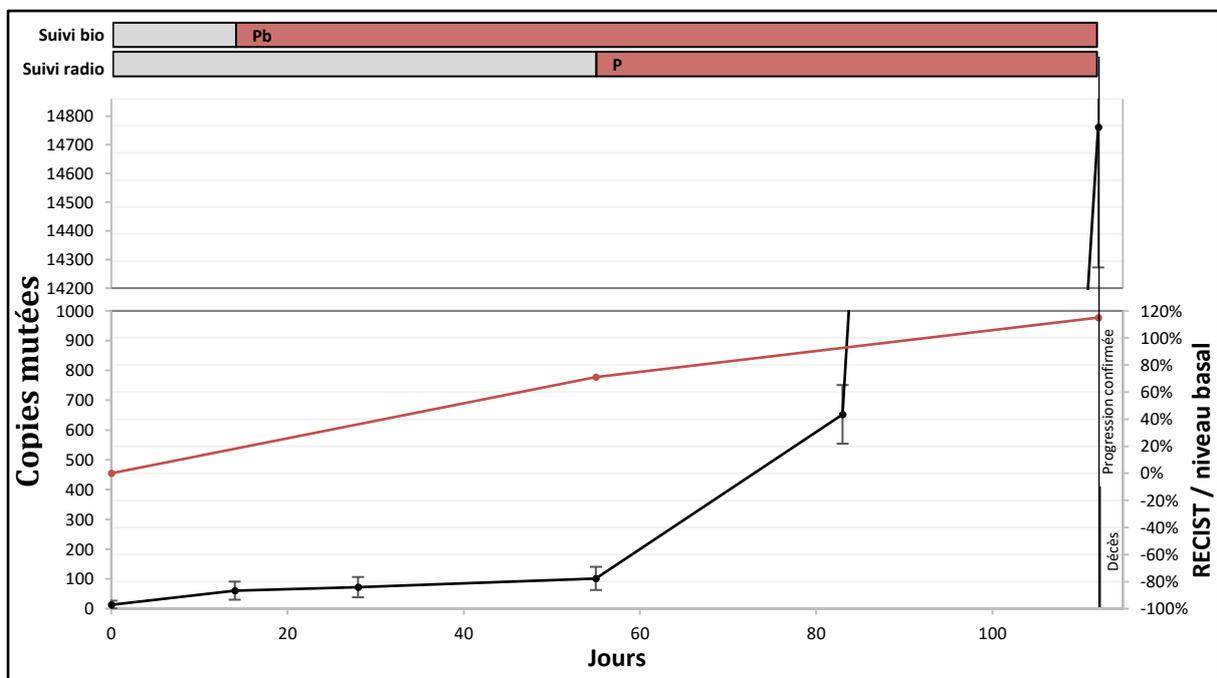


Figure 34. Patient 12. Homme de 44 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *BRAF* p.V600E. Progression tumorale à la première évaluation, confirmée par une seconde évaluation au 112^{ème} jour. Progression biologique d'emblée, au 14^{ème} jour, 98 jours avant la progression clinique. Décès au lendemain de la date de progression, au 113^{ème} jour. Le décès a été précédé d'une très forte augmentation de l'ADNtc.

