HAL
open science

Corrélation entre les variations précoces des marqueurs tumoraux circulants et la réponse clinique dans une population de patients traités pour un cancer colorectal métastasique par une chimiothérapie de première ligne

Marie Dutherage

To cite this version:

Marie Dutherage. Corrélation entre les variations précoces des marqueurs tumoraux circulants et la réponse clinique dans une population de patients traités pour un cancer colorectal métastasique par une chimiothérapie de première ligne. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02866506

HAL Id: dumas-02866506

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02866506

Submitted on 12 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR DE SANTE DE ROUEN NORMANDIE

ANNEE 2019 N°

THESE POUR

LE DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'état

par

Mme Marie DUTHERAGE

Née le 19/06/1992 à Béthune (62)

Présentée et soutenue publiquement le 08 Octobre 2019

Corrélation entre les variations précoces des marqueurs tumoraux circulants et la réponse clinique dans une population de patients traités pour un cancer colorectal métastatique par une chimiothérapie de première ligne.

Analyse préliminaire de l'étude COCA-MACS.

Président du jury : Pr Frédéric DI FIORE (Hépato-gastro-entérologie)

Directrice de thèse : Dr Alice GANGLOFF (Hépato-gastro-entérologie)

Membres du jury :

Pr Pierre MICHEL (Hépato-gastro-entérologie)

Pr Guillaume SAVOYE (Hépato-gastro-entérologie)

Dr David SEFRIOUI (Hépato-gastro-entérologie)

ANNEE UNIVERSITAIRE 2018 - 2019

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESSEURS : **Professeur Michel GUERBET**

Professeur Agnès LIARD-ZMUDA

Professeur Guillaume SAVOYE

I - **MEDECINE**

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric **ANSELME**	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle **APTER**	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle **AUQUIT AUCKBUR**	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc **BASTE**	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice **BAUER**	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya **BEKRI**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal **BENHAMOU**	HCN	Médecine interne
Mr Jacques **BENICHOU**	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier **BOYER**	UFR	Immunologie
Mme Sophie **CANDON**	HCN	Immunologie
Mr François **CARON**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe **CHASSAGNE**	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent **COMPERE**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale

Mr Jean-Nicolas **CORNU**	HCN	Urologie
Mr Antoine **CUVELIER**	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas **DACHER**	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan **DARMONI**	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre **DECHELOTTE**	HCN	Nutrition
Mr Stéphane **DERREY**	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric **DI FIORE**	HCH-CB	Cancérologie
Mr Fabien **DOGUET**	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean **DOUCET**	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard **DUBRAY**	CB	Radiothérapie
Mr Frank **DUJARDIN**	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice **DUPARC**	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric **DURAND**	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand **DUREUIL**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène **ELTCHANINOFF**	HCN	Cardiologie
Mr Manuel **ETIENNE**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry **FREBOURG**	UFR	Génétique
Mr Pierre **FREGER**	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François **GEHANNO**	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel **GERARDIN**	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille **GERARDIN**	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume **GOURCEROL**	HCN	Physiologie
Mr Dominique **GUERROT**	HCN	Néphrologie
Mr Olivier **GUILLIN**	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier **HANNEQUIN**	HCN	Neurologie
Mr Claude **HOUDAYER**	HCN	Génétique
Mr Fabrice **JARDIN**	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie **JOLY**	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal **JOLY**	HCN	Dermato – Vénéréologie
Mme Bouchra **LAMIA**	Havre	Pneumologie

Mme Annie **LAQUERRIERE**	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent **LAUDENBACH**	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël **LECHEVALLIER**	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé **LEFEBVRE**	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry **LEQUERRE**	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie **LEROI**	HCN	Physiologie
Mr Hervé **LEVESQUE**	HB	Médecine interne
Mme Agnès **LIARD-ZMUDA**	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves **LITZLER**	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand **MACE**	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David **MALTETE**	HCN	Neurologie
Mr Christophe **MARGUET**	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle **MARIE**	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul **MARIE**	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc **MARPEAU**	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane **MARRET**	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique **MERLE**	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre **MICHEL**	HCN	Hépato-gastro-entérologie
M. Benoit **MISSET** *(détachement)*	HCN	Réanimation Médicale Mr Jean-François
M. **Jean-François MUIR** *(surnombre)*	HB	Pneumologie
Mr Marc **MURAINE**	HCN	Ophtalmologie
Mr Christophe **PEILLON**	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian **PFISTER**	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe **PLANTIER**	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier **PLISSONNIER**	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan **PREVOST**	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe **RICHARD** *(détachement)*	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent **RICHARD**	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie **RIVES**	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace **ROMAN** *(disponibilité)*	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe **SABOURIN**	HCN	Anatomie - Pathologie

Mr Guillaume **SAVOYE**	HCN	Hépato-gastrologie
Mme Céline **SAVOYE–COLLET**	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale **SCHNEIDER**	HCN	Pédiatrie
Mr Michel **SCOTTE**	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne **TAMION**	HCN	Thérapeutique
Mr Luc **THIBERVILLE**	HCN	Pneumologie
Mr Christian **THUILLEZ** *(surnombre)*	HB	Pharmacologie
Mr Hervé **TILLY**	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles **TOURNEL**	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier **TROST**	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques **TUECH**	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre **VANNIER** *(surnombre)*	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît **VEBER**	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre **VERA**	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric **VERIN**	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric **VERSPYCK**	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier **VITTECOQ**	HB	Rhumatologie
Mme Marie-Laure **WELTER**	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle **BARBIER-FREBOURG**	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole **BRASSE LAGNEL**	HCN	Biochimie
Mme Valérie **BRIDOUX HUYBRECHTS**	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard **BUCHONNET**	HCN	Hématologie
Mme Mireille **CASTANET**	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie **CHASTAN**	HCN	Neurophysiologie
Mme Sophie **CLAEYSSENS**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse **COEFFIER**	HCN	Nutrition
Mr Serge **JACQUOT**	UFR	Immunologie
Mr Joël **LADNER**	HCN	Epidémiologie, économie de la santé

Mr Jean-Baptiste **LATOUCHE**	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas **MOUREZ** *(détachement)*	HCN	Virologie
Mr Gaël **NICOLAS**	HCN	Génétique
Mme Muriel **QUILLARD**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia **ROLLIN**	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu **SALAUN**	HCN	Pneumologie
Mme Pascale **SAUGIER-VEBER**	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire **TOBENAS-DUJARDIN**	HCN	Anatomie
Mr David **WALLON**	HCN	Neurologie
Mr Julien **WILS**	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry **WABLE**	UFR	Communication
Mme Mélanie **AUVRAY-HAMEL**	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry **BESSON**	Chimie Thérapeutique
Mr Roland **CAPRON** (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean **COSTENTIN** (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie
Mr François **ESTOUR**	Chimie Organique
Mr Loïc **FAVENNEC** (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre **GOULLE** (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel **GUERBET**	Toxicologie
Mme Isabelle **LEROUX - NICOLLET**	Physiologie
Mme Christelle **MONTEIL**	Toxicologie
Mme Martine **PESTEL-CARON** (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi **VARIN** (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie **VAUGEOIS**	Pharmacologie
Mr Philippe **VERITE**	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile **BARBOT**	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy **BELLIEN** (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric **BOUNOURE**	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam **CHAGRAOUI**	Physiologie
Mme Camille **CHARBONNIER (LE CLEZIO)**	Statistiques
Mme Elizabeth **CHOSSON**	Botanique
Mme Marie Catherine **CONCE-CHEMTOB**	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile **CORBIERE**	Biochimie
Mr Eric **DITTMAR**	Biophysique

Mme Nathalie **DOURMAP**	Pharmacologie
Mme Isabelle **DUBUC**	Pharmacologie
Mme Dominique **DUTERTE- BOUCHER**	Pharmacologie
Mr Abdelhakim **ELOMRI**	Pharmacognosie
Mr Gilles **GARGALA** (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL **GHARBI-HAMZA**	Chimie analytique
Mme Marie-Laure **GROULT**	Botanique
Mr Hervé **HUE**	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia **LE GOFF**	Parasitologie – Immunologie
Mme Hong **LU**	Biologie
M. Jérémie **MARTINET** (MCU-PH)	Immunologie
Mme Marine **MALLETER**	Toxicologie
Mme Sabine **MENAGER**	Chimie organique
Mme Tiphaine **ROGEZ-FLORENT**	Chimie analytique
Mr Mohamed **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mme Malika **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mme Christine **THARASSE**	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric **ZIEGLER**	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile **GUERARD-DETUNCQ**	Pharmacie officinale
Mr Jean-François **HOUIVET**	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde **GUERIN**	Anglais

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mme Anaïs **SOARES**	Bactériologie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Sophie **MOHAMED**	Chimie Organique

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile **BARBOT**	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry **BESSON**	Chimie thérapeutique
Mr Roland **CAPRON**	Biophysique
Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB**	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth **CHOSSON**	Botanique
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie
Mr Abdelhakim **ELOMRI**	Pharmacognosie
Mr Loïc **FAVENNEC**	Parasitologie
Mr Michel **GUERBET**	Toxicologie
Mr François **ESTOUR**	Chimie organique
Mme Isabelle **LEROUX-NICOLLET**	Physiologie
Mme Martine **PESTEL-CARON**	Microbiologie
Mr Mohamed **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mr Rémi **VARIN**	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie **VAUGEOIS**	Pharmacologie
Mr Philippe **VERITE**	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR DES UNIVERSITES MEDECIN GENERALISTE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG)	UFR	Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES MEDECIN GENERALISTE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG)	UFR	Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Emmanuel **LEFEBVRE**	UFR	Médecine Générale
Mme Elisabeth **MAUVIARD**	UFR	Médecine générale
Mr Philippe **NGUYEN THANH**	UFR	Médecine générale
Mme Yveline **SEVRIN**	UFR	Médecine générale
Mme Marie Thérèse **THUEUX**	UFR	Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mme Laëtitia **BOURDON**	UFR	Médecine Générale
Mr Pascal **BOULET**	UFR	Médecine générale
Mr Emmanuel **HAZARD**	UFR	Médecine Générale
Mme Lucile **PELLERIN**	UFR	Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei **FETISSOV** (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul **MULDER** (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su **RUAN** (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil **ADRIOUCH** (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079**)**
Mme Carine **CLEREN** (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain **FRAINEAU** (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline **GAILDRAT** (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas **GUEROUT** (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel **LETELLIER** (med)	Physiologie
Mme Christine **RONDANINO** (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric **PASQUET**	Sciences du langage, orthophonie
Mr Youssan Var **TAN**	Immunologie
Mme Isabelle **TOURNIER** (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique **DELAFONTAINE**

HCN - Hôpital Charles Nicolle	*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*
CB - Centre Henri Becquerel	*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*
CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation	*SJ – Saint Julien Rouen*

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur ***donner aucune approbation ni improbation.***

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Di Fiore,

Merci de m'avoir confié ce sujet et me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

A Madame le Docteur Gangloff,

Merci d'avoir encadré ce travail de thèse. Merci pour ta sérénité, ta gentillesse et tes conseils judicieux durant ce travail.

A Monsieur le Professeur Michel,

Merci pour la disponibilité que vous accordez à vos internes au quotidien, tout au long de mon internat vous m'avez offert un enseignement précieux. Votre rigueur et vos qualités professionnelles sont des exemples à suivre pour nous tous.

A Monsieur le Professeur Savoye,

Je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à ce sujet en me faisant l'honneur de juger mon travail. Je vous remercie également pour la qualité de votre enseignement au quotidien. Soyez assuré de toute ma considération et de mon respect.

A Monsieur le Docteur Sefrioui,

Je te remercie pour ta disponibilité et pour l'ensemble des conseils et enseignements que tu as pu me donner de mon premier semestre au CHU aux soins intensifs jusqu'à l'élaboration de ce travail. Ta rigueur dans le travail et ton humanité sont des exemples pour moi.

A tout ceux ayant contribué à la réalisation de ce travail : les équipes de gastro-entérologie du CHU de Caen et du CHI d'Elbeuf, Patricia, l'unité de recherche INSERM U1245 et plus particulièrement Mme Ludivine BEAUSSIRE pour le temps que tu m'as accordé, tes conseils et ta relecture.

Aux chefs du service d'HGE du CHU de Rouen, merci pour vos qualités d'enseignement et votre disponibilité durant ces quatre années d'internat. C'est un plaisir de pouvoir continuer à travailler avec vous. A Simon, à Julien, mon regret restera de ne pas avoir fait une seule garde ensemble, à Mélanie, en souvenir de notre première pose de Blackmore à toutes les deux.

A toute l'équipe d'HGE du CH de Dieppe, merci pour votre accueil lors de mon premier semestre d'internat et pour votre patience lors de mes premiers pas en endoscopie.

A toute l'équipe de radiothérapie du Centre Joliot, merci pour ce dernier semestre et l'apprentissage des bases de la radiothérapie. Merci de m'avoir si bien intégrée au sein de votre équipe et pour la confiance que vous m'avez accordée.

A tous les membres du service d'HGE, notamment les infirmiers, aides-soignants, secrétaires, diététiciens, assistantes sociales, merci pour le travail que vous accomplissez au quotidien dans le service.

A mes co-internes d'HGE,

A Benoit, merci pour ta gentillesse, ton soutien sans faille et tes conseils tout au long de ce travail même à l'autre bout du monde, je suis heureuse de continuer à travailler avec toi en novembre.

A Cyril, pour ton humour, ta gentillesse et ta diplomatie qui ont contribué à notre duo de choc de gestion du planning l'hiver dernier.

A Éléonore, ma première co-interne, pour ton calme et ta gentillesse, pour avoir été ma fidèle compagne de chambre de journées DES, cours de DESC et j'en passe durant ces quatre années.

A Sabrina, ton caractère bien trempé, tes petits scoops et aussi ta capacité à me faire relativiser le délai pour rendre ce travail (qui, finalement est bouclé à temps). On va former une bonne équipe en novembre.

A Charlotte, Gwendoline, Vincent, Ahmed, Adrien, Capucine, Ilana, Marine, Virginie, Alexandra, Clémence, Juliette, Luc, Nicolas, Amina, Hugo, Flavie, Kenza et Raphaël, pour les semestres passés ensemble, pour la cohésion qu'il existe entre nous et qui j'espère perdurera.

A Mathieu, merci pour ton amour, ta patience, ta présence au quotidien et encore plus pendant l'élaboration de ce travail.

A ma mère, Nathalie, et Jean Mi, merci pour votre soutien sans faille durant toutes ces années. Merci maman pour ton écoute, tes encouragements et la confiance que tu as en moi.

A mon père, Vincent, merci pour ton soutien et ton aide notamment lors de mes (nombreux) appels à l'aide informatique.

A Matthieu, mon petit frère, les moments passés ensemble sont trop peu nombreux, je te souhaite le meilleur pour la suite dans ta vie professionnelle et personnelle.

A l'ensemble de ma famille,

A Michelle, merci pour ton soutien, ce travail représente l'aboutissement de mes années d'études et tu y as énormément contribué, A Dany, merci pour ton optimisme à toute épreuve, à mes oncles et tantes, mes cousins et cousines, votre présence ce jour compte beaucoup pour moi, merci de m'avoir toujours soutenue, de m'encourager et de croire en moi. Une pensée pour papy Jacques et Jean-Louis, j'aurais tellement voulu que vous soyez présents ce jour.

A ma « belle-famille », merci pour votre gentillesse, votre accueil au sein de votre famille et merci infiniment d'être présents pour me soutenir ce jour.

A mes amis fidèles depuis maintenant 10 ans malgré notre éloignement,

A Camille, Carole, Élise, Kevin, Mathilde, Florence, Samy, merci pour ces années d'externat partagées, les journées « BU », les jeudis soir, les vacances, … A tout ce qui fait notre amitié.

Et mes années d'internat,

A Antonin, pour nous avoir accompagné de Lille à Rouen et pour nous avoir présenté Albane, qui en plus de sa joie de vivre et de sa douceur te permet d'être à 9h sur les pistes au ski.

A Barbara, merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et ton enthousiasme sportif.

A Charlotte, toujours partante pour décompresser autour d'un petit repas ou d'un (ou plusieurs) verres.

A Hélène et Gautier, notre rencontre a conduit à une belle amitié et à de beaux voyages passés et à venir.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I. Le cancer colorectal métastatique ... 1

a. Épidémiologie ... 1

b. Facteurs de risque ... 2

i. Comportementaux et environnementaux ... 2

ii. Génétiques ... 2

c. Traitement du CCR métastatique (CCRm) non résécable d'emblée ... 4

II. Méthodes d'évaluation de la réponse au traitement dans le CCRm ... 6

a. Radiologiques – Critères RECIST 1.1 ... 6

b. Imagerie fonctionnelle ... 8

i. La Tomographie par émission de positons (T.E.P.) ... 8

ii. IRM de diffusion ... 12

c. Biomarqueurs ... 12

i. L'Antigène Carcino Embryonnaire ... 12

ii. Les Cellules Tumorales Circulantes ... 14

III. ADN Circulant ... 18

a. Généralités ... 18

b. Conditions pré-analytiques et analytiques ... 19

c. Intérêt clinique ... 21

i. Généralités ... 21

ii. Place actuelle dans le monitoring en oncologie ... 23

1. Hors CCRm ... 23
2. Dans le CCRm ... 26

OBJECTIF DE L'ETUDE ... 28

MATERIEL ET METHODES

I. Recrutement des patients ... 29

II. Analyse des biomarqueurs et évaluation de la réponse ... 29

a. ACE ... 29

b. ADN total circulant et ADN tumoral circulant ... 30

i. Centrifugation ... 30

ii. Extraction de l'ADN total circulant ... 30

iii. Quantification de l'ADN total circulant ... 30

iv. Quantification de l'ADN tumoral circulant ... 31

1. Pré-amplification ... 31
2. ddPCR ... 31
3. Interprétation des résultats ... 32

c. Évaluation de la réponse ... 32

III. Analyse statistique ... 32

RESULTATS

I. Caractéristiques de la population 34

II. Caractéristiques des biomarqueurs..... 36

a. Caractéristiques générales 36

b. Corrélations clinico biologiques (hors évaluation à M3) 38

i. Corrélations cliniques à l'inclusion (= C1)..... 38

ii. Corrélations entre ADNtot, ADNtum et ACE à C1..... 38

III. Corrélations clinico biologiques et évaluation à M3 39

a. Corrélations cliniques et évaluation à M3 39

i. RO versus Non RO 39

ii. PD versus Non PD 39

b. Corrélations des biomarqueurs et de l'évaluation à M3 40

i. RO versus Non RO 40

1. ADNtot..... 41
2. ADNtum..... 41
3. ACE..... 42

ii. PD versus Non PD 43

1. ADNtot..... 44
2. ADNtum..... 44
3. ACE..... 45

IV. Corrélations biologiques avec les paramètres de survie 46

a. SSP 46

i. ADNtot 47

ii. ADNtum 48

iii. ACE 50

b. SG..... 51

i. ADNtot 52

ii. ADNtum 53

iii. ACE 53

DISCUSSION..... 54

CONCLUSION..... 60

REFERENCES..... 61

ABREVIATIONS :

5-FU : 5-FluoroUracile

Ac : Anticorps

ACE : Antigène Carcino Embryonnaire

ADC : Coefficient de Diffusion Apparente

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNtot : ADN total circulant

ADNtum : ADN tumoral circulant

Ag : Antigène

AMM : Autorisation de Mise en Marché

ARNm : Acide Ribonucléique Messager

ASCO : Association Américaine pour l'Oncologie Clinique

AUC : Aire sous la courbe

BEAMing : Beads Emulsion Amplification Magnetics

CCR : Cancer colorectal

CCRm : Cancer colorectal métastatique

CHC : Carcinome Hépato Cellulaire

CHI : Centre Hospitalier Intercommunal

CHU : Centre Hospitalo Universitaire

CT : Chimiothérapie

CTCs : Cellules Tumorales Circulantes

DEP : Dielectrophorèse

dPCR : PCR Digitale

EDTA : Acide EthylèneDiamineTétraacétique

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EGTM : European Group on Tumor Markers

ESMO : European Society For Medical Oncology

FA : Fréquence allélique

FDA : Food and Drug Administration

FDG : FluoroDésoxyGlucose

HNPCC : Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer

HR : Hazard Ratio

IC 95 % : Intervalle de confiance à 95 %

IFNα : Interféron alpha

IMC : Indice de masse corporelle

IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique

NGS : Next Generation Sequencing

OA : Overall Acuracy

OMS : Organisation mondiale de la santé

OR : Odds Ratio

PAF : Polypose Adénomateuse Familiale

PERCIST : Positron Emission Tomography Response Criteria In Solid Tumors

PCR : réaction en chaîne par polymérase

PD : Maladie Progressive

RECIST : Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

RO : Réponse Objective

ROC : Receiver Operating Characteristic

RP : Réponse partielle

RR : Risque relatif

RT-PCR : Reverse-Transcriptase PCR

SD : Maladie stable

Se : Sensibilité

SG : Survie globale

Sp : Spécificité

SSP : Survie sans progression

SUV : Standard Uptake Value

TAP : Thoraco Abdomino Pelvienne

TDM : Tomodensitométrie

TEP : Tomographie par Émission de Positons

TNE : Tumeur neuro endocrine

TNCD : Thésaurus National de Cancérologie Digestive

US : Ultrasons

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VPN : Valeur Prédictive Négative

VPP : Valeur Prédictive Positive

WT : Wild Type

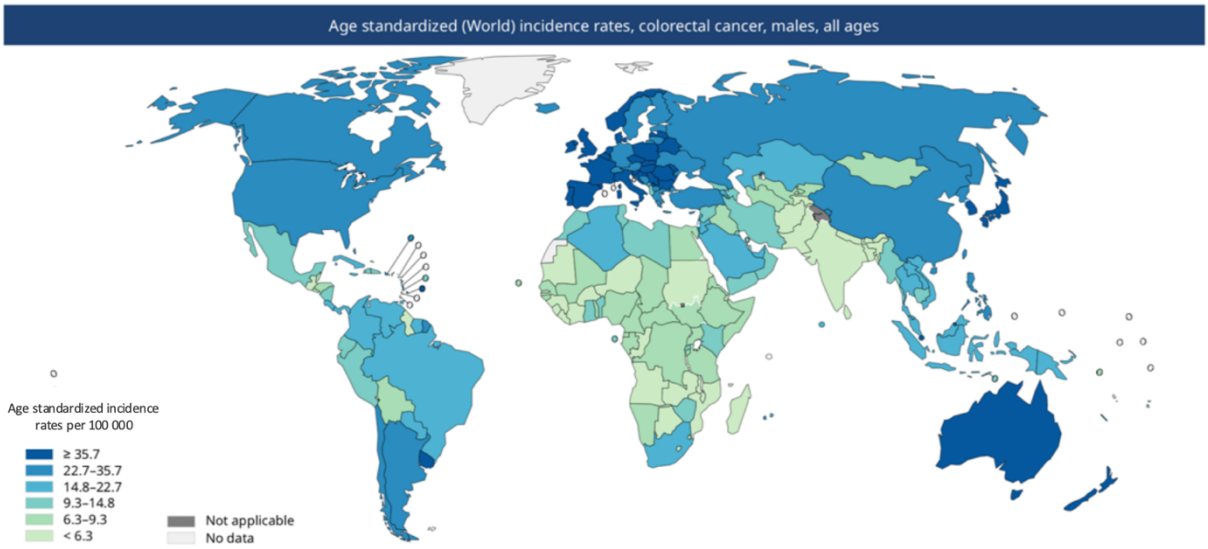
INTRODUCTION

I. Le cancer colorectal métastatique

a. Épidémiologie

Au niveau mondial, le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer par ordre d'incidence (10,2 %) et le second pour la mortalité (9,2 %). En 2018, on estimait à 1,8 million le nombre de nouveaux cas et à 881 000 le nombre de décès causés (1). L'incidence du CCR est environ trois fois plus élevée dans les pays développés que dans ceux en voie de développement (1).

Figure 1 : Répartition de l'incidence du CCR chez les hommes (Source modifiée d'après GLOBOCAN, 2018).



Les observations, menées dans le cadre du programme SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) aux États-Unis, retrouvent 20 à 25 % de CCR diagnostiqués au stade métastatique et l'apparition métachrone de métastases chez 50 % des patients ayant un CCR initialement localisé (2). Le taux de survie à 5 ans au stade métastatique est de 13,8 % (2).

b. Facteurs de risque

i. Comportementaux et environnementaux

Il existe des facteurs de risques modifiables tels que : la consommation d'alcool (Risque Relatif (RR) = 1,82 [IC95 % (Intervalle de Confiance à 95 %) 1,41 – 2,35] pour une consommation de 100g d'alcool par jour), le tabagisme (RR = 1,25 [IC95 % 1,04 – 1,51]), l'obésité (RR = 1,334 [IC95 % 1,253 – 1,420]), le diabète (RR = 1,27 [IC95 % 1,21 – 1,34]) et la consommation de viande rouge (RR = 1,18 [IC95 % 1,10 – 1,28] pour une augmentation de consommation de 100g par jour) (1,3).

Il existe d'autres facteurs de risques, non modifiables, tels que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (RR = 2,4 [IC95 % 2,1 – 2,7]), l'âge et le sexe masculin.

Des facteurs protecteurs sont établis comme l'activité physique régulière (RR = 0,73 [IC95 % 0,66 – 0,81]), le traitement hormonal substitutif (RR = 0,74 [IC95 % 0,68 – 0,81]), la prise d'aspirine (RR = 0,60 [IC95 % 0,42 – 0,86] pour 75mg d'aspirine par jour) et l'ablation endoscopique des lésions précancéreuses (RR = 0,23 [IC95 % 0,19 – 0,27] chez les patients ayant bénéficié d'une coloscopie dans les 10 années précédentes) (3).

ii. Génétiques

Indépendamment des syndromes de prédisposition génétique, un antécédent familial au premier degré de CCR constitue un facteur de risque majeur de développer un CCR (RR = 2,05 [IC95 % 1,96 – 2,14]) (4).

Concernant les syndromes de prédisposition génétique, les deux plus fréquents sont :

- Le syndrome de Lynch ou syndrome HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer)

Sa transmission est autosomique dominante. Il est présent dans 3 % des CCR. Le mécanisme repose sur une mutation soit, directement au niveau d'un gène de réparation des mésappariements de l'ADN : *MLH1* ou *MSH2,* majoritairement, dans 60 à 80 % des cas ; *MSH6* ou *PMS2* plus rarement, soit indirectement au niveau du gène *EPCAM* entrainant l'inactivation épigénétique secondaire de *MSH2*. En population générale, la fréquence mutationnelle globale est de 0,359 % et elle est respectivement pour *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2* de : 0,051 %, 0,035 %, 0,132 % et 0,14 % (5). Les mutations les plus fréquemment retrouvées (*MSH6* et *PMS2*) sont celles les moins fréquemment retrouvées chez les patients développant un CCR. La mutation de *MLH1* expose à un risque cumulé de CCR à l'âge de 70 ans de 34 %

[IC95 % 25 – 50 %] chez l'homme et de 36 % [IC95 % 25 – 51 %] chez la femme. La mutation de *MSH2,* expose à un risque cumulé de CCR à l'âge de 70 ans de 47 % [IC95 % 36 – 60 %] chez l'homme et de 37 % [IC95 % 27 – 50 %] chez la femme (6). Ces données illustrent le fait que la pénétrance est incomplète.

- La PAF (Polypose Adénomateuse Familiale)

La PAF est caractérisée par la survenue précoce (dans l'enfance ou l'adolescence) d'adénomes recto-coliques multiples (des centaines, voire des milliers), en particulier. La PAF associée à la mutation du gène *APC* est un syndrome à transmission autosomique dominante. Les mutations peuvent néanmoins survenir de novo dans 25 % des cas. La pénétrance de la PAF est proche de 100 %. Elle est responsable d'environ 1 % des CCR. La fréquence de la mutation du gène *APC* est estimée à 1/8000 dans la population générale (7).

Le gène *APC* est un gène suppresseur de tumeur situé sur le chromosome 5 (5q21-22) comportant 15 exons. Il participe au complexe de phosphorylation qui contrôle de manière post traductionnelle le taux de β-caténine. La β-caténine phosphorylée est ainsi dégradée par un système ubiquitine / protéasome permettant de maintenir des taux cytoplasmiques bas. La mutation du gène APC entraine une augmentation des taux de β-caténine libre cytoplasmique ce qui active la voie de signalisation Wnt entrainant la translocation de la β-caténine en excès dans le noyau avec la formation d'un complexe nucléaire β-caténine-TCF4. Ce complexe possède une activité transcriptionnelle notamment pour certains proto-oncogènes comme c-MYC ou la cycline D1 (8). Il joue un rôle dans les phénomènes d'adhésion et de migration cellulaire. Il intervient dans l'organisation du cytosquelette au niveau des microtubules et du fuseau mitotique nécessaire à la ségrégation chromosomique lors de la mitose et au maintien de l'euploïdie (7).

Dans la PAF il existe une corrélation génotype-phénotype avec une grande hétérogénéité de présentation clinique selon le codon muté. La mutation du codon 1309 est associée à un âge de début jeune, à partir de 20 ans. C'est la plus fréquente, elle concerne 10 % des patients atteints de polypose. Les mutations situées entre les codons 168 et 1580 (codon 1309 exclu) sont associées à un âge de début moyen autour de 30 ans. Les mutations localisées entre les codons 1250 et 1464 sont associées à une polypose plus sévère, profuse. Les mutations à l'extrémité 5' du codon 168 et à l'extrémité 3' du codon 1580 sont associées à une entité différente : la PAF atténuée, dont l'âge de début est plus tardif, en moyenne à 52 ans et la polypose est moins sévère (moins de 100 adénomes) (9).

La PAF associée au gène *MUTYH* est une entité décrite plus récemment. Il concerne 15 à 20 % des patients atteints de polypose non liée à *APC*. C'est un syndrome à transmission autosomique récessive. En population générale, on estime à 2 % la fréquence des mutations mono-alléliques et entre 1 et 2 / 10 000 celle des mutations bi-alléliques. Les manifestations cliniques sont similaires à celles de la PAF atténuée et le risque cumulé de CCR est d'environ 80 % chez les patients avec une mutation bi-allélique (9).

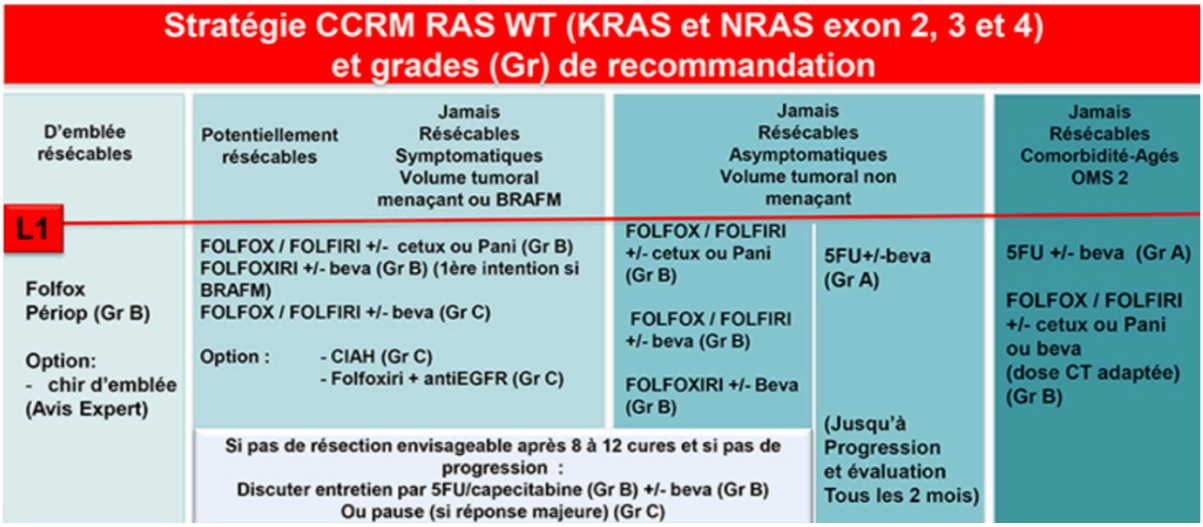
c. Traitement du CCR métastatique (CCRm) non résécable d'emblée

Le traitement repose en première intention sur une chimiothérapie cytotoxique ± une thérapie ciblée dont les objectifs seront conditionnés par le projet thérapeutique : i) stratégie curative pour les formes résécables ou potentiellement résécables ; ii) stratégie palliative pour les formes jamais résécables avec comme but la prolongation de la survie, le contrôle des symptômes et l'amélioration de la qualité de vie du patient.