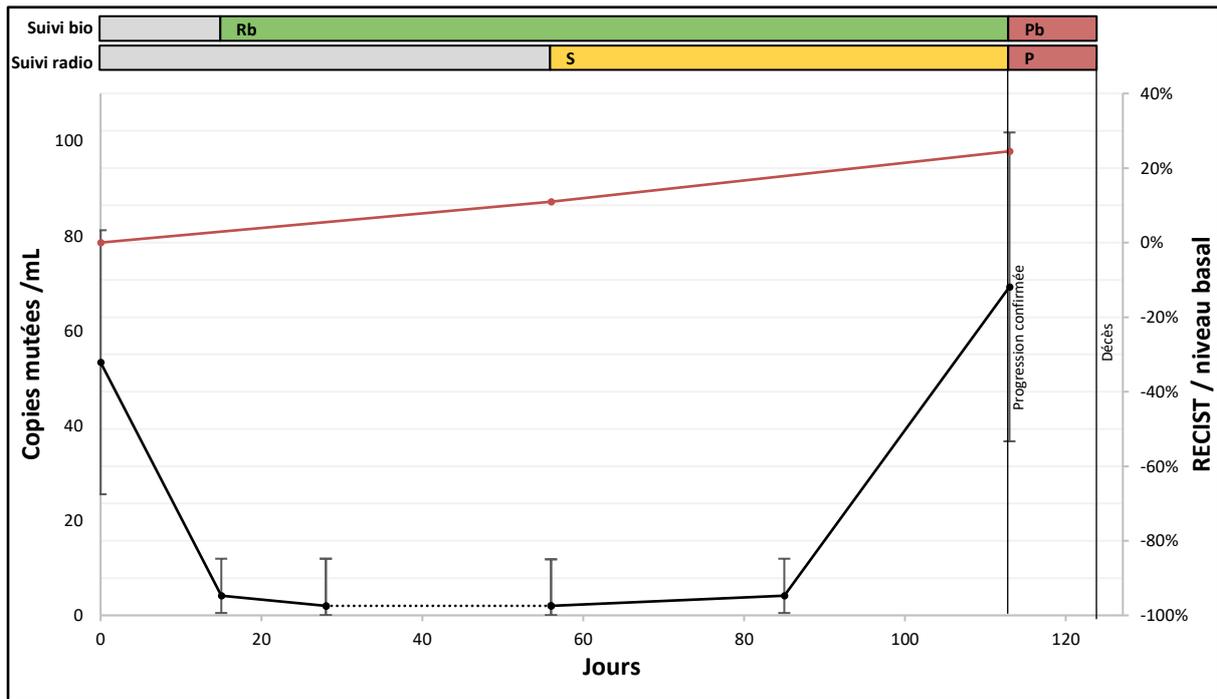


Figure 35. Patient 13. Homme de 76 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *NRAS* p.G12D. Stabilité tumorale à la première évaluation, puis progression radiologique et clinique au 113^{ème} jour, suivie du décès rapide du patient, au 124^{ème} jour. Réponse biologique initiale, puis progression biologique au 113^{ème} jour, simultanément à la progression clinique.

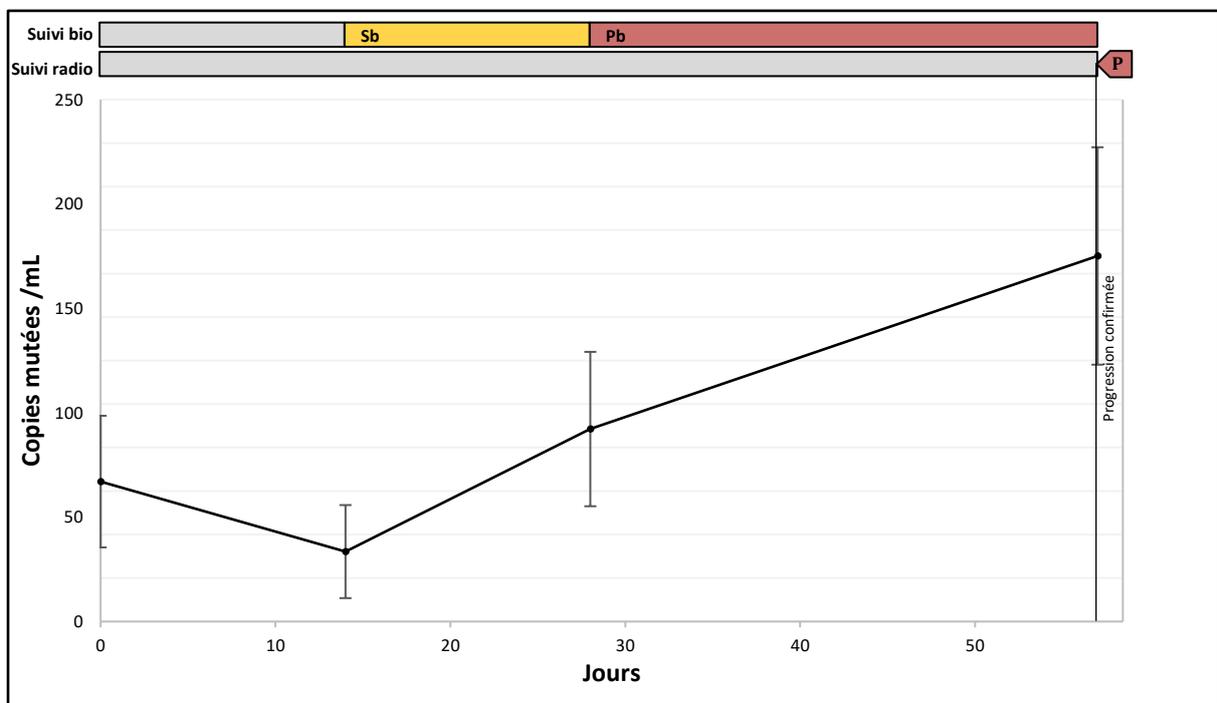


Figure 36. Patient 14. Homme de 90 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *NRAS* p.Q61K. Progression radiologique et clinique au 57^{ème} jour. Stabilité biologique initiale, puis progression biologique au 28^{ème} jour, 29 jours avant la progression clinique. Décès après 287 jours de suivi.

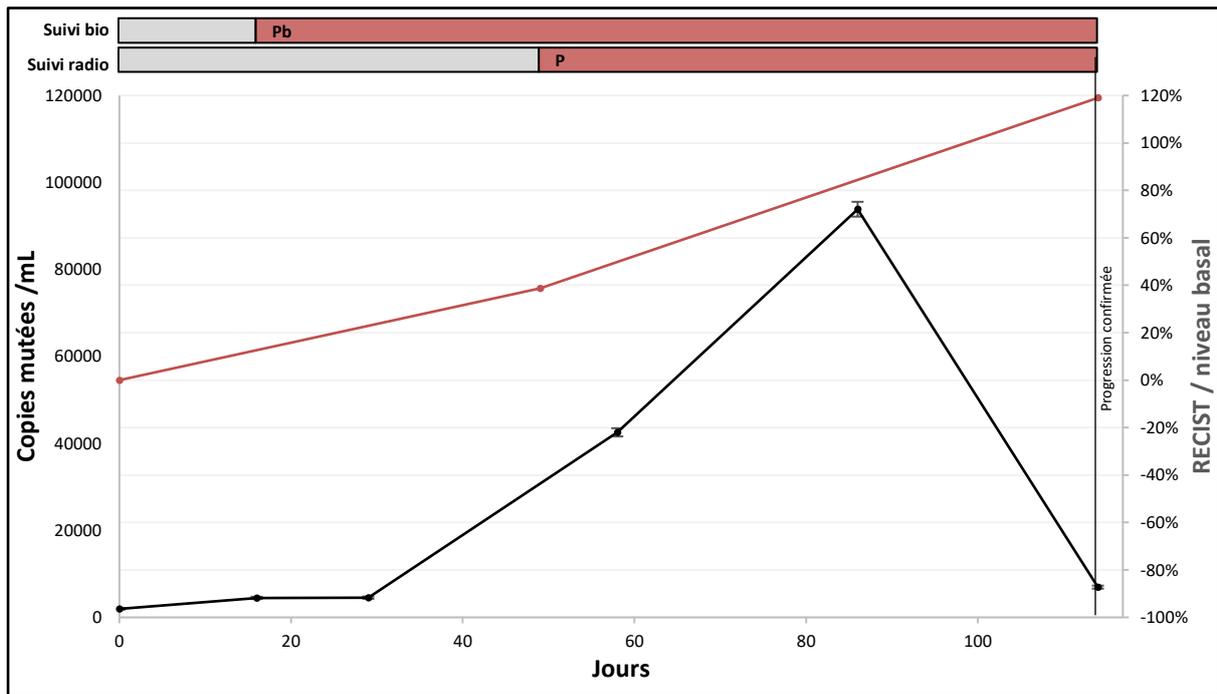


Figure 37. Patient 15. Homme de 59 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *NRAS* p.Q61K. Progression confirmée par une seconde imagerie au 114^{ème} jour. Progression biologique d'emblée au 16^{ème} jour, 98 jours avant la progression clinique. Décès après 147 jours de suivi.