La réponse précoce à cette première ligne de traitement est essentielle quel que soit le projet thérapeutique. Ainsi, l'existence d'une relation entre la réponse tumorale à la première ligne de chimiothérapie et l'allongement de la survie globale (SG) a été décrite par Buyse *et coll.* en 2000 avant l'utilisation des thérapies ciblées (10), des données similaires ont été retrouvées pour un effectif plus important de patients traités par 5-FLUOROURACILE (5FU) et IRINOTECAN ou IRINOTECAN et OXALIPLATINE (11). Cette relation a été confirmée par Cremolini *et coll.* en mettant en évidence dans l'essai TRIBE que la réduction tumorale précoce et la profondeur de la réponse augmentaient à long terme la SG et la survie sans progression (SSP) chez les patients atteints d'un CCRm traités par une chimiothérapie de première ligne associée au BEVACIZUMAB (12). La réponse tumorale précoce semble essentielle dans la prise en charge des CCRm potentiellement résécables. En effet, Karoui *et coll.* ont montré une corrélation entre le nombre de cycles de chimiothérapie pré opératoires et la morbidité post métastasectomie hépatique. Il était mis en évidence des modifications du parenchyme hépatique avec l'apparition de dilatation sinusoïdale, d'atrophie des hépatocytes ou de nécrose hépatocytaire exposant au risque d'insuffisance hépatique transitoire (13).

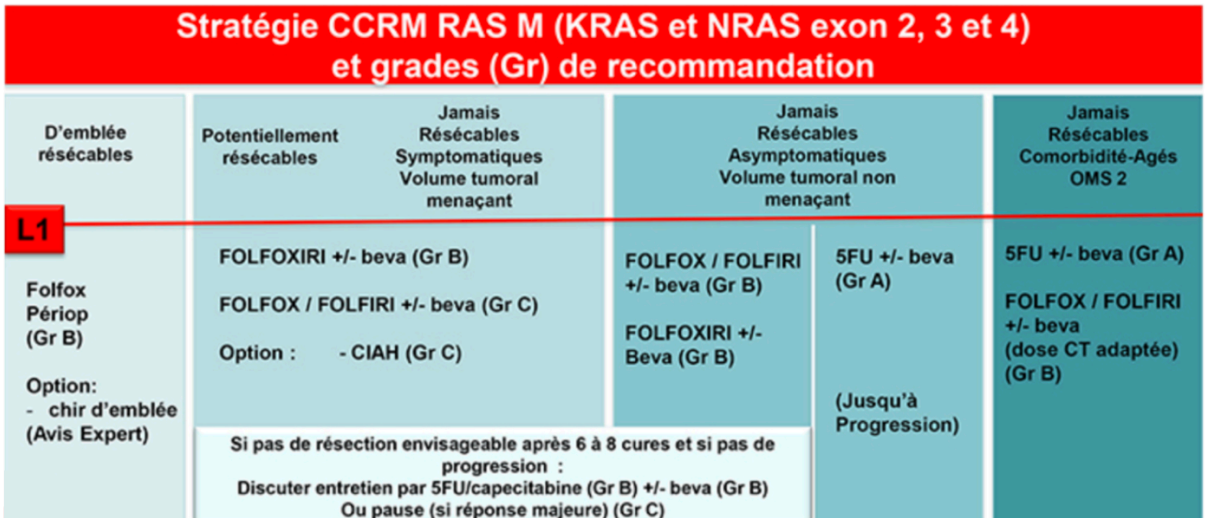
Concernant la stratégie thérapeutique, les recommandations françaises du *Thésaurus National de Cancérologie Digestive* (TNCD) concernant la première ligne de traitement sont indiquées en Figures 2 et 3 selon le statut mutationnel RAS déterminé lors du diagnostic (14).

Figure 2 : Stratégie thérapeutique d'un CCRm RAS non muté, modifiée à partir du TNCD (14).



CCRM : Cancer colorectal métastatique ; RAS WT : RAS Wild Type ; Cetux : Cetuximab ; Pani : Panitumumab ; Beva : Bevacizumab ; CIAH : Chimiothérapie intra artérielle ; CT : Chimiothérapie ; BRAFM : BRAF muté.

Figure 3 : Stratégie thérapeutique d'un CCRm RAS muté, modifiée à partir du TNCD (14).



CCRM : Cancer colorectal métastatique ; Beva : Bevacizumab ; CIAH : Chimiothérapie intra artérielle ; CT : Chimiothérapie ; RAS M : RAS muté.

Le choix du schéma de chimiothérapie, notamment pour les CCRm potentiellement résécables, est ensuite guidé par deux principes : i) obtenir une efficacité maximale et ii) limiter la toxicité induite par le traitement. Dans ce contexte déterminer précocement la réponse thérapeutique est un enjeu majeur.

II. Méthodes d'évaluation de la réponse au traitement dans le CCRm

a. Radiologiques – Critères RECIST 1.1

Les recommandations Françaises du TNCD et Européennes de l'ESMO (*European Society for Medical Oncology*) indiquent que l'efficacité de la chimiothérapie doit être évaluée par une tomodensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne (TDM TAP) tous les 2 à 3 mois, interprétée selon les « *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* » (RECIST 1.1), actualisés en 2009.

Ces critères, classent et évaluent les lésions métastatiques en « lésions cibles » et « lésions non cibles ». Dans la détermination des lésions cibles, sont prises en compte au maximum deux lésions d'organes ≥ 10 mm, pour les adénopathies est pris en compte le diamètre du petit axe qui doit être ≥ 15 mm. La réponse au traitement se fait sur l'interprétation de la variation des sommes des plus grandes longueurs des lésions cibles en comparaison au scanner initial. L'évaluation permet ainsi de définir 4 types de réponse : « réponse complète » en cas de disparition totale ; « réponse partielle » (RP) en cas de diminution d'au moins 30 % ; « maladie progressive » (PD) en cas d'augmentation d'au moins 20 % ou en cas d'apparition de nouvelles lésions; « maladie stable » (SD) en cas d'absence des critères ci-dessus (15). La réponse objective (RO) comprend les entités « réponse complète » et « réponse partielle ».

Cette évaluation présente plusieurs limites. Les mesures répétées d'une même lésion sont faiblement reproductibles entre les observateurs. Bellomi *et coll.* ont évalué la variabilité inter observateurs dans la somme des plus grands diamètres des lésions mesurés selon RECIST 1.1. et l'influence sur l'évaluation de la réponse chez des patients présentant des métastases hépatiques. Différents cas ont été évalués par un expert et ont été présentés à 100 radiologues observateurs. Plus de 30 % des observateurs inclus n'étaient pas en accord avec l'évaluation de la réponse réalisée par l'expert. La maladie stable semble l'entité la plus difficile à définir, ce cas a obtenu le plus faible accord entre observateurs, 52 %, et la variation de la somme des diamètres entre observateurs la plus élevée avec un coefficient de variation (défini comme le

quotient de l'écart type relatif et de la moyenne des mesures) de 76,9 %. Les principales explications retrouvées sont le manque d'expérience du radiologue et le choix initial des lésions cibles (16).

Certains patients peuvent également ne pas avoir de maladie « mesurable » selon les critères RECIST 1.1. C'est le cas des lésions de diamètres inférieurs à ceux définis. Les épanchements (péritonéaux, pleuraux, cardiaques, …) sont non mesurables de façon fiable et ne peuvent pas constituer une lésion cible (15). Concernant les métastases osseuses seules les lésions osseuses lytiques ou mixtes, lytiques-condensantes, présentant une extension au sein des tissus mous peuvent être considérées comme mesurables si elles répondent aux critères énoncés précédemment. Les lésions ostéocondensantes à prédominance ostéoblastiques ne sont pas mesurables (15).

Enfin, ces critères reposent uniquement sur des mesures unidimensionnelles et ne prennent pas en compte les changements fonctionnels. La nécrose tumorale rend l'évaluation difficile car elle n'entraine pas de diminution précoce de la taille des lésions, alors qu'elle entraine une chute du volume tumoral viable. Les thérapies ciblées notamment anti-angiogéniques (comme par exemple le BEVACIZUMAB, anticorps anti-VEGF), induisent peu de changement de taille ou alors de manière tardive. Chez les patients recevant ces thérapies il a été montré une mauvaise corrélation entre le taux de réponse selon les critères RECIST 1.1 et les paramètres de survie (17). Leur action est surtout cytostatique et non cytotoxique. Chun *et coll.* ont étudié la relation entre la SG et l'évaluation radiologique selon RECIST 1.1. en comparaison à une évaluation scannographique basée sur des critères morphologiques (atténuation tumorale, interface foie sain – tumeur et aspect péri tumoral) chez des patients ayant un CCRm au niveau hépatique recevant une chimiothérapie et du BEVACIZUMAB. La réponse optimale définie selon les critères morphologiques était significativement prédictive d'une SG plus longue avec une médiane de 31 mois [IC95 % 26,8 – 35,2] versus 19 mois [IC95 % 14,6 – 23,4] chez les non répondeurs (p = 0,009). En revanche, l'évaluation selon les critères RECIST 1.1. n'était pas associée à la SG. Les patients présentant une RO avaient une SG médiane de 28 mois [IC95 % 22,5 – 33,5] contre 22 mois [IC95 % 15,3 – 28,7] chez les non répondeurs (p = 0,45) (17).

Plusieurs thérapies ciblées ont ainsi été approuvées au niveau international par la Food and Drug Administration (FDA) ou ont obtenu une autorisation de mise en marché (AMM) en France malgré des taux de réponse selon les critères RECIST ≤ à 10 % dans des essais de phase III (18). A titre d'exemple, l'EVEROLIMUS est utilisé pour le traitement des tumeurs

neuroendocrines (TNE) pancréatiques avancées. Les taux de réponse objectifs restent faibles selon les critères RECIST (5 % versus 2 % pour le placebo) mais l'inhibition de la croissance tumorale est prolongée. Dans l'étude RADIANT-3, la SSP médiane était ainsi de 11 mois versus 4,6 mois avec placebo (HR (Hazard Ratio) = 0,35 ; [IC95 % : 0,27 – 0,45] ; p < 0,001) (19).

Le REGORAFENIB est un inhibiteur multikinase oral ayant une activité anti angiogénique et anti tumorale. Il a obtenu l'AMM dans le CCRm après échec des autres lignes de traitement alors que les taux de réponse selon RECIST 1.1 étaient faibles. Dans l'essai de phase III CORRECT, 753 patients ont été randomisés pour recevoir le REGORAFENIB (n = 500) ou le PLACEBO (n = 253). La SG médiane était de 6,4 mois dans le groupe REGORAFENIB contre 5 mois dans le groupe PLACEBO (RR = 0,77 ; [IC95 % : 0,64 – 0,94] ; p = 0,0052). Cela se traduisait par une réduction de 23 % du risque de décès. Aucun patient n'a présenté de réponse complète, 5 patients (1 %) du groupe REGORAFENIB et 1 patient (0,4 %) du groupe PLACEBO ont présenté une RP (p = 0,19) (20).

Dans le carcinome hépato cellulaire (CHC) avancé, une amélioration significative de la SG sous SORAFENIB a été mise en évidence dans l'étude SHARP. Les taux de réponse selon les critères RECIST 1.1 étaient proches de 2 %. Une version modifiée des critères RECIST a alors été développée : mRECIST. Les taux de réponse étaient significativement différents entre ces deux critères. Chez 42 patients présentant une maladie stable selon les critères RECIST 1.1, après une nouvelle évaluation de la réponse selon les critères mRECIST, la SG moyenne était de 17 mois, 10 mois et 4 mois, respectivement, selon le classement en RO (n = 11), SD (n = 29) et PD (n = 2), p = 0,016 (21).

Le gold standard pour l'évaluation de la réponse à la chimiothérapie reste la TDM TAP en appliquant les critères RECIST 1.1. Cependant, ces critères présentent plusieurs limites, notamment en cas d'utilisation de thérapies ciblées, largement employées dans le CCRm. D'autres méthodes d'évaluation morphologique de la réponse tumorale ont donc été étudiées.

b. Imagerie fonctionnelle

i. La Tomographie par émission de positons (T.E.P.)

Le 18F-fluorodésoxyglucose (18F-FDG) est un analogue du glucose. Il est absorbé via le transporteur GLUT-1. Puis, il est métabolisé en FDG-6-phosphate par une iso enzyme, l'Hexokinase II. Ce métabolite s'accumule dans le cytoplasme de la cellule car il n'est pas reconnu par les enzymes de dégradation du glucose de la voie de la glycolyse. Cette

accumulation se fait préférentiellement dans les cellules tumorales. L'absorption du 18-FDG est proportionnelle à la prolifération cellulaire et au nombre de cellules métaboliquement actives. Le FDG-6-phosphate est détecté via un marquage par un radionucléide, le Fluor-18.

L'atout de la TEP, est de mesurer les changements fonctionnels tumoraux en différenciant la maladie tumorale active du tissu cicatriciel et nécrotique. Elle fournit aussi des paramètres quantitatifs reproductibles de l'activité de la maladie via la mesure de la Standard Uptake Value (SUV).

La principale limite est la non spécificité de l'absorption du 18F-FDG par les cellules malignes. Celle-ci est également élevée dans les tissus de granulation, inflammatoires ou le tissu hépatique sain. Cela rend plus difficile la détection de lésions présentant une réponse métabolique importante dont l'absorption est quasiment similaire à celle du tissu hépatique sain (22). La qualité de la résolution anatomique est très limitée ce qui explique le succès du couplage à un examen tomodensitométrique qui s'est imposé comme un outil de repérage anatomique précieux pour localiser et rattacher à une structure précise un foyer d'hyper métabolisme.

D'après les recommandations Françaises du TNCD et Européennes de l'ESMO, la TEP n'est actuellement pas indiquée pour l'évaluation thérapeutique et le suivi du CCRm en cours de traitement palliatif. Sa réalisation est uniquement recommandée en cas de projet de résection chirurgicale de métastases hépatiques, afin de s'assurer de l'absence de lésions secondaires extra-hépatiques, et, en cas de doute sur une récidive hépatique après destruction focalisée par radiofréquence.

La TEP, suscite néanmoins de l'intérêt quant à sa capacité à prédire de manière précoce la réponse tumorale (23). Des critères de réponse pour les tumeurs solides ont d'ailleurs été développés par l'Organisation européenne pour la recherche et le traitement du cancer (EORTC) et sont nommés critères PERCIST (Positron Emission Tomography Response Criteria In Solid Tumors) (24).

Il existe donc des données contradictoires quant à l'utilisation de la TEP comme marqueur précoce de la réponse tumorale dans le CCRm. Les résultats, non exhaustifs, des études ayant évalué la place de la TEP dans cette indication sont indiqués dans le Tableau 1. Ces études présentent des résultats et des méthodologies hétérogènes notamment concernant le délai de réalisation de la TEP et sur les critères d'inclusion des patients. Ainsi, Byström *et coll.* ont mis en évidence une corrélation significative entre la RO et la réponse métabolique ($p = 0,00001$). En revanche, la réponse métabolique n'était pas corrélée de manière significative au délai jusque la progression ($p = 0,5$) ou à la SG ($p = 0,1$) (25). Liu *et coll.* ont évalué la

réponse métabolique de la TEP en utilisant 2 méthodes : i) les critères PERCIST ; ii) la définition de la non réponse par une augmentation de la SUV_{max}. Les résultats étaient divergents. Avec la première méthode le taux de réponse à S1 (1 semaine) était de 37 % et à S4 (4 semaines) de 52 % versus 74 % et 67 % respectivement pour la seconde méthode. Il en était de même pour les résultats concernant les paramètres de survie. La SSP et la SG n'étaient pas corrélées à l'évaluation de la réponse selon les critères PERCIST ($p = 0,316$ et $p = 0,404$, respectivement), mais, il existait une corrélation significative avec l'évaluation basée sur la SUV_{max} ($p = 0,001$ et $p < 0,001$, respectivement) (26).

En résumé, la TEP n'est actuellement pas recommandée pour le monitoring de la réponse à la chimiothérapie chez les patients ayant un CCRm. Mais, elle semble intéressante, notamment en la couplant aux examens anatomiques, car elle est bien corrélée à la réponse au traitement. Des essais de plus grande envergure, randomisés, sont nécessaires pour préciser sa place exacte, le délai de sa réalisation et pour standardiser les paramètres évalués.

Tableau 1: Évaluation de la TEP dans le monitoring de la réponse tumorale dans le CCRm.

Auteur Année	**Effectifs**	**Localisation Métastatique**	**Traitement**	**Gold Standard**	**Timing TEP**	**Résultats**
Findlay et coll. 1996 (27)	n = 20	Hépatique ≥ 3 cm	5FU ± IFNα	TDM ou IRM à S0 et S12 Critères OMS	Inclusion S4 – S5	Réponse globale : ↓ T : L ≥ 15 % Se = 100 % ; Sp = 75 %
Bender *et coll.* 1999 (28)	n = 10	Hépatique	5FU	US, TDM ou IRM à S0 et S6 Critères OMS	Inclusion H72	Réponse : Δ SUV H72 = - 22 ± 10 % Non réponse : Δ SUV H72 = +13 ± 17 % ; p = 0, 01
De Geus-Oei *et coll.* 2008 (29)	n = 61	Toutes	CT toutes lignes	NA	Inclusion M2 M6	↓ SG: ↓ SUV M2 > 20 %; p = 0,017; ↓ SUV M6 > 20 % p = 0,048 ↓ SSP : ↓ SUV M2 > 20 % ; p = 0,035 ; ↓ SUV M6 > -20 % p = 0,081
Byström *et coll.* 2009 (25)	n = 51	Pulmonaire ou hépatique	1re ligne 5FU + Irinotécan	TDM à S4 et S8 RECIST	Inclusion Après C2	Corrélation pour la RO ; *r* = 0,57, p = 0,00001 Se = 77 % ; Sp = 76 %
Hendlisz *et coll.* 2012 (30)	n = 40	Toutes > 15 mm	CT	TDM après C3 RECIST	J0 J14	Réponse : ↓ SUV J14 > 15 % Se = 100 % ; [IC95 % : 69 – 100] Sp = 57 % ; [IC95 % : 37 – 75] VPN = 100 % ; [IC95 % : 80 – 100] VPP = 43 % ; [IC95 % : 23 – 66]
Hong *et coll.* 2013 (31)	n = 18	Extra Hépatique	1re ligne FOLFOX	TDM à S6 RECIST	1er cycle : J0/J2/J5	Réponse : ↑ SUV_{MAX} J2 ≤ 45,8 % ; Se = 100 % ; Sp = 69,2 % ; p = 0,029 ↓ SUV_{MAX} J5 ≥ 10,6 % ; Se = 100 % ; Sp = 76,9 % ; p = 0,007
Liu *et coll.* 2015 (26)	n = 27	Toutes	3ème ligne CETUXIMAB + IRINOTECAN	TDM à M3 RECIST	Inclusion S1 S4	Non RO = ↑ SUV_{MAX} Corrélé à la SSP à S1, p = 0,001 et à S4, p < 0,001 Corrélé à la SG à S1, p < 0,001 et à S4, p < 0,001
Woff *et coll.* 2016 (32)	n = 38	Toutes	SORAFENIB + CAPECITABINE	TDM à l'inclusion et à S6-S8 RECIST	Inclusion S3	Réponse : ↓ SUV_{MAX} > 15 % ; VPN = 95 % ; VPP = 72 %
Mogensen *et coll.* 2017 (33)	n = 39	Hépatique > 1cm	1re ligne	TDM après C3 RECIST	Après C1	Absence de corrélation ; p = 0,24

↓ : Diminution ; ↑ : Augmentation ; S4-S5 : semaine 4 – 5 ; H72 : 72 heures ; M2 : 2 mois ; J0 : Jour 0 ; C2 : 2ème cure.
T : L : Ratio d'absorption tumeur / foie sain ; SUV : standard uptake value ; Δ SUV : différence de SUV ; *r* : corrélation de Spearman ; SUV_{MAX} : standard uptake value maximale SG : Survie globale ; SSP : Survie sans progression ; VPP : Valeur prédictive positive ; IC95 % : Intervalle de confiance à 95 % ; VPN : valeur prédictive négative ; Se : Sensibilité ; Sp : Spécificité ; US : Ultrasons ; RO : Réponse Objective ; CT : Chimiothérapie.

ii. IRM de diffusion

Le principe repose sur la quantification du degré de diffusion des protons au sein de l'espace extra cellulaire tissulaire. Il se traduit par le « Coefficient de Diffusion Apparente » (ADC) exprimé en mm^2/s et permet une caractérisation non invasive de la cellularité tissulaire. Dans les tissus tumoraux faiblement cellulaires, les protons se déplacent librement dans l'espace extracellulaire, ce qui entraîne un ADC élevé. A l'inverse, dans les tissus avec une cellularité élevée, comme le tissu tumoral, l'espace extracellulaire est plus restreint, donc, la diffusion des protons est limitée et l'ADC est bas. La chimiothérapie cytotoxique entraine le phénomène de mort cellulaire. Les protons pourront donc diffuser plus librement et on observera une augmentation de l'ADC.

Il a été montré que ces modifications de diffusion des protons se produisaient de manière plus précoce que les changements morphologiques tumoraux (34). Cette technique de suivi de la réponse au traitement a été surtout étudiée dans les tumeurs cérébrales (35). Les mouvements physiologiques internes des organes ont constitué un frein initial à une application aux tumeurs extra cérébrales. Koh *et coll.* ont mis en évidence une augmentation des valeurs d'ADC chez des patients ayant un CCRm au niveau hépatique et ayant répondu à la chimiothérapie selon les critères RECIST 1.1 (36). Donati *et coll.* ont montré une corrélation positive entre la mesure de l'ADC et le degré de régression histologique de métastases hépatiques de CCRm après chimiothérapie préopératoire (37). Ces données suggèrent que l'IRM de diffusion pourrait être un bon moyen de suivi des métastases hépatiques des CCR. D'autres études ont montré des données prometteuses concernant l'évaluation d'autres sites tumoraux (métastases osseuses vertébrales (38), CHC (39) ou cancer du rectum après radio-chimiothérapie (40)).

Des études complémentaires, une standardisation des protocoles d'acquisition et de mesure sont nécessaires avant de pouvoir intégrer l'IRM de diffusion en tant que marqueur de la réponse au traitement (41).

c. Biomarqueurs

i. L'Antigène Carcino Embryonnaire

Il a été décrit pour la première fois en 1965 par *Gold et Freedman* (42). Il a été identifié comme un antigène présent à la fois au sein des adénocarcinomes coliques et dans le tissu colique embryonnaire fœtal durant les 6 premiers mois de gestation, d'où l'appellation, Antigène Carcino Embryonnaire (ACE).

C'est une glycoprotéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Sa structure est proche de celles de molécules d'adhésion telles que ICAM-1 et ICAM-2, ce qui suggère son rôle dans les phénomènes d'adhésion cellulaire et dans l'invasion métastatique. Ce rôle a été mis en évidence in vitro, par la transfection dans un clone de cellules tumorales colorectales d'un ADN complémentaire codant pour l'ACE, leur induisant un potentiel métastatique (43). In vivo, Duffy *et coll.* ont montré que le nombre de métastases hépatiques augmentait de 2 % à 48 % après injection d'ACE à des modèles murins préalablement greffés d'un CCR (44).

L'ACE est synthétisé chez l'individu sain en concentration faible avec des valeurs normales situées entre 2,5 et 5 μg/l. Sa demi vie est de 2,8 jours (45). Son taux est augmenté chez plus de 80 % des patients ayant un CCRm (44). Il existe ainsi une proportion significative de patients pour lesquels le taux d'ACE reste bas et donc, non informatif pour le suivi.

Les recommandations américaines (*American Society of Clinical Oncology*, ASCO) de 2000, européennes (*European Group on Tumor Markers*, EGTM) de 2007 et françaises (TNCD) indiquent l'utilisation du dosage de l'ACE pour le suivi du CCRm en association aux autres méthodes d'évaluation, notamment radiologiques. Les données actuelles ne sont pas suffisantes pour le recommander comme seul marqueur d'évaluation. Les recommandations de l'ASCO indiquent toutefois que deux valeurs supérieures à la valeur de base doivent faire considérer la maladie comme évolutive même en l'absence de progression radiologique (46). En cas de maladie de stade II ou III il est recommandé de monitorer l'ACE tous les 2 à 3 mois pendant les 2 à 3 ans suivant le traitement initial pour aider à la détection précoce des récidives en particulier hépatiques.

Plusieurs travaux ont montré que la diminution de l'ACE pendant la chimiothérapie était prédictive d'une meilleure SG et inversement qu'une augmentation de l'ACE prédisait une maladie évolutive. Iwanicki Caron *et coll.* ont mis en évidence une augmentation significative de la SSP médiane chez les patients avec un CCRm au niveau hépatique ayant une pente d'ACE < - 0,2 par rapport à ceux ayant une pente > - 0,2 de 10 mois à 6 mois respectivement ($p < 0,0001$). La pente d'ACE était calculée à partir des prélèvements réalisés le jour de la 1ère et de la 6ème cure de chimiothérapie (47). Ces données ont été confirmées par l'étude COCA-COLON qui a mis en évidence une association entre une pente d'ACE > 0,05 et la progression ($p < 0,0001$). Cette pente s'avérait discriminante pour le diagnostic de progression avec une sensibilité (Se) = 46 % [IC95 % 31 – 63], une spécificité (Sp) = 95 % [IC95 % 89 – 98], une valeur prédictive positive (VPP) = 76 % [IC95 % 55 – 91] et une valeur prédictive négative (VPN) = 83 % [IC95 % 76 – 89]. En analyse multivariée, la cinétique de l'ACE était associée

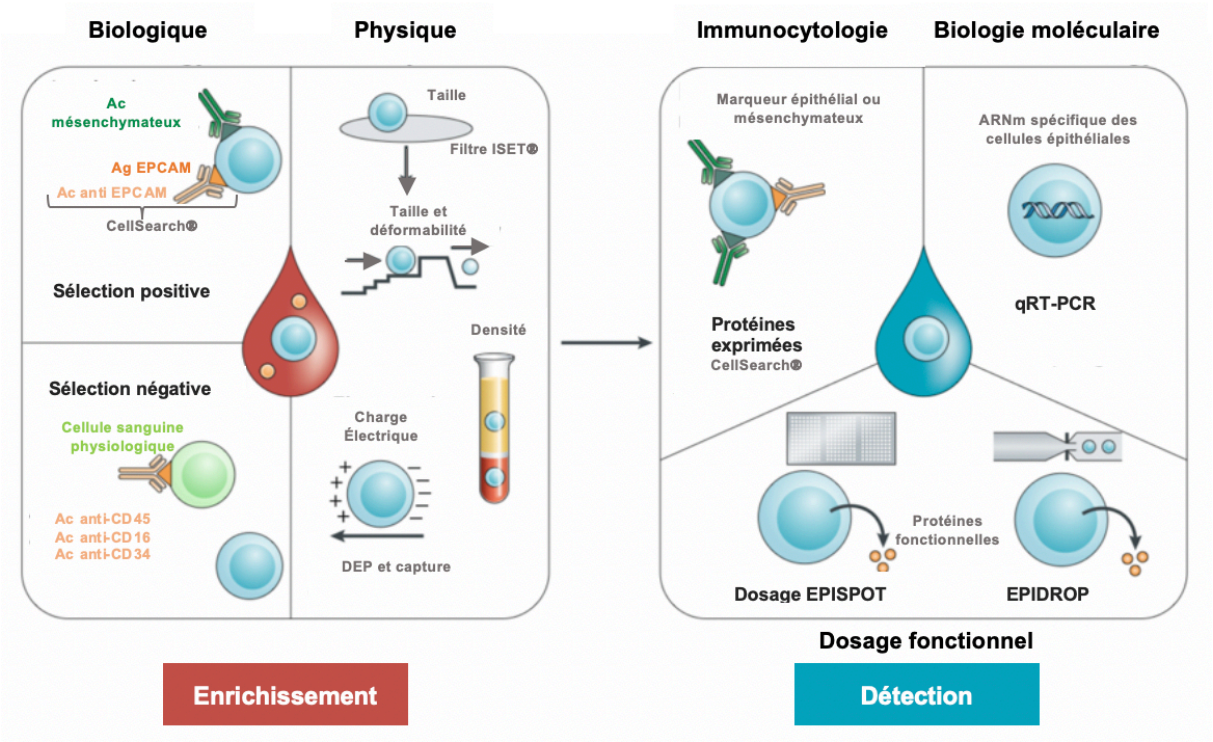
de manière significative à la progression radiologique (OR (Odds Ratio) = 16,64 [IC95 % 5,89 – 47,03], p < 0,0001), à la SSP (HR = 3,47 [IC95 % 2,18 – 5,53], p < 0,0001) et à la SG (HR = 2,17 [IC95 % 1,34 – 3,5], p = 0,0015) (48).

Un « flare up » initial du taux d'ACE, est décrit chez environ 15 % des patients malgré l'absence de progression ultérieure documentée. Ainsi, dans une série de 27 patients, recevant une chimiothérapie pour un CCRm, 4/27 ont présenté une élévation initiale transitoire du taux d'ACE qui n'était pas prédictive de la réponse au traitement. Trois d'entre eux présentaient une réponse partielle et un patient présentait une stabilité de la maladie (49). Ces données laissent à penser que ce biomarqueur ne semble pas constituer un candidat idéal pour l'évaluation précoce de la réponse tumorale après une à deux cures de chimiothérapie.

ii. Les Cellules Tumorales Circulantes

Les cellules tumorales circulantes (CTCs) proviennent soit d'une libération passive dans la circulation sanguine par la tumeur ou alors d'un envahissement du stroma et des capillaires sanguins. En situation métastatique elles circulent à des taux très faibles de l'ordre de 1 à 10 par mL de sang. L'enjeu est de les isoler dans la circulation sanguine grâce à leurs caractéristiques physico-chimiques ou molécules de surface qui permettent de les distinguer des cellules sanguines physiologiques. Pour cela 2 étapes sont nécessaires : une première d'enrichissement puis une seconde de détection détaillées dans la Figure 4. Le système CellSearch® est la seule technique approuvée par la FDA pour la détection des CTCs. L'enrichissement est basé sur l'isolement d'un couple Anticorps (Ac) – Antigène (Ag) formé par la reconnaissance d'un Ag épithélial, l'Ag EPCAM qui est isolé après exposition à un champ magnétique. La détection se fait ensuite par immunofluorescence (50).

Figure 4: Techniques d'enrichissement et de détection des CTCs, modifiée d'après Pantel *et coll.* (50).



ISET : Isolation by size of tumor ; DEP : Diélectrophorèse ; ARNm : ARN messager ; qRT-PCR : RT-PCR quantitative ; EPISPOT : EPIthelial ImmunoSPOT.

Cohen *et coll.* ont montré qu'il était possible dans le CCRm de détecter des CTCs, de les quantifier et de les caractériser. Ils ont étudié 50 patients avant le début d'une nouvelle ligne de traitement. Le taux médian de CTCs détectées était de 2/7,5 mL de sang et 77 % des échantillons comptaient au moins 1 CTC/7,5 mL en cytométrie de flux. L'étape d'enrichissement était faite par immunosélection positive via la détection de l'Ag EPCAM puis, l'isolement se faisait par des billes électromagnétiques. La détection était réalisée via une RT-PCR multigènes. (51)

Les CTCs ont été évaluées dans le monitoring de la réponse au traitement dans le CCRm et en tant que marqueur pronostic, les résultats des principales études sont indiqués dans le Tableau 2.

Il ressort de ces études qu'un taux initial élevé de CTCs, de même qu'une absence de diminution sous traitement est souvent associée à un pronostic péjoratif. Ainsi, Cohen *et coll.* ont mis en évidence que les patients avec un taux de CTCs initial ≥ 3 / 7,5 mL avaient une SSP médiane et une SG médiane plus courte que ceux présentant un taux initial < 3 / 7,5 mL : 4,4 versus 7,8 mois ($p = 0,004$) et 9,4 versus 20,6 mois ($p < 0,0001$), respectivement (52).

Néanmoins les données pour utiliser les CTCs en tant que biomarqueur prédictif de l'évaluation radiologique restent insuffisantes.

Tol *et coll*. se sont intéressés aux CTCs en tant que biomarqueur précoce. Les prélèvements sanguins étaient réalisés à S1 – S2, pour la prédiction de la maladie progressive à S9 selon les critères RECIST 1.1. Les performances diagnostiques obtenues étaient insuffisantes et donc d'un impact en pratique clinique faible. La sensibilité était de 20 % exposant un grand nombre de patients parmi ceux présentant une maladie progressive à un risque de faux négatif (53).

Une des limites de l'utilisation des CTCs vient de la méthode de détection. Le système CellSearch® est la seule technique standardisée et approuvée mais il reste très couteux. Les autres techniques disponibles ou en développement manquent de standardisation.