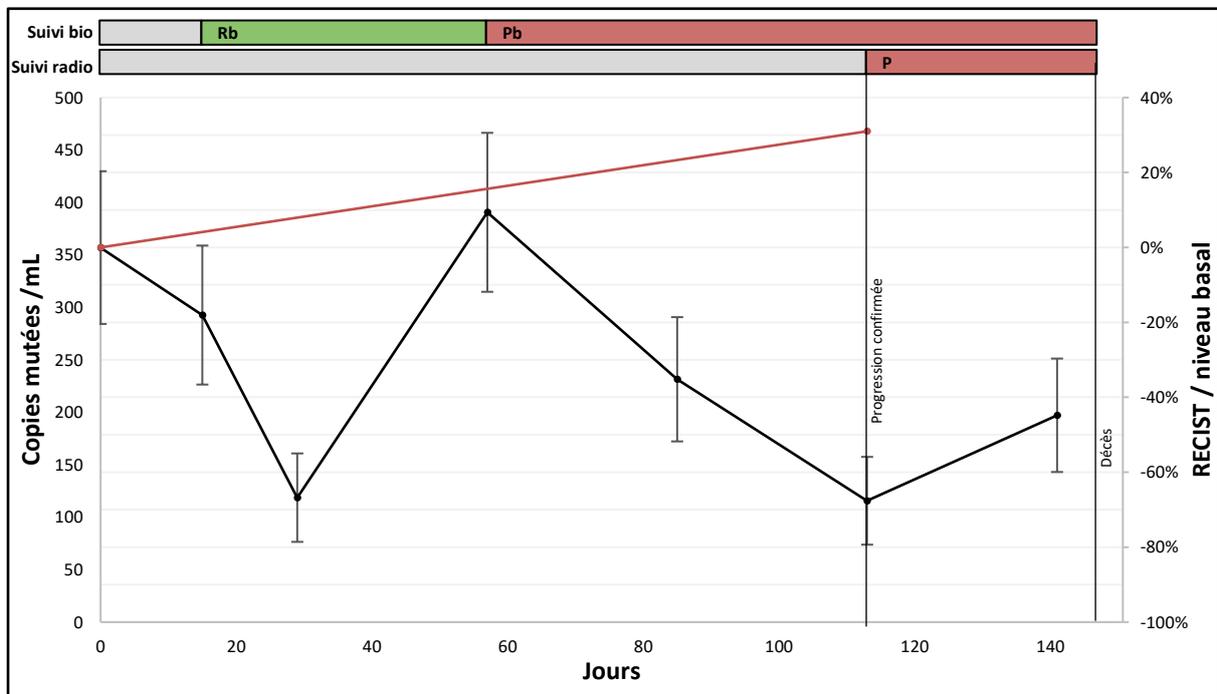


Figure 38. Patient 16. Femme de 56 ans, traitée par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade III non-résécable avec mutation *NRAS* p.Q61R. Progression radiologique et clinique au 113^{ème} jour. Réponse biologique initiale puis progression biologique au 57^{ème} jour, 56 jours avant la progression clinique. Décès après 147 jours de suivi.

PATIENTS R-P- (REPONSE CLINIQUE INDETERMINEE)

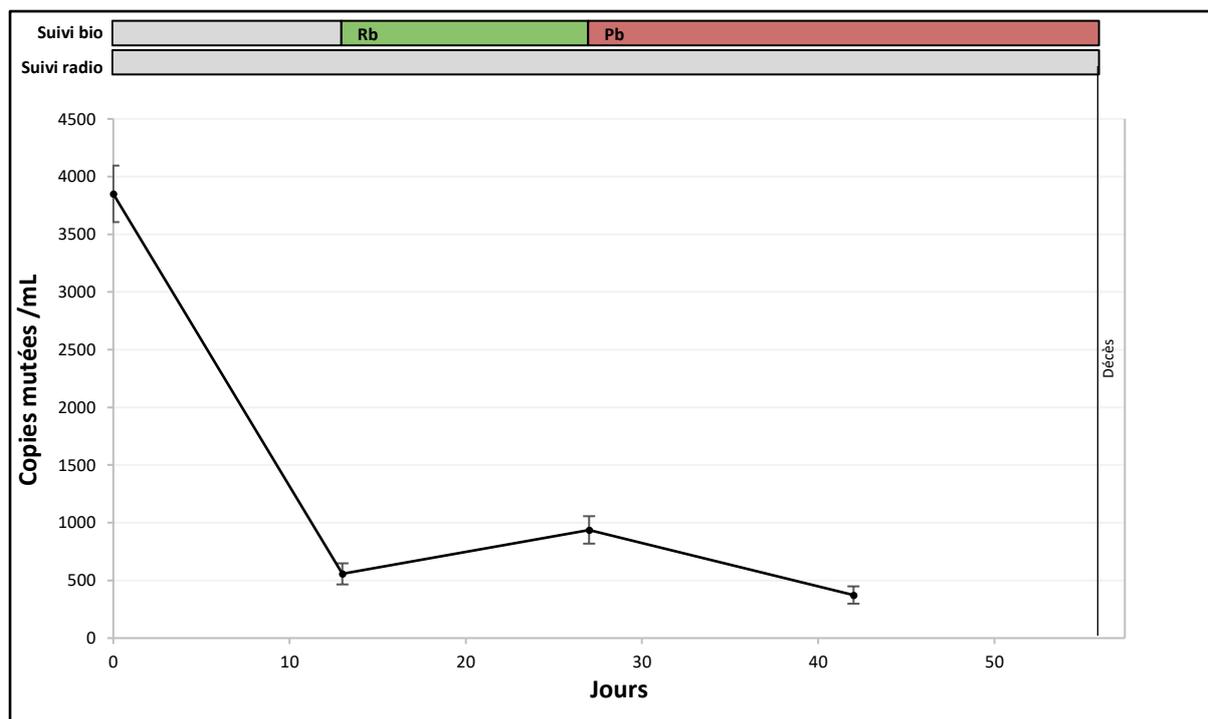


Figure 39. Patient 17. Homme de 79 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade III non-résécable avec mutation *BRAF* p.V600E. Patient décédé au 56^{ème} jour du suivi, avant la première évaluation radiologique. Réponse biologique au 13^{ème} jour, puis progression biologique au 27^{ème} jour. Survie sans progression censurée au 56^{ème} jour.