Aussi, les plages étroites de variation du nombre de CTCs / 7,5 mL (< ou ≥ 3 / 7,5 mL) limitent sa valeur prédictive en tant que biomarqueur dans le cadre d'un monitoring de la réponse tumorale nécessitant des dosages répétés (53,54).

Tableau 2: Principales études ayant étudié la valeur pronostique / prédictive des CTC dans le CCRm.

Auteurs Année	Effectif	Traitement	Méthode de détection	Valeur seuil	Evaluation réponse	Timing Prélèvement	Valeur prédictive / pronostique
Cohen *et coll*. 2006 (51)	n = 50	Thérapie Systémique	Immunicon CellPrep™ MF	NA	S6 – S10 RECIST	S0 = Inclusion S6 – S10	Non RO : + 6,7 CTC / 7,5mL RO : + 0,2 CTC / 7,5mL p = 0,001
Cohen *et coll*. 2008 (54)	n = 430	1re / 2ème ligne Ou 3ème ligne + anti EGFR	Cell-search®	≥ 3 CTC/7,5mL	NA	S0 = Inclusion S3 – S5	A S0 : Haut vs Bas : SSP : 4,5 vs 7,9 mois ; RR = 1,74 ; p = 0,0002 SG : 9,4 vs 18,5 mois ; RR = 2,45 ; p < 0,0001 Conversion Haut S0 – Bas S3 – S5 vs Haut S0 et S3 – S5 : SSP : 6,2 vs 1,6 mois ; p = 0,02 SG : 11 vs 3,7 mois ; p < 0,0002
Tol *et coll*. 2010 (53)	n = 467	Essai CAIRO2 1re ligne (5FU + Oxaliplatine + Bevacizumab +/- Cetuximab)	Cell-search®	≥ 3 CTC/7,5mL	S9 RECIST	S0 = Inclusion S1 – S2	A S0 : Haut vs Bas : SSP : 8,1 vs 10,5mois ; RR = 1,5 ; p = 0,0003 SG : 13,7 vs 22 mois ; RR = 2,2 ; p < 0,0001 Performances pour la prédiction de la PD : S0 : Se = 16,7 % [IC95 % 4 – 41] ; Sp = 70,1 % [IC95 % 65 – 75] S1-S2 : Se = 20 % [IC95 % 6 – 44] et Sp = 95,1 % [IC95 % 92 – 97]
Barbazan *et coll*. 2014 (55)	n = 50	CT de 1re ligne	CELLection ™ TaqMan®	Haut : > Percentile à 75 % Bas : < Percentile à 75 %	M3 RECIST	S0 = Inclusion S4 S16 (confirmation)	A S0 : Haut vs Bas : SSP : 6,3 vs 12,7mois ; p = 0,0003 SG : 12,7 vs 24,2 mois ; p = 0,044 CTC : Non répondeurs vs répondeurs (S4 et S16) : SSP : 6,6 vs 12,7 mois ; p = 0,004 SG : 13,1 vs 24,3 mois ; p = 0,007
Souza e Silva *et coll*. 2016 (56)	n = 54	CT + Thérapie ciblée	ISET®	CTC1 (+) > 2CTC/mL CTC2 (+) > 3CTC/mL	/ 2 à 4 mois RECIST	Inclusion = CTC1 M2 = CTC2	SSP : CTC1 (+) / CTC2 (-) 14,7 mois vs CTC1 (-) / CTC2 (+) 6,9 mois ; p = 0,06CTC progression > non progression ; p = 0,04

CT : Chimiothérapie ; MF : microscopie à fluorescence ; RO : Réponse Objective ; CTC : Cellule tumorale circulante ; SSP : Survie sans progression ; vs : versus ; RR : Risque relatif ; SG : Survie globale ; PD : Maladie progressive ; Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; ISET : Isolation by size of tumor ; S6 : Semaine 6 ; M3 : 3 mois.

III. ADN Circulant

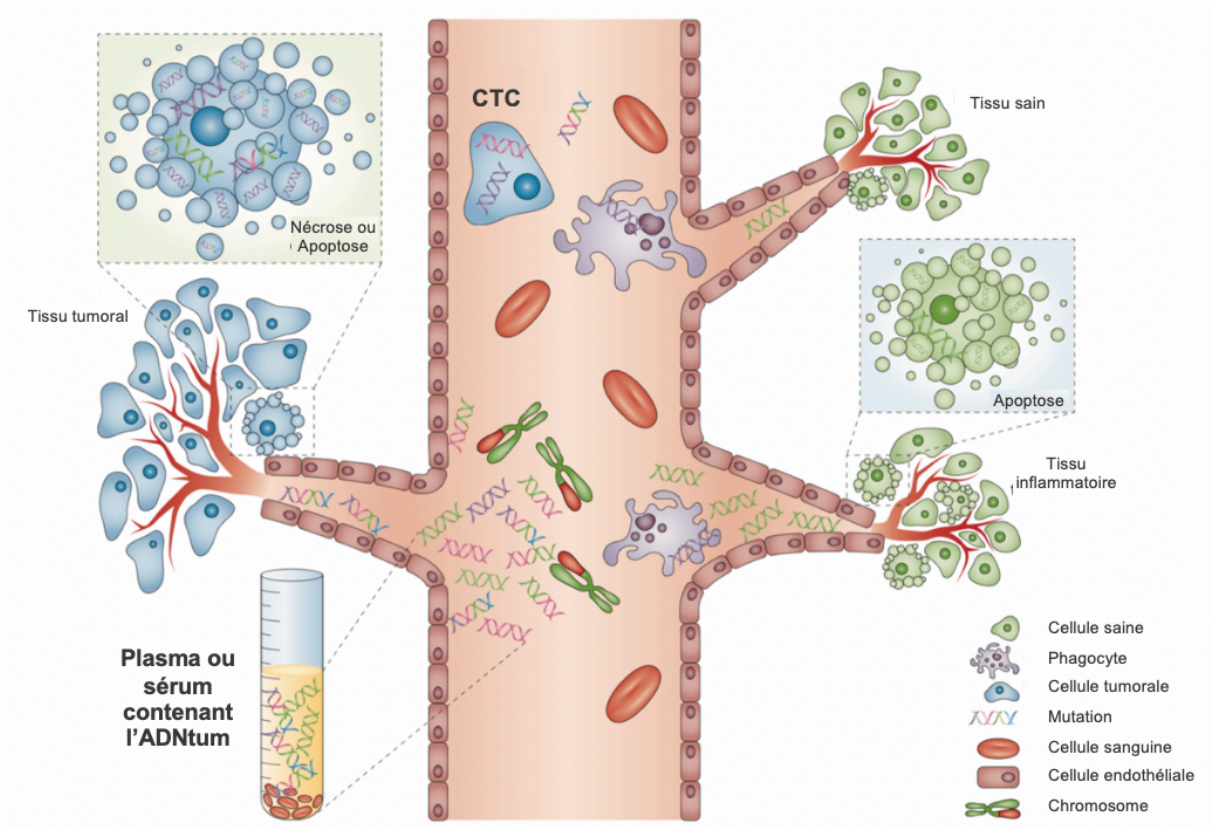
a. Généralités

L'ADN circulant correspond à des molécules d'ADN fragmentées, présentes dans la composante non cellulaire du sang sous forme de fragments double brin. Un pic de concentration d'ADN a été identifié par séquençage entre 150 et 200 paires de bases associé au nucléosome suggérant une origine apoptotique (57). Il a été mis en évidence des fragments beaucoup plus longs (> 1000 paires de bases) suggérant une libération par nécrose avec un processus de dégradation plus aléatoire. L'ADN tumoral est une partie de l'ADN circulant dont la fraction peut varier de < 0,1 % à > 90 % (57). L'ADN tumoral (ADNtum) est identifié au sein de l'ADN total circulant (ADNtot) via des mutations, des altérations du nombre de copies du gène, ou encore via des séquences de méthylation de l'ADN (57).

Il a été décrit pour la première fois par Mandel et Metais en 1948. Son application clinique en oncologie n'a été appréciée qu'en 1977 par Leon *et coll.* qui l'ont retrouvé à des niveaux plus élevés chez les patients atteints de cancer par rapport à des témoins sains. Ils ont mis en évidence une corrélation entre la concentration en ADN circulant et le stade tumoral ainsi qu'une évolution de cette concentration sous traitement (58).

L'ADN circulant est libéré par des mécanismes de sécrétion active, de nécrose ou d'apoptose cellulaire au niveau du tissu tumoral (primitif ou métastatique) ou des cellules tumorales circulantes (59). Ces mécanismes sont illustrés par la Figure 5. En conditions physiologiques normales, sa clairance a lieu au niveau du foie, des reins et de la rate de manière rapide entrainant une demi vie courte ≤ une heure (60). Chez le sujet témoin, sain, l'ADN circulant est habituellement détecté dans le plasma à de faibles concentrations (environ 10 à 15 ng/mL) (58). Sa concentration peut néanmoins s'élever dans certaines situations de stress en dehors des phénomènes néoplasiques comme en cas d'exercice physique, d'inflammation ou de chirurgie (57). Chez les patients atteints d'un cancer, les concentrations d'ADN circulant et d'ADN tumoral sont habituellement supérieures à celles des sujets témoins et augmentent de manière parallèle au stade néoplasique (58,61,62). Les mécanismes à l'origine d'un relargage « excessif » restent largement incompris mais l'ensemble des travaux publiés jusqu'à présent s'accordent pour indiquer qu'il existe une corrélation assez nette entre la concentration et le pronostic. Autrement dit, plus la concentration augmente et plus le pronostic devient péjoratif (63).

Figure 5 : Origine de l'ADN circulant et de l'ADN tumoral circulant, modifiée d'après Crowley *et coll*. (59).



b. Conditions pré-analytiques et analytiques

Les principales difficultés de détection sont liées à la faible fraction d'ADN tumoral circulante et à sa demi vie courte. Les grandes étapes de la détection sont les suivantes :

- Étape pré analytique :

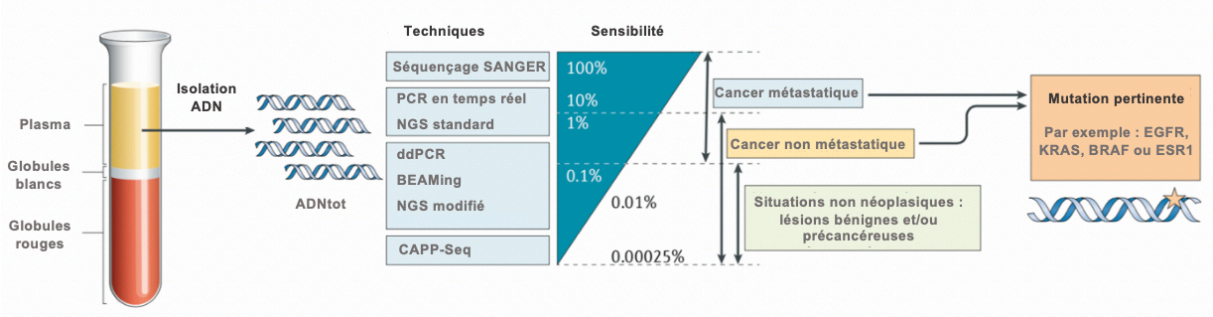
Le prélèvement doit se faire sur un tube EDTA et la détection préférentiellement sur le plasma. Il a été démontré la supériorité de l'EDTA par rapport aux autres anticoagulants (héparine, citrate). L'héparine inhibe la réaction de PCR et ne doit pas être utilisée (64). Le plasma induit une contamination moindre de l'ADN circulant par l'ADN génomique. Ainsi, plusieurs travaux ont montré des concentrations d'ADN circulant plus élevées dans le sérum que dans le plasma mais, cette élévation proviendrait d'une contamination par de l'ADN leucocytaire libéré suite à la lyse des leucocytes dans les tubes de prélèvements liée au processus de coagulation (64). Il est possible d'utiliser des tubes spécifiques pour l'analyse de l'ADN circulant, ceux-ci contiennent des fixateurs pouvant stabiliser à la fois l'ADN circulant et les cellules sanguines intactes, ce qui permet d'éviter la contamination par leur ADN

génomique pendant 7 à 14 jours à température ambiante. Cela permet de constituer des lots provenant de prélèvements multicentriques tout en centralisant le conditionnement des échantillons. Le prélèvement doit être centrifugé dans un délai ≤ 4 heures suivant le recueil. Le plasma centrifugé est ensuite aliquoté afin d'éviter d'effectuer par la suite plusieurs séquences de décongélations - congélations. L'extraction d'ADN se fait en utilisant des kits spécifiques (exemple : QIAGEN, QIAmp circulating nucleic acid kit) basés sur l'enrichissement en courts fragments d'ADN caractéristiques de l'ADN circulant.

- Étape analytique :

La distinction entre l'ADN tumoral et l'ADN génomique se fait via la détection de mutations somatiques présentes uniquement dans le génome des cellules cancéreuses. Il existe plusieurs méthodes ultra sensibles de détection de ces altérations génétiques décrites dans la Figure 6 (65).

Figure 6 : Sensibilité des méthodes de détection des altérations génétiques et conditions d'applications, modifiée d'après Pantel *et coll*. (50).



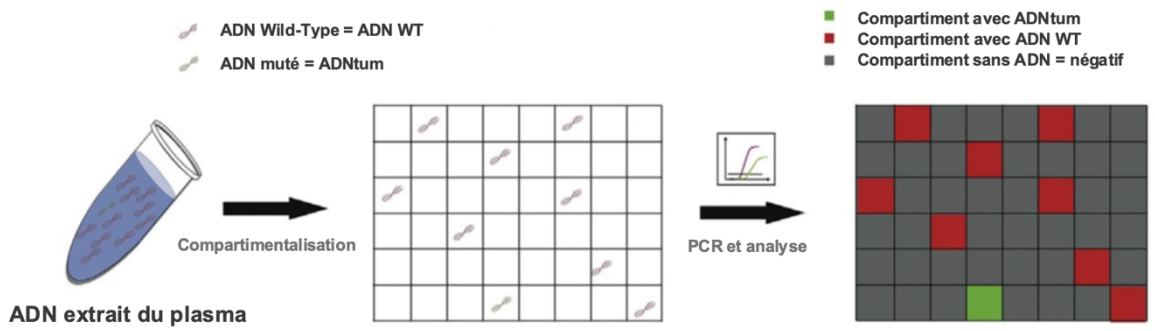
ADNtot: AND total circulant; PCR: Polymerase Chain Reaction; NGS: next-generation sequencing; ddPCR: droplet digital PCR; BEAMing: Beads Emulsion Amplification Magnetics; CAPP-Seq: cancer personalized profiling by deep sequencing.

Ainsi, la détection peut se faire en se basant sur des altérations génétiques identifiées au préalable dans le tissu tumoral, c'est le cas de la PCR digitale (dPCR) et la PCR spécifique d'allèle. Elle peut aussi se faire en se basant sur des altérations génétiques du tissu tumoral non identifiées au préalable grâce au séquençage à haut débit (NGS) ou à la COLD-PCR.

Nous ne détaillerons que la méthode choisie dans cette étude qui est la dPCR dont le principe est décrit dans la Figure 7. Un échantillon d'ADN est partitionné en des milliers de compartiments distincts qui se comportent ensuite comme des réacteurs de PCR indépendants. Si la cible contient la mutation recherchée, elle est amplifiée et détectée de manière binaire :

« 0 » ou « 1 », par le lecteur de fluorescence. La loi de Poisson est ensuite appliquée pour estimer le nombre de mutations présentes dans l'échantillon de départ. Cette méthode a l'avantage d'être rapide et peu couteuse. Elle présente une sensibilité élevée pour la détection d'évènements rares et minoritaires ce qui correspond à l'ADN tumoral dont la fraction détectée est décrite < à 0,001 % (66). Elle est limitée par la nécessité de connaitre la mutation au préalable et de ne pouvoir détecter que des mutations uniques. Les mutations de la voie RAS (KRAS, NRAS) et BRAF ne sont présentes que chez 50 à 60 % et 5 à 10 % des patients atteints de CCR, respectivement (67,68).

Figure 7 : Principe de la dPCR, modifiée d'après Perkins *et coll.* (66).



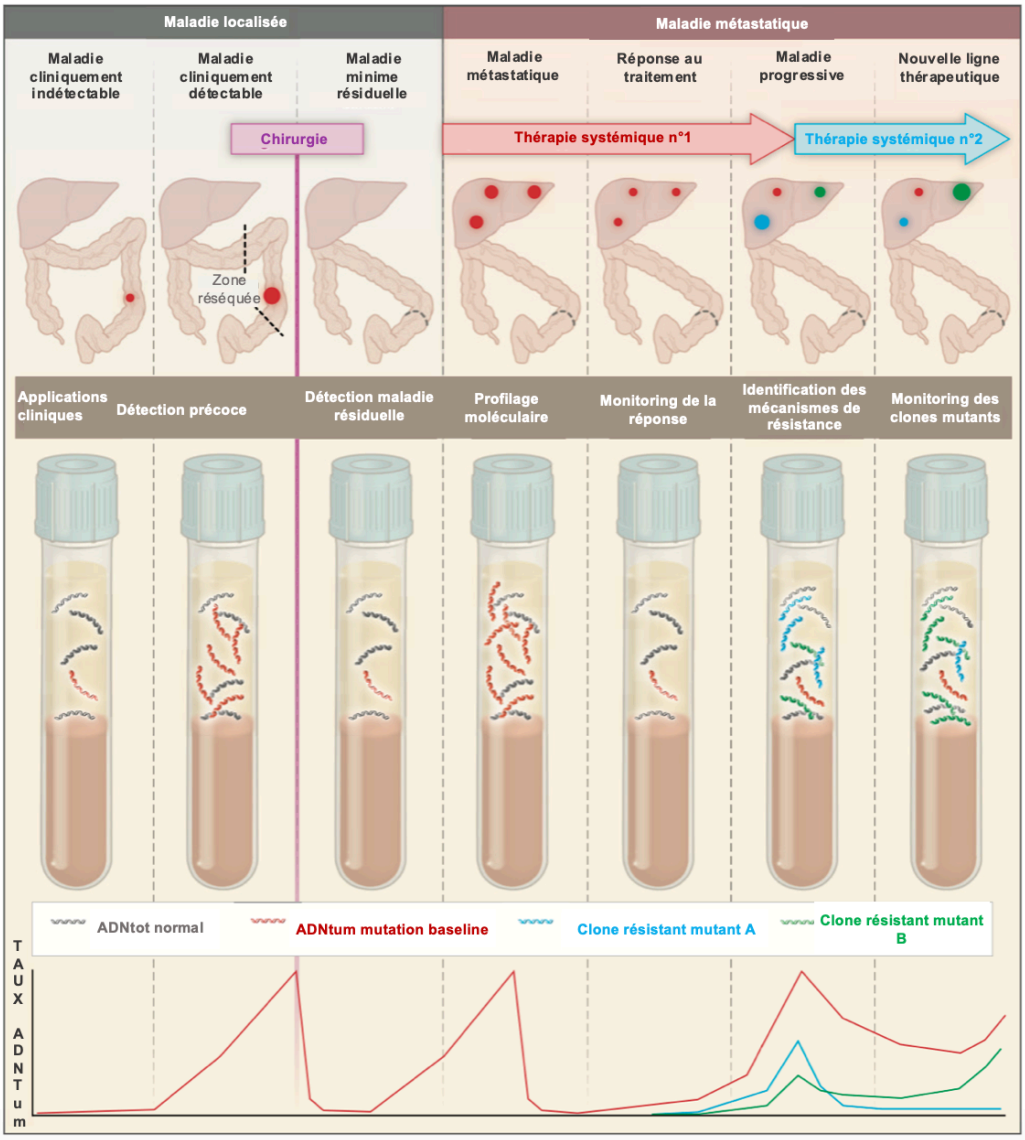
c. Intérêt clinique

i. Généralités

L'analyse de l'ADN circulant est une technique prometteuse permettant d'envisager une gestion simple, personnalisée et en temps réel du cancer. Son intérêt clinique potentiel intervient à chaque stade de la maladie cancéreuse et est résumé dans la Figure 8. Comme nous l'avons précédemment décrit, son dosage s'effectue sur un prélèvement sanguin de routine, c'est le principe de la « biopsie liquide » qui contraste avec les biopsies tissulaires invasives. Ainsi, il permettrait le diagnostic de la maladie tumorale, y compris au stade infra clinique. Il est particulièrement prometteur pour le diagnostic de maladie résiduelle minime après chirurgie curative, permettant d'envisager une meilleure sélection des patients pour lesquels une chimiothérapie adjuvante serait indiquée. Il présente également un potentiel théranostique en permettant de réaliser le profilage moléculaire tumoral des mutations prédictives de résistance aux thérapies ciblées (ex : anti EGFR) en s'affranchissant des limites techniques de la biopsie tissulaire telles que l'épuisement du matériel tumoral. Aussi, la biopsie tissulaire est unique et

n'intéresse qu'une zone tumorale limitée. L'ADN circulant permettrait de détecter l'hétérogénéité tumorale des mutations acquises en cours de traitement, souvent secondaires à l'émergence d'un clone mutant. Il permettrait aussi de saisir l'hétérogénéité inter métastatique. Les métastases ont généralement des profils moléculaires distincts (60). Il a été décrit que l'ADN circulant serait un bon reflet de la charge tumorale et donc une bonne méthode de monitoring sous traitement. Ainsi, dans le CCRm le taux initial d'ADN total circulant s'est avéré être un facteur prédictif de la SSP et un facteur pronostique quant à la SG (69).

Figure 8 : Applications cliniques du dosage de l'ADN circulant en cancérologie, modifiée d'après Corcoran *et coll*. (57).



ADNtot: ADN total circulant; ADNtum: ADN tumoral circulant.

ii. Place actuelle dans le monitoring en oncologie

1. Hors CCRm

De nombreux travaux ont étudié la place de l'ADNtot et de l'ADNtum circulant dans le monitoring des maladies métastatiques en cours de traitement. Ces études sont en majorité rétrospectives, hétérogènes au niveau de leur méthodologie et dans le recrutement des patients. Plusieurs éléments restent en suspens, ainsi, le timing idéal entre les prélèvements destinés à la quantification de l'ADN, la cible moléculaire (ADNtot ou ADNtum) et le seuil permettant de classer les patients répondeurs et/ou en progression n'est pas clairement identifié. Les résultats des principales études sont résumés de manière non exhaustive dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Principales études ayant étudié la valeur pronostique / prédictive de l'ADN circulant en cancérologie (hors CCRm).

Auteur Année	**Effectif**	**Traitement**	**Méthode détection**	**Cible moléculaire**	**Seuil**	**Timing**	**Résultats**
				Cancer Bronchique Non à Petites Cellules			
Marchetti *et coll*. 2015 (70)	n = 69	TRIGGER trial Phase II - Erlotinib	Cobas® PCR en temps réel	*EGFR*	↓ SQI > 50 %	Inclusion J 14	RO (RECIST) à J14 : ↓ SQI > 50 % : 59,1 % +/- 1,8 % ↓ SQI < 50 % : 18,3 % +/- 3,7 % p < 0,0001
Mok *et coll*. 2015 (71)	n = 122	CT 1ère ligne ± Erlotinib	PCR spécifique d'allèle	*EGFR*	NA	Inclusion = T_0 C3	SSP, (ADNtum T_0+/C3+ vs T_0+/C3-) : 7,2 mois vs 12 mois ; HR 0,32 ; [IC95 % : 0,21 – 0,48] p < 0,0001 SG, (ADNtum T_0+/C3+ vs T_0+/C3-) : 18,2 mois vs 31,9 mois HR 0,51 ; [IC95 % : 0,31 – 0,84] p = 0,0066
Lee *et coll*. 2016 (72)	n = 81	Inhibiteurs TKI de l'EGFR	dPCR	*EGFR*	NA	Inclusion / 8 semaines	SSP, ADNtot – vs + : 10,1 mois vs 6,3 mois ; HR 3,88 ; [IC95 % : 1,48 – 10,19] p = 0,006 SG, ADNtot – vs + : 23,7 mois vs 11,2 mois ; HR 5,97 ; [IC95 % : 2,04 – 17,47] p = 0,001
Goldberg *et coll*. 2018 (73)	n = 28	Immunothérapie	NGS	*NA*	Réponse : ↓ ADNtum > 50 %	Inclusion / 2 semaines	Concordance entre réponse ADNtum et RECIST (S6-S12) : *k* = 0,753 ; [IC95 % : 0,501 – 1] ; p < 0,001 Réponse, délai médian : ADNtum = 24,5 jours vs RECIST 72,5 jours
Raja *et coll*. 2018 (74)	n = 28	Durvalumab	NGS	*TP53*, *PIK3CA*, *EGFR*	NA	Inclusion S6	ΔFA ADNtum moyenne et RO : - 2,7 % (p = 0,005)
Taus *et coll*. 2018 (75)	n = 25	Hétérogène	dPCR BEAMing	*EGFR*	NA	Inclusion NA	RO (RECIST) à S8-S9: Δ FA moyenne = - 88,2 %
Giroux Leprieur *et coll*. 2018 (76)	n = 15	Nivolumab > 1ère ligne	NGS	*NA*	↓ ADNtum < 30 %	Inclusion M2	Absence de RO (RECIST M2) : Se = 70 % ; Sp = 100 % ; VPP = 100 % ; VPN = 62,5 %

Mélanome							
Schreuer *et coll*. 2016 (77)	n = 36	Inhibiteur de BRAF et MEK	qPCR	*BRAF*	NA	Inclusion /2 semaines	↑ ADN et PD : Se = 70 % ; Sp = 100 % ↑ ADN avant la PD : Dans le mois : 12/19 (63 %) ; p < 0,001 Dans les 2 mois : 19/19 (100 %) ; p< 0,001
Xi *et coll*. 2016 (78)	n = 39	Hétérogène	PCR en temps réel	*BRAF*	Pic (P) = ↑ ≥ 100 % Clairance (C) = (-) 2 fois à 30 jours	Inclusion S0 – S2 M1	(P + C) vs [(P + non C) ou (non P)] : Corrélation à la RO selon RECIST, p = 0,0001
Lee *et coll*. 2017 (79)	n = 86	Immunothérapie	dPCR	*BRAF* *NRAS* *KIT*	NA	Inclusion Jusque S12	ADNtum – à l'inclusion ou – avant S5-S8 et RO à S12 : Se = 79 %, Sp = 94 %, VPP = 98 %, VPN = 59 %
Herbreteau *et coll*. 2018 (80)	n = 53	Anti PD1	dPCR	*BRAF* *NRAS*	NA	Inclusion > S16	Diminution au-delà de S16 vs absence de diminution : SSP: HR = 0,03; [IC95 % 0,0002 – 0,31] ; p = 0,001 SG: HR = 0,05; [IC95 % 0,0004 – 0,41] ; p = 0,002
Ovaire							
Capizzi *et coll*. 2008 (81)	n = 22	CT 1ère ligne	qPCR	*hTERT*	14, 5 ng/mL	Inclusion Après C6	Evaluation après C6 : PD et ADNtot élevé : 8/11 (73 %) RO et ADNtot bas : 7/11 (64 %) p = 0,007
Parkinson *et coll*. 2016 (82)	n = 40	Hétérogène	dPCR	*TP53*	↓ FA(TP53) > 60 %	Inclusion Après C1	TTP médian : 230 jours vs 94 jours HR 0,22 ; [IC95 % : 0,09 – 0,52] ; p < 0,001
Sein							
Dawson *et coll*. 2013 (83)	n = 30	NA	dPCR TAm-Seq	*PIK3CA* *TP53*	NA	J0 / J200 / J400 / J600	PD: n = 19 ; ↑ ADNtum (moy x 505) pour 17/19 (89 %) 10/17 : ↑ 5 mois (2 – 9 mois) avant PD
Clatot *et coll*. 2016 (84)	n = 144	Anti aromatases	dPCR	*ESR1*	NA	tPD M0 tPD M-3 tPD M-6	ADNtum (+) à M0, n = 20 ADNtum (+) à M-3 et M-6 = 15/20 (75 %) ADNtum PD > ADNtum M-3 ; p = 0,0087 ADNtum M-3 > ADNtum M-6 ; p = 0, 02

↓ : Diminution ; ↑ : Augmentation ; SQI : Index semi quantitatif ; *k* : Kappa de Cohen ; tPD : Temps de la maladie progressive ; TTP : Durée jusque progression ; RO : Réponse objective ; SSP : Survie sans progression ; ADNtum : ADN tumoral circulant ; HR : Hazard Ratio ; IC 95 % ; Intervalle de confiance à 95 % ; SG : Survie globale ; TKI : Tyrosine Kinase ; dPCR : PCR digitale ; NGS : Next Generation Sequencing ; FA : Fréquence allélique ; Δ : différentiel ; BEAMing: Beads Emulsion Amplification Magnetics ; Se : sensibilité ; Sp : Spécificité ; VPP : Valeur prédictive positive ; VPN : Valeur prédictive négative; qPCR : PCR quantitative ; PD : Maladie progressive; ADNtot : ADN total circulant; TAm-Seq™ : Tagged-Amplicon Deep Sequencing ; moy : moyenne. ; CT : Chimiothérapie.

2. Dans le CCRm

L'intérêt du monitoring de l'ADN circulant en tant que marqueur de la réponse au traitement a été étudié dans le CCRm. Les résultats des principales études sont résumés dans le Tableau 4.

La corrélation entre la variation de l'ADN tumoral (chute ≥ 10 fois) et la réponse radiologique a été décrite pour la première fois par Tie *et coll*. en 2015 alors qu'ils ne mettaient pas en évidence de variation significative du taux d'ACE sur les prélèvements réalisés de manière concomitante (85). Des données similaires ont été mises en évidence dans l'étude PLACOL qui incluait des patients en cours de chimiothérapie de 1ère ou 2nde ligne. Ces patients étaient classés en « bon répondeurs » et « mauvais répondeurs » en fonction de l'évolution du taux de d'ADN tumoral entre le 1er et le 2ème et/ou le 3ème cycle de chimiothérapie. Ceux classés « bons répondeurs » présentaient un taux plus élevé de réponse tumorale objective ($p < 0,001$) (86).

L'impact de la cinétique du taux d'ADN tumoral a été également évalué dans ces travaux. Tie *et coll*. ont montré une tendance à une SSP plus longue chez les patients pour lesquels une chute du taux d'ADN tumoral était observée (85). Cette tendance a été confirmée par l'étude PLACOL (Tableau 4) (86).

Plus récemment, l'étude prospective COCA-COLON a montré que l'ADNtot et l'ADNtum pourraient jouer un rôle en tant que biomarqueurs pour le monitoring sous traitement et un rôle pronostique (Tableau 4) (48).

Ces données suscitent l'intérêt de l'évaluation de l'impact clinique du monitoring de l'ADN tumoral. Notamment en permettant d'identifier précocement les patients non répondeurs au traitement dans le but d'améliorer la SG. Cela pourrait leur permettre de bénéficier d'autres lignes de traitement et de préserver leur qualité de vie en évitant les toxicités importantes et inutiles d'une chimiothérapie inefficace.

Tableau 4 : Principales études ayant étudié la valeur prédictive et/ou pronostique de l'ADN total et/ou tumoral circulant dans le CCRm.