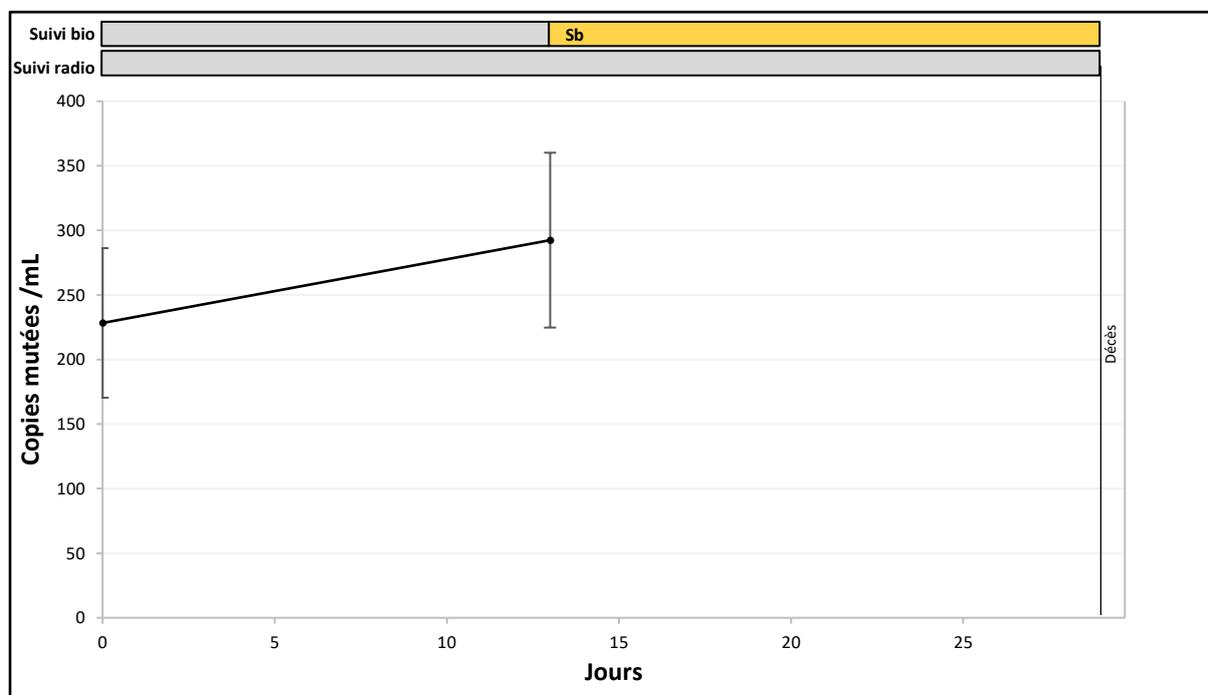


Figure 40. Patient 18. Femme de 27 ans, traitée par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *BRAF* p.V600E. Patiente décédée au 29^{ème} jour du suivi, avant la première évaluation radiologique. Stabilité biologique initiale, au 13^{ème} jour. Survie sans progression censurée au 29^{ème} jour.

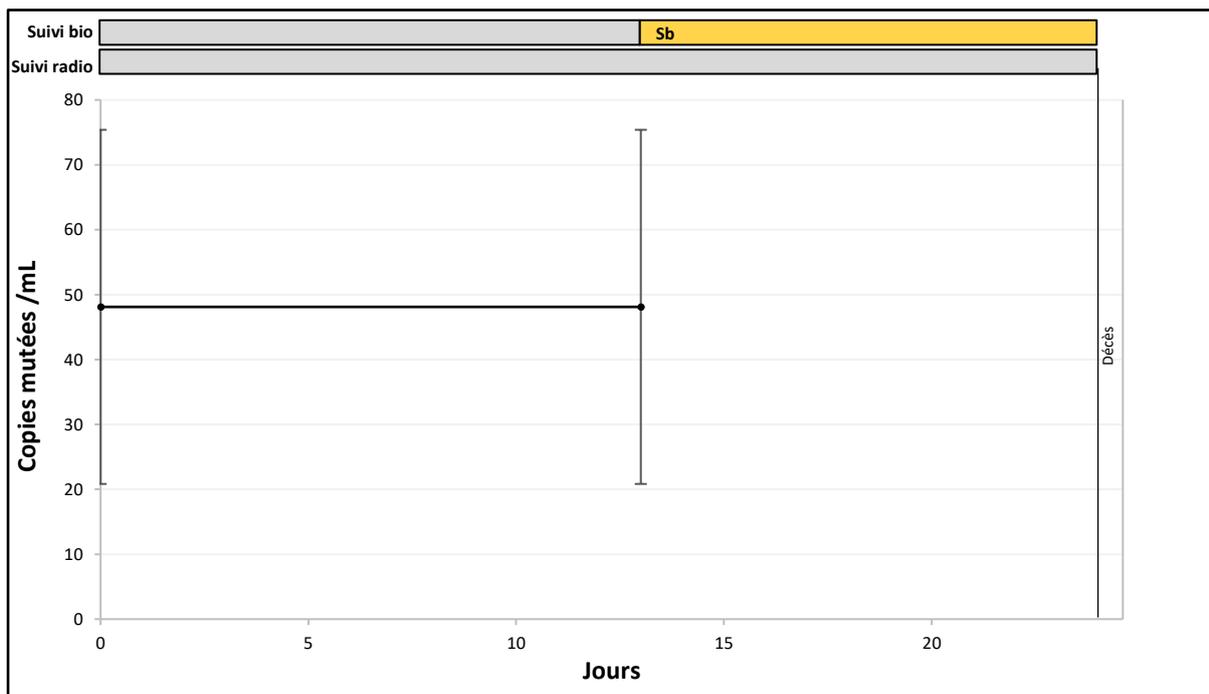


Figure 41. Patient 19. Femme de 36 ans, traitée par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *BRAF* p.V600E. Patiente décédée au 24^{ème} jour du suivi, avant la première évaluation radiologique. Stabilité biologique initiale, au 13^{ème} jour. Survie sans progression censurée au 24^{ème} jour.

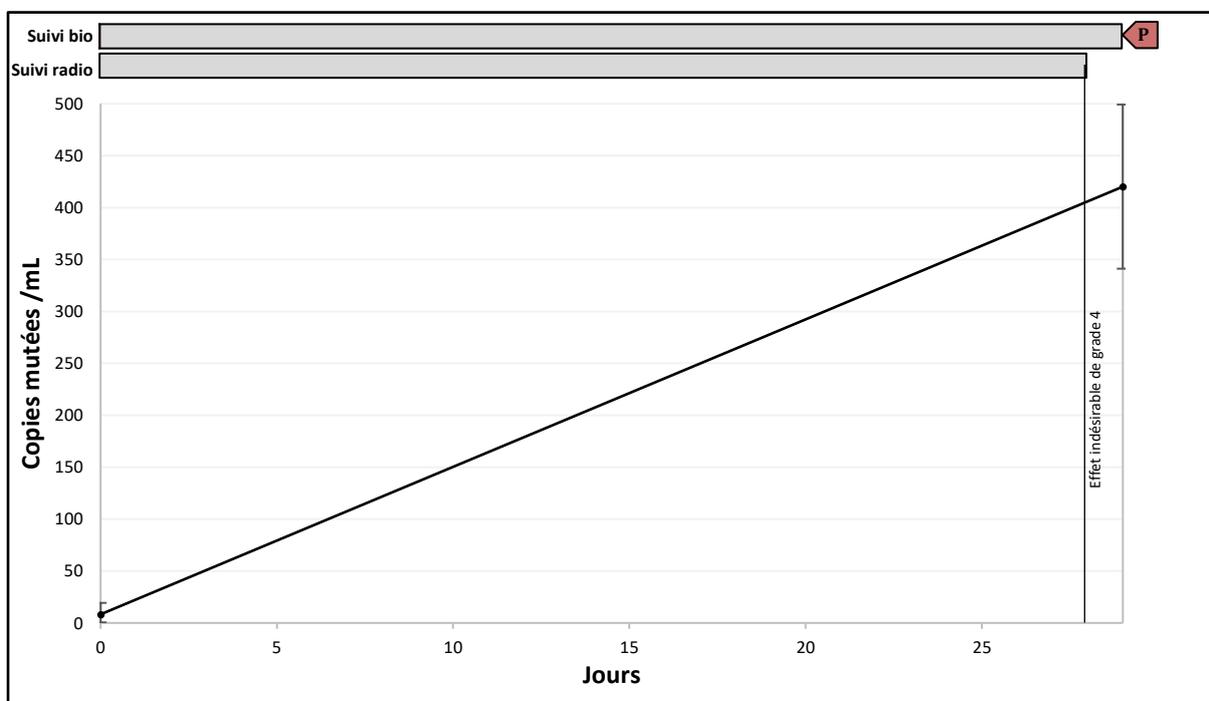


Figure 42. Patient 20. Homme de 73 ans, traité par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *NRAS* p.Q61K. Traitement interrompu suite à la survenue d'un effet indésirable de grade 4 (rejet aigu de greffon rénal) au 28^{ème} jour. Progression biologique le 29^{ème} jour. Survie sans progression censurée au 28^{ème} jour, décès après 108 jours de suivi.