Auteur Année	**Effectif**	**Traitement**	**Méthode détection**	**Cible Moléculaire**	**Seuil**	**Timing ADN**	**Résultats**
Spindler *et coll*. 2014 (87)	n = 105	CT 3ème ligne : Irinotécan + Cetuximab	qPCR	*KRAS* *BRAF*	↓ ADNtot > 50 %	Inclusion C 3	RO à S9 40 % vs 17 %, p = 0,04 ; ↓ Médiane – 27 %
Tie *et coll*. 2015 (85)	n = 42 RO n = 52 SSP	CT 1ère ligne	NGS Safe-Seq	Panel de 15 gènes	↓ ADNtum ≥ 90 %	Inclusion Avant C2	RO S8-10: 14/19 (74 %) vs non RO 8/23 (35 %) OR = 5,25; [IC95 %: 1,38 – 19,93] ; p = 0,016 VPP 65,2 %; VPN 73,7 % SSP : 14,7 mois vs 8,1 mois HR = 1,87 ; [IC95 % : 0,62 – 5,61] ; p = 0,266
Garlan *et coll*. 2017 (86)	n = 82	CT 1ère - 2nde ligne +/- Thérapie ciblée	dPCR	*KRAS*, *BRAF*, *TP53* ; Si - : Hyper-méthylation *WIF1*, NPY	PenteΔADNtum ≥ 80 % et ADNtum ≤ 0,1 ng/mL	Inclusion C2 ou C3	SSP : 8,5 mois vs 2,4 mois HR = 0,19 ; [IC95 % : 0,09 – 0,4] ; p < 0,0001 SG : 27,1 mois vs 11,2 mois HR = 0,25 ; [IC95 % : 0,11 – 0,57] ; p < 0,001
Vidal *et coll*. 2017 (88)	n = 21	CT +/- Thérapie ciblée Naïfs d'anti EGFR	BEAMing	*KRAS* *NRAS*	NA	Inclusion S8-S12	Variation (%) de la FA médiane d'ADNtum et Progression (RECIST) à S8-S12 : + 132 % vs Absence de Progression – 99 % ; p = 0,027
Bidard *et coll*. 2019 (89)	n = 46	CT + Thérapie ciblée	dPCR	*KRAS*	ADNtum : Détection vs non détection	Inclusion S4	Taux de résection hépatique RO/R1 ADNtum + à S4 : 36 % vs ADNtum – à S4 : 85 % p = 0,01
Sefrioui *et coll*. 2019 (48)	n = 192	CT toutes lignes	dPCR	*KRAS* *NRAS* *BRAF*	Pente ADNtum > - 0,73	Inclusion S6	Progression (RECIST) à S12 : 13/35 (37,1 %) vs 6/37 (16,2 %), p = 0,044

CT : Chimiothérapie ; qPCR : PCR quantitative ; ADNtot: AND total circulant; RO: Réponse objective; NGS : Next Generation Sequencing ; Safe-Seq : Safe-sequencing system; ADNtum: AND tumoral circulant; OR: Odds Ratio; IC95 %: Intervalle de confiance à 95 %; VPP: Valeur prédictive positive ; VPN : Valeur prédictive négative ; SSP : Survie sans progression ; HR : Hazard Ratio ; dPCR : PCR digitale ; SG : Survie globale ; BEAMing: Beads Emulsion Amplification Magnetics ; FA : Fréquence allélique

OBJECTIF DE L'ETUDE

Malgré l'optimisation des schémas thérapeutiques avec le développement des thérapies ciblées, le CCR reste, au niveau mondial, le second cancer pour la mortalité. Les taux de survie à 5 ans au stade métastatique sont faibles.

La stratégie thérapeutique est guidée par deux principes : obtenir une efficacité maximale et limiter la toxicité induite par le traitement.

L'évaluation précoce de la réponse thérapeutique est un enjeu majeur. Les recommandations actuelles indiquent de réaliser une TDM TAP tous les 2 à 3 mois interprétée selon les critères RECIST 1.1. Cette méthode d'évaluation comporte plusieurs limites propres à son interprétation précédemment détaillées. En pratique, l'évaluation a lieu après 6 cures de chimiothérapie. Le patient est donc potentiellement exposé durant cette période à des toxicités inutiles induites par un traitement qui ne lui est pas bénéfique.

Ce travail est une analyse préliminaire de l'étude COCA-MACS et son objectif est d'étudier dans une population de patients ayant un CCRm et débutant une première ligne de chimiothérapie systémique ± une thérapie ciblée, les corrélations de trois biomarqueurs : l'ADN total circulant, l'ADN tumoral circulant et l'ACE prélevés avant la première, deuxième, troisième cure et à 3 mois avec l'évaluation de la réponse selon RECIST 1.1. à M3 et les paramètres de survie.

L'objectif principal de l'étude COCA-MACS est d'estimer la sensibilité de la variation précoce, après 2 cycles de chimiothérapie du taux d'ADN total circulant pour la réponse objective à 3 mois définie selon les critères RECIST 1.1.

Les objectifs secondaires de cette étude sont : i) d'estimer la sensibilité de la variation précoce, après 2 cycles de chimiothérapie, du taux d'ADN tumoral circulant et de l'ACE pour la réponse objective à 3 mois définie selon les critères RECIST 1.1 ; ii) d'estimer la sensibilité de la variation rapide, après 1 cycle de chimiothérapie, et tardive, après 6 cycles de chimiothérapie du taux d'ADN total circulant, d'ADN tumoral circulant et d'ACE pour la réponse objective à 3 mois définie selon les critères RECIST 1.1 ; iii) d'estimer la sensibilité de la variation précoce, rapide, et tardive du taux d'ADN total circulant, du taux d'ADN tumoral circulant et de l'ACE pour une réponse à 3 mois > 50% (« super répondeurs ») selon RECIST 1.1. ; iv) d'estimer la spécificité des variations précoces, rapides et tardives de ces marqueurs tumoraux circulants dans l'évaluation de la réponse définie par les critères RECIST 1.1 ; v) : d'étudier la corrélation entre les variations de marqueurs tumoraux circulants et la SSP.

MATERIELS ET METHODES

I. Recrutement des patients

Les patients inclus dans ce travail proviennent de l'étude multicentrique, observationnelle et prospective COCA-MACS (**NCT02872779**) ayant pour objectif d'étudier la corrélation entre les variations précoces des marqueurs tumoraux circulants et la réponse clinique chez les patients traités pour un CCRm. Entre août 2016 et juillet 2019, les patients âgés de 18 ans et plus ayant un adénocarcinome colorectal métastatique histologiquement prouvé et une maladie mesurable selon les critères RECIST 1.1 justifiant une première ligne de chimiothérapie intraveineuse (5FU ± Oxaliplatine ± Irinotécan) ± une thérapie ciblée ont été inclus. Ces patients étaient traités dans trois centres : le Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Rouen, le CHU de Caen et le Centre Hospitalier Intercommunal (CHI) d'Elbeuf-Louviers-Val de Reuil. Ces patients étaient en bon état général, OMS < 3 et naïfs de traitement systémique carcinologique en dehors d'un éventuel traitement adjuvant dans les cas de métastases métachrones.

Des prélèvements sanguins étaient réalisés dans les 24 heures précédant les cycles de chimiothérapie 1, 2, 3 et lors de la visite d'évaluation à 3 mois. Au total, 4 tubes EDTA de 4mL étaient prélevés à chaque séquence de prélèvement : 3 destinés à la recherche de l'ADNtot et l'ADNtum et 1 pour le dosage de l'ACE.

Les mutations dans le tissu tumoral étaient identifiées à l'aide des systèmes Idylla™ KRAS Mutation Test (Biocartis) et Idylla™ NRAS-BRAF Mutation Test (Biocartis). Cette technique basée sur la PCR en temps réel est utilisée en routine dans le laboratoire d'analyse génétique somatique des tumeurs. Elle permet l'identification dans le tissu tumoral des mutations prédictives de la résistance aux anti-EGFR dans le CCRm, concernant les gènes KRAS et NRAS et de rechercher une mutation du gène BRAF.

II. Analyse des biomarqueurs et évaluation de la réponse

a. ACE

Les analyses ont été réalisées au sein du centre ayant inclus le patient. La technique était la même pour les CHU de Rouen et de Caen. La quantification a été faite sur un automate Cobas® 8000 module c602 (Roche) par une méthode immunométrique séquentielle d'éléctrochimiluminescence. Pour le CHI d'Elbeuf-Louviers-Val de Reuil, la quantification a

été faite sur un automate ADVIA Centaur® (Siemens). Un immunodosage basé sur la technologie chimiluminométrique directe a été réalisé. Le seuil ≤ 5 ng/mL était considéré comme normal. Les valeurs < 5 ng/mL ont donc été réajustées à 5 ng/mL.

b. ADN total circulant et ADN tumoral circulant

i. Centrifugation

Les échantillons sanguins dédiés à l'analyse de l'ADN circulant ont été acheminés au sein des laboratoires de chaque centre, respectivement, dans les 3 heures suivant le prélèvement (tube EDTA de 4mL). Une première étape de centrifugation a été réalisée à 1000 g pendant 10 minutes à 4°C, suivie d'une seconde étape de centrifugation du surnageant à 16 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le plasma issu de la deuxième centrifugation a ensuite été aliquoté par échantillon de 1 mL puis les aliquots ont été congelés à - 80°C jusqu'à utilisation. Les cryotubes ont ensuite été acheminés au laboratoire INSERM U1245 de la faculté de médecine et de pharmacie du CHU de Rouen pour la suite des analyses.

ii. Extraction de l'ADN total circulant

Après décongélation du plasma EDTA, l'ADNtot a été extrait de celui-ci à l'aide du kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit ® (QIAGEN). La première étape consistait à ajouter à chaque échantillon de plasma un même volume de protéinase K et de solution tampon contenant du carrier ARN. Après homogénéisation chaque tube a été incubé à 60°C pendant 30 minutes. Une seconde solution tampon (contenant de manière non exhaustive, un détergent non ionique et de l'isopropanol) a été ajoutée au lysat et le mélange a été incubé pendant 5 minutes dans de la glace. Une colonne (QIAamp Mini Column) comportant une membrane de silice et un système de vacuum a été utilisée pour l'étape de purification. Chaque tube contenant l'ADN extrait et purifié a été élué dans un volume de 30 μL puis conservé à -20°C jusqu'à l'étape de quantification.

iii. Quantification de l'ADN total circulant

La détection de l'ADNtot a été réalisée par fluorimétrie par le Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA High Sensitivity (Molecular Probes®) permettant de détecter une quantité d'ADN entre 0,2 et 100 ng. La lecture a été réalisée au moyen du fluorimètre Twinkle LB970 en utilisant le principe de la lecture en répliqua pour chaque prélèvement. Les données ont ensuite été exportées au format Excel via une clé USB pour interprétation après calcul du coefficient de corrélation r^2 validant une gamme étalon en 8 points de fluorescence.

iv. Quantification de l'ADN tumoral circulant

1. Pré-amplification

Une première étape de pré-amplification du fragment d'ADN de la région d'intérêt contenant la mutation *KRAS*, *NRAS* ou *BRAF* a été réalisée pour les échantillons contenant < 3 ng/μl d'ADNtot. L'application correcte de la loi de Poisson lors de la dPCR nécessite que la majorité des gouttelettes contiennent une copie d'ADN, ce qui représente 200 à 2000 copies d'ADN (muté ou non muté) / µL d'échantillon, correspondant à un apport minimal de 30 ng d'ADN. L'apport maximal initial en dPCR est de 10 µL. Les échantillons contenant < 3 ng/μl d'ADNtot apportaient moins de 30 ng/mL d'ADN. Une pré-amplification de 6 cycles de PCR à l'aide de la Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) à partir de 10ng d'ADNtot a été réalisée pour ces échantillons. Le produit de pré-amplification a ensuite été conservé à -20°C jusqu'à l'étape de PCR digitale.

2. ddPCR

La détection de l'ADNtum a été réalisée par Droplet Digital™ PCR (Bio-Rad QX200™). Cette technique partitionne un échantillon de 20 μl contenant 30 ng d'ADNtot ou 4 μL du produit de pré-amplification, un mix réactionnel, le couple d'amorce et les deux sondes TaqMan™ (VIC pour le fragment d'ADN sauvage et FAM pour le fragment muté), en 20 000 gouttelettes de 1 nl. Les gouttelettes ont été transférées manuellement à l'aide d'une pipette multicanaux au sein d'une plaque PCR. L'amplification a ensuite été réalisée via un thermocycleur T100 (Bio-Rad). Le cyclage thermique s'est déroulé en plusieurs étapes : activation de la polymérase à 95 °C pendant 10 minutes, 40 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, puis des phases d'extension à 55 °C pendant 1 minute, puis 98 °C pendant 10 minutes et un refroidissement à 4 °C jusqu'à analyse. La discrimination entre les fragments d'ADN non muté et muté a été réalisée au moyen des deux sondes de fluorescence différentes, VIC et FAM. L'intensité de la fluorescence des fluorochromes VIC et FAM était mesurée par un lecteur au sein de chaque gouttelette. La loi de Poisson était ensuite appliquée pour déterminer la fréquence allélique (FA) d'ADNtum dans chaque échantillon selon la formule :

$$P(X = \kappa) = \frac{\lambda^{\kappa} e^{-\lambda}}{\kappa!}$$

$\boldsymbol{k}$ correspondant au nombre de molécules d'ADN au sein d'un compartiment et $\boldsymbol{\lambda}$ au nombre total de molécules d'ADN sur le nombre total de compartiment.

3. Interprétation des résultats

Les résultats ont été exportés sur une clé USB puis chargés sur le cloud via le logiciel « QuantaSoft™ Analysis Pro Software ». Un seuil de détection a été déterminé pour chaque mutation. La quantification de l'ADNtum a été réalisée pour chacune des mutations mises en évidence à l'inclusion, en suivant le procédé décrit ci-dessus, chez 10 patients témoins sains. Les différents seuils ont été calculés par la formule : (FA moyenne obtenue chez les témoins) +1.645*écart type. Compte tenu de l'apport lors de la pré-amplification de 10 ng d'ADN, la sensibilité maximale en dPCR était de 0,1 %, soit un fragment d'ADN muté parmi 1000 fragments d'ADN sauvages. Ainsi, les seuils de détection < 0,1 % obtenus pour les témoins ont été réajustés à 0,1 %.

c. Évaluation de la réponse

Une évaluation radiologique par TDM TAP de la réponse a été réalisée tous les 3 mois selon les critères RECIST 1.1. La date de la progression radiologique a été collectée.

III. Analyse statistique

L'objectif principal était de déterminer une valeur de variation précoce du taux d'ADN circulant présentant le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité comme marqueur précoce prédictif de la réponse objective au traitement après 3 mois de chimiothérapie.

Pour cette analyse quantitative, des courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) ont été établies pour chaque marqueur circulant aux différents temps de prélèvement, pour chaque variation calculée et pour la cinétique en fonction de l'évaluation à M3 (3 mois) : RO versus non RO et PD versus non PD. Les différentes aires sous la courbe (AUC) ont été mesurées et les indices de Youden et l'Overall Acuracy (OA) ont été calculés. Les courbes ROC étaient considérées comme discriminantes quand l'AUC était > 0,7. Le seuil le plus discriminant était ensuite identifié via l'indice de Youden et l'OA. En cas de discordance, celui ayant la meilleure sensibilité était retenu. Dans les cas où l'AUC était < 0,7, la courbe ROC était considérée comme insuffisamment discriminante et la valeur médiane du dosage ou calcul correspondant était retenue comme seuil. Pour chaque biomarqueur, la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative était calculée pour chaque seuil déterminé pour le dosage à C1 (inclusion), chaque variation et la cinétique C1-C2-C3 (inclusion, 2ème et 3ème cure). Pour cet objectif il était nécessaire d'inclure un total de 74 patients, pour un nombre de patients non répondeurs attendu de 29, permettant d'établir un intervalle de

confiance à 95 % pour la spécificité. Les associations qualitatives des biomarqueurs avec la RO versus non RO et la PD versus non PD ont été déterminées par le test du Chi^2 ou par le test exact de Fischer, le cas échéant.

Les analyses de survie ont été effectuées selon la méthode de Kaplan-Meier et les courbes de SPP et de SG ont été comparées par le test du log-rank. La SSP était définie par le temps entre l'inclusion et la première progression radiologique observée selon les critères RECIST 1.1. La SG était définie comme le temps entre l'inclusion et le décès, toutes causes confondues. Les patients n'ayant pas présenté ces évènements ont été censurés à la dernière date du suivi. Les statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel de statistiques StatView®.

Pour l'ensemble des analyses les valeurs p bilatérales $\leq 0{,}05$ étaient considérées comme significatives.