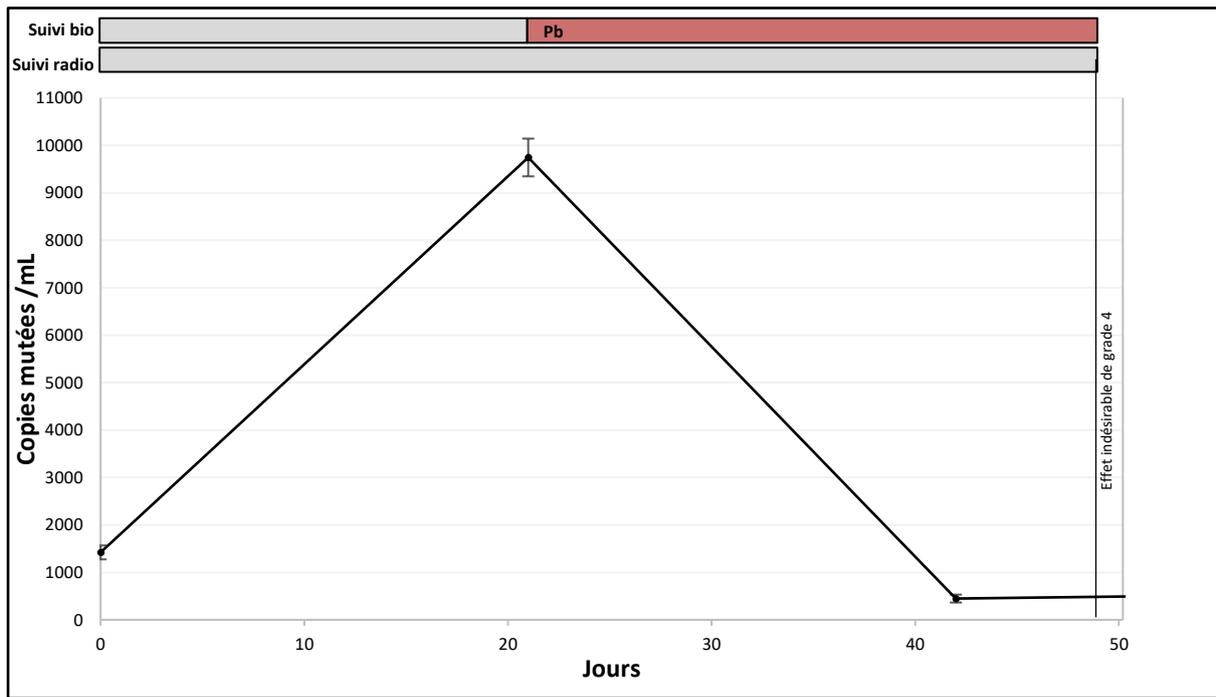


Figure 43. Patient 21. Homme de 61 ans, traité par l'association nivolumab-ipilimumab, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *NRAS* p.Q61K. Traitement interrompu suite à la survenue d'un effet indésirable de grade 4 (pancytopénie) au 49^{ème} jour. Progression biologique le 21^{ème} jour. Survie sans progression censurée au 49^{ème} jour, et survie globale censurée à 176 jours de suivi.

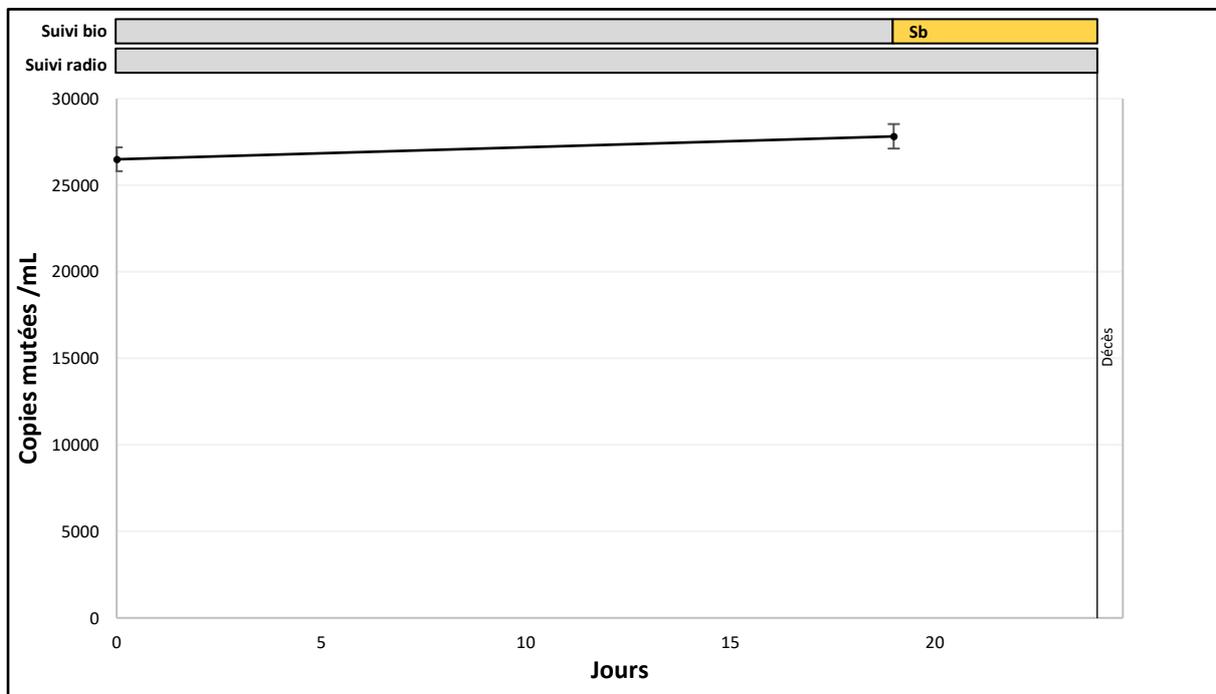


Figure 44. Patient 22. Femme de 72 ans, traitée par nivolumab en monothérapie, pour un mélanome de stade IV M1c avec mutation *NRAS* p.Q61R. Patiente décédée au 24^{ème} jour du suivi, avant la première évaluation radiologique. Stabilité biologique initiale, au 19^{ème} jour. Survie sans progression censurée au 24^{ème} jour.

Vu, le Président du Jury,
(tampon et signature)

Professeur Gaëlle QUEREUX

Vu, le Directeur de Thèse,
(tampon et signature)

Professeur Marc DENIS

Vu, le Doyen de la Faculté,

Professeur Pascale JOLLIET

Titre de Thèse :**SUIVI DU MELANOME CUTANE METASTATIQUE TRAITÉ PAR IMMUNOTHERAPIE ANTI-PD1,
PAR L'ANALYSE DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT**

RESUME

Introduction. Les immunothérapies anti-PD1 ont révolutionné la prise en charge du mélanome cutané métastatique. Néanmoins, environ 60% des patients ne répondent pas aux anti-PD1, et l'existence de réponses radiologiques atypiques retarde la détection des résistances primaires. Cette étude avait pour objectif de déterminer si le suivi quantitatif de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) permettait de prédire précocement la réponse aux anti-PD1.

Matériel et méthodes. Cinquante-deux patients traités au CHU de Nantes par anti-PD1 pour un mélanome cutané métastatique porteur d'une mutation des gènes *BRAF* ou *NRAS* ont été sélectionnés pour l'étude. Les altérations somatiques détectées sur le tissu ont été quantifiées sur l'ADN plasmatisque par PCR digitale (dPCR) à l'initiation du traitement, à 2 et 4 semaines de traitement, puis toutes les 4 semaines jusqu'à la progression.

Résultats. L'ADNtc était détectable à l'initiation du traitement pour 22/52 patients (42%). L'indétectabilité initiale de l'ADNtc était associée à un pronostic favorable en survie globale. Une diminution significative de la quantité d'ADNtc par rapport au niveau basal (compte-tenu de la variabilité de mesure de la dPCR) a défini la réponse biologique (Rb) tandis qu'une augmentation significative de la quantité d'ADNtc par rapport à son nadir définissait la progression biologique (Pb). L'absence de Rb après 2 semaines de traitement était associée à une absence de bénéfice clinique sous anti-PD1 (taux de réponse de 0%, survies sans progression inférieures à 120 jours (n = 10)). La survenue d'une Pb à 4, 8 ou 16 semaines de traitement était prédictive dans 100% des cas (n = 6) d'une progression de la maladie, en moyenne 75 jours avant sa détection à l'imagerie. Le maintien de la Rb au-delà de la 16^{ème} semaine était prédictif d'une réponse durable aux anti-PD1, avec un taux de survie globale et sans progression de 100% à la clôture de l'étude, pour des durées de suivi de 306 à 755 jours (n = 6).

Conclusion. L'étude des variations de la concentration d'ADNtc, à l'aide de critères intégrant la variabilité de la technique de mesure, permet de détecter de manière spécifique, sensible et précoce les patients non-répondeurs aux anti-PD1. Nous proposons un test simple et non invasif afin d'améliorer la prise en charge et le suivi des patients sous anti-PD1 pour lesquels les marqueurs prédictifs sont encore très limités.

MOTS-CLES

Mélanome, Immunothérapie, Anti-PD1, ADN tumoral circulant, PCR digitale