RESULTATS

I. Caractéristiques de la population

Entre juillet 2016 et février 2019, un total de 70 patients a été inclus dans l'analyse. La majorité était de sexe masculin (58,6 %). L'âge médian était de 67 ans (27 – 84 ans). Le statut OMS était de 0 ou 1 pour 61/70 (87,1 %) patients. La tumeur primitive était rectale pour 18/70 patients (25,7 %), colique gauche pour 29/70 (41,4 %) et colique droite pour 23/70 (32,9 %). Les patients ont reçu en 1ère ligne pour leur CCRm : une bi-chimiothérapie pour 48/70 (68,6 %), une tri-chimiothérapie pour 14/70 (20 %) et une mono-chimiothérapie pour 8/70 (11,4 %). Une thérapie ciblée (anti-VEGF ou anti-EGFR) a été ajoutée à la chimiothérapie chez 46/70 (65,7 %) patients. Aucun patient (0/58) avec un phénotype RER connu ne présentait d'instabilité micro satellitaire. Dans le tissu tumoral, une mutation du gène RAS ou BRAF a été identifiée chez 38 (55,9 %) et 7 (10,3 %) patients, respectivement. Le délai médian de réalisation de la première évaluation radiologique était de 2,6 mois (1,6 – 4,2 mois). Le nombre médian de cures réalisées au moment de l'évaluation était de 5,5 (1 – 8) cures. Le suivi médian était de 12,9 mois (1,1 – 36,5 mois). La SSP et la SG médiane étaient respectivement de 9,2 mois (1,1 – 34 mois) et 27,1 mois (1,1 – 36,5 mois). Les caractéristiques principales des patients sont résumées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Caractéristiques de la population.

	n = (%)		n = (%)
Centre d'inclusion, n =70		*Métastases pulmonaires, n =70*	
Rouen	48 (68,6 %)	Non	44 (62,9 %)
Elbeuf	18 (25,7 %)	Oui	26 (37,1 %)
Caen	4 (5,7 %)		
Sexe, n =70		*Carcinose péritonéale, n =70*	
Féminin	29 (41,4 %)	Non	57 (81,4 %)
Masculin	41 (58,6 %)	Oui	13 (18,6 %)
OMS, n =70		*Schéma de CT, n =70*	
0	22 (31,4 %)	Mono-CT	8 (11,4 %)
1	39 (55,7 %)	Bi-CT	48 (68,6 %)
2	9 (12,9 %)	Tri-CT	14 (20 %)
Synchrone vs Métachrone, n =70		*Thérapie ciblée, n =70*	
Synchrone	60 (85,7 %)	Non	24 (34,3 %)
Métachrone	10 (14,3 %)	Anti VEGF	37 (52,9 %)
		Anti EGFR	9 (12,8 %)
Chirurgie du primitif, n =70		*RAS/BRAF, n =68*	
Non	33 (47,1 %)	WT	23 (33,8 %)
Oui	37 (52,9 %)	RAS muté	38 (55,9 %)
		BRAF muté	7 (10,3 %)
Localisation du primitif, n =70		*Evaluation M3, n =70*	
Rectum	18 (25,7 %)	RC	1 (1,4 %)
Colon gauche	29 (41,4 %)	RP	22 (31,4 %)
Colon droit	23 (32,9 %)	S	34 (48,6 %)
		PD	13 (18,6 %)
Nombre de site M+, n =70		*M3 RO vs non RO, n =70*	
1	31 (44,3 %)		
2	23 (32,9 %)	Non RO	47 (67,1 %)
3	14 (20 %)	RO	23 (32,9 %)
4	2 (2,8 %)		
Métastases hépatiques, n =70		*M3 PD vs non PD, n =70*	
Non	6 (8,6 %)	Non PD	57 (81,4 %)
Oui	64 (91,4 %)	PD	13 (18,6 %)

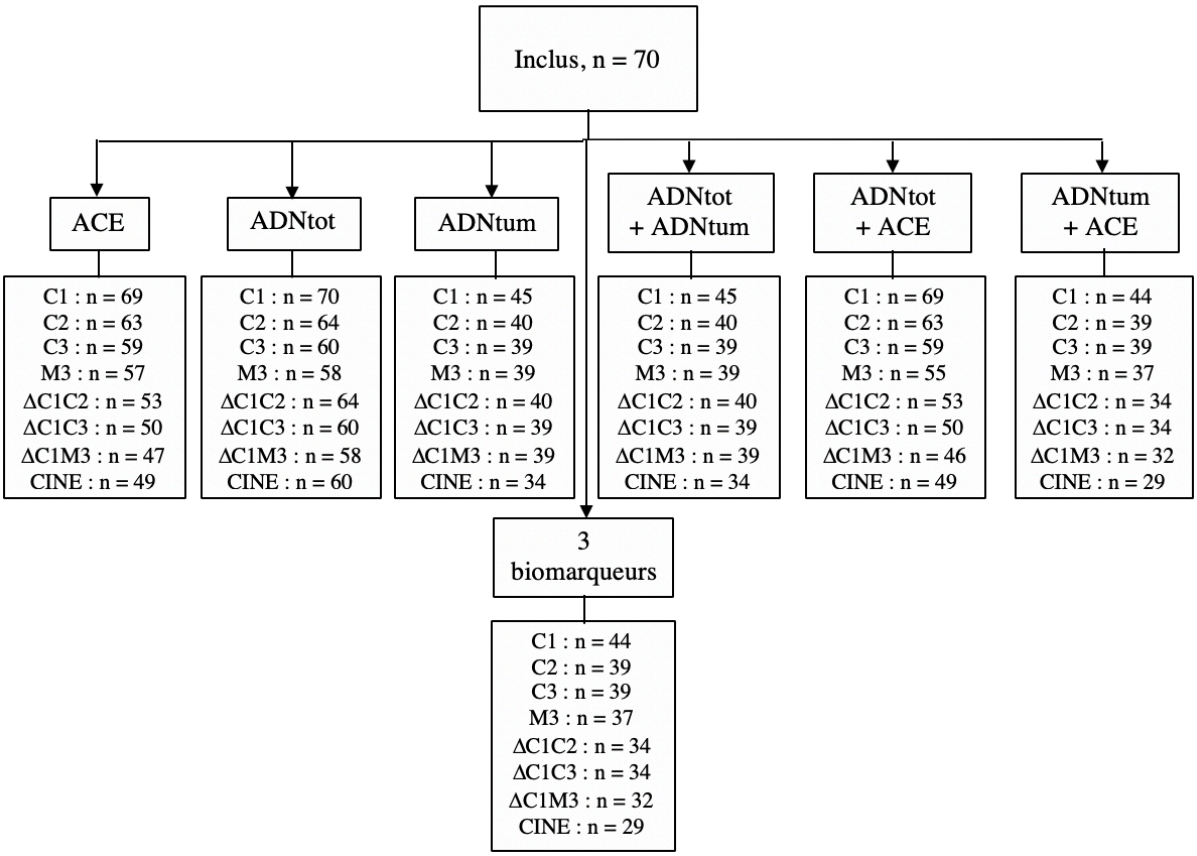
M+ : Métastatiques ; CT : Chimiothérapie ; WT : Wild Type ; RC : Réponse complète ; RP : Réponse partielle ; SD : maladie stable ; PD : Maladie progressive ; RO : Réponse objective

II. Caractéristiques des biomarqueurs

a. Caractéristiques générales

Le flow-chart de l'étude détaillant le nombre d'échantillons disponibles pour chaque prélèvement est indiqué dans la Figure 9. Les valeurs médianes des marqueurs circulants prélevés à chaque temps de l'étude et les données médianes de leurs variations et de leur cinétique sont indiquées dans le Tableau 6.

Figure 9 : Flow Chart de l'étude.



C1: Inclusion; C2: 2ème cure; C3; 3ème cure; M3: 3 mois; ΔC1C2: variation entre C1 et C2 ; ΔC1C3: variation entre C1 et C3 ; ΔC1M3: variation entre C1 et M3 ; CINE : Cinétique C1-C2-C3 ; ADNtot : ADN total circulant ; ADNtum : ADN tumoral circulant.

Tableau 6 : Valeurs médianes des marqueurs circulants à C1, C2, C3 et M3, de leurs variations et de leur cinétique.

	ADNtot	ADNtum (FA)	ACE
Inclusion = C1			
Médiane	33,9 ng/mL	8,7 %	49,7 ng/mL
(Extrêmes)	(6,2 – 1075,4)	(0,1 ; 78,9 %)	(5,0 – 6827,0)
C2			
Médiane	26,3 ng/mL	2,6 %	39,6 ng/mL
(Extrêmes)	(7,9 – 1362,2)	(0,1 ; 75,7 %)	(5,0 – 6844,0)
C3			
Médiane	24,9 ng/mL	0,8 %	40,0 ng/mL
(Extrêmes)	(9,1 – 714,0)	(0,1 ; 32,0 %)	(5,0 – 3813,0)
M3			
Médiane	25,9 ng/mL	0,1 %	14,1 ng/mL
(Extrêmes)	(8,7 – 201,6)	(0,1 ; 14,9 %)	(5,0 – 3209,0)
Δ C1 – C2			
Médiane	- 14,3 %	- 63,0 %	- 8,4 %
(Extrêmes)	(-95,1 ; +501,2 %)	(-99,0 ; +2640,0 %)	(-66,7 ; +355,1 %)
Δ C1 – C3			
Médiane	- 26,1 %	- 87,4 %	- 21,1 %
(Extrêmes)	(-98,5 ; +3262,5 %)	(-99,6 ; +480,0 %)	(-87,3 ; +246,3 %)
Δ C1 – M3			
Médiane	- 16,3 %	- 96,3 %	- 62,7 %
(Extrêmes)	(-97,9 ; +884,1 %)	(-99,7 ; +9,6 %)	(-98,4 ; +241,4 %)
Cinétique C1-C2-C3			
Médiane	- 0,150	- 0,958	- 0,130
(Extrêmes)	(-2,12 ; 1,76)	(-2,75 ; 0,88)	(-1,03 ; 0,62)

FA: Fréquence allélique.

Parmi les patients présentant une mutation BRAF ou RAS identifiée dans le tissu tumoral, 39/45 (86,7 %) avaient un taux initial d'ADNtum détectable. Les taux de détection par mutations respectives identifiées au niveau tissulaire sont détaillés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Taux de détection de l'ADNtum plasmatique à l'inclusion par mutation tissulaire.

Statut mutationnel tissulaire	Détection ADN tumoral plasmatique à C1 n (%)
TOTAL	**39/45 (86,7 %)**
BRAF	**5/7 (71,4 %)**
p.V600E, exon 15, c.1799T>A	5/7 (71,4 %)
RAS	**34/38 (89,5 %)**
KRAS, exon 2, c.35G>A	10/10 (100 %)
KRAS, exon 2, c.35G>T	8/9 (88,9 %)
KRAS, exon 2, c.38G>A	6/8 (75 %)
KRAS, exon 4, c.436G>A	3/3 (100 %)
KRAS, exon 3, c.181C>A	2/2 (100 %)
KRAS, exon 2, c.35G>C	2/2 (100 %)
KRAS, exon 2, c.34G>T	0/1 (0 %)
KRAS, exon 2, c.64C>A	1/1 (100 %)
NRAS, exon 2, c.35G>A	1/1 (100 %)
KRAS, exon 2, c.34G>A	1/1 (100 %)

b. Corrélations clinico biologiques (hors évaluation à M3)

i. Corrélations cliniques à l'inclusion (= C1)

Les taux moyens d'ADNtot, d'ADNtum et d'ACE à C1 étaient significativement plus bas pour les patients ayant un statut OMS initial à 0 par rapport à ceux ayant un statut OMS à 2 (p = 0,007, p = 0,020 et p = 0,004, respectivement). Les taux moyens d'ADNtot et d'ACE étaient également significativement plus bas pour les patients OMS 1 que pour ceux OMS 2 (p = 0,03 et p = 0,02, respectivement).

La FA d'ADNtum moyenne à C1 était significativement plus élevée chez les patients inclus au CHU de Caen par rapport à ceux inclus au CHU de Rouen (p = 0,0015) et ceux inclus au CHI d'Elbeuf-Louviers-Val de Reuil (p = 0,0002). Les taux moyens d'ACE et d'ADNtot à C1 n'étaient pas significativement différents selon le centre d'inclusion. Les taux d'ADNtot et de FA d'ADNtum à C1 étaient significativement plus élevés chez les patients avec une localisation primitive colique gauche par rapport à ceux avec une localisation rectale (p = 0, 04 et p = 0,03, respectivement). Les taux d'ACE n'étaient pas significativement différents selon la localisation tumorale primitive. Les patients recevant une tri-chimiothérapie avaient une FA d'ADNtum à C1 significativement plus élevée que ceux recevant une mono-chimiothérapie (p = 0,048). Les taux d'ADNtot et d'ACE ne présentaient pas de différence significative selon le schéma de chimiothérapie. Les trois marqueurs circulants ne présentaient pas de taux significativement différents selon le sexe, le caractère métachrone ou synchrone de l'évolution métastatique et le nombre de sites métastatiques.

ii. Corrélations entre ADNtot, ADNtum et ACE à C1

Il existait à l'inclusion une corrélation significative entre les taux d'ADNtot et d'ADNtum (r = 0,5642, p < 0,0001) et entre les taux d'ADNtot et d'ACE (r = 0,3669, p = 0,002) *(Corrélation de Pearson)*. Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre la FA d'ADNtum et les taux d'ACE.

III. Corrélations clinico biologiques et évaluation à M3

a. Corrélations cliniques et évaluation à M3

i. RO versus Non RO

Le nombre de cures de chimiothérapie réalisées au moment de l'évaluation était prédictif de la RO, en moyenne 5,7 cures ont été réalisées pour les patients classés en RO contre 4,7 cures pour ceux classés non RO (p = 0,005). Parmi les patients ayant des métastases ganglionnaires, 11/22 (52,4 %) ont été classés en RO versus 12/49 (24,5 %) de ceux sans métastases ganglionnaires (p = 0,02). Il n'existait aucune corrélation entre la RO et les autres caractéristiques cliniques testées : le centre d'inclusion, le poids, la taille, l'IMC, l'âge, le sexe, le statut OMS, le caractère synchrone ou métachrone de la maladie métastatique, la réalisation ou non d'une chimiothérapie adjuvante dans les cas métachrones, la résection chirurgicale du primitif, la localisation du primitif, le nombre de site métastatiques, la localisation des sites métastatiques : hépatique, pulmonaire ou péritonéale, le type de schéma thérapeutique, le type de thérapie ciblée ou le fait d'avoir un schéma thérapeutique comportant une thérapie ciblée, les statuts RAS / BRAF (combinés ou non), la somme des lésions cibles selon RECIST 1.1. à l'inclusion et le délai de réalisation de la TDM d'évaluation par rapport à la date d'inclusion.

ii. PD versus Non PD

L'âge moyen était associé de manière significative à la PD à M3, il était de 71 ans chez les patients ayant progressé contre 63,4 ans pour ceux n'ayant pas présenté de progression (p = 0,03). Parmi les patients avec un statut OMS à 0 à l'inclusion, 1/ 22 (4,5 %) a été classé en PD à M3 contre 7/39 (18 %) de ceux ayant un statut OMS à 1 et 5/9 (55,6 %) de ceux ayant un statut OMS à 2 (p = 0,004). En moyenne 3,2 cures de chimiothérapie ont été réalisées chez les patients classés en PD contre 5,5 cures pour ceux classés non PD à M3 (p = 0,0002). Parmi les patients ayant reçu une mono ou une bi-chimiothérapie, 13/43 (23,2 %) ont été classés en PD à M3 contre 0/14 (0 %) de ceux ayant reçu une tri-chimiothérapie (p = 0,046). Il n'existait aucune corrélation entre la PD et les autres caractéristiques cliniques testées : le centre d'inclusion, le poids, la taille, l'IMC, le caractère synchrone ou métachrone de la maladie métastatique, la réalisation ou non d'une chimiothérapie adjuvante dans les cas métachrones, la résection du primitif, la localisation du primitif, le nombre de site métastatiques, la localisation des sites métastatiques (hépatique, pulmonaire, péritonéale ou ganglionnaire), le type de combinaison de chimiothérapie, le type de thérapie ciblée ou le fait d'avoir un schéma thérapeutique comportant une thérapie ciblée, les statuts RAS / BRAF (combinés ou non), la somme des lésions cibles

selon RECIST 1.1 à l'inclusion et le délai de réalisation de la TDM d'évaluation par rapport à la date d'inclusion.

b. Corrélations des biomarqueurs et de l'évaluation à M3

i. RO versus Non RO

Des courbes ROC ont été établies pour chaque marqueur circulant aux différents temps de prélèvement, pour chaque variation par rapport à l'inclusion et pour la cinétique entre C1 et C3 en fonction de l'évaluation à M3 : RO versus non RO. Les différentes AUC mesurées ainsi que les indices de Youden et l'Overall Acuracy (OA) sont rapportés dans le Tableau 8. Les seuils retenus pour l'ADNtot, la FA d'ADNtum, l'ACE et leurs performances diagnostiques pour la prédiction de la RO sont rapportés dans les Tableaux 9, 10 et 11, respectivement.

Tableau 8 : Caractéristiques des courbes ROC obtenues pour les marqueurs circulants à C1, C2, C3 et M3, leurs variations et leur cinétique pour la prédiction de la RO à M3.

	ADNtot	**ADNtum (FA)**	**ACE**
Inclusion = C1			
AUC	0,51	0,52	0,48
Youden	0,188	0,246	0,130
OA	0,700	0,800	0,681
C2			
AUC	0,44	0,43	0,50
Youden	0,084	0,233	0,126
OA	0,672	0,750	0,683
C3			
AUC	0,44	0,40	0,49
Youden	0,062	0,031	0,102
OA	0,650	0,744	0,661
M3			
AUC	0,37	0,44	0,40
Youden	0,053	0,028	0,030
OA	0,655	0,744	0,649
Δ C1 – C2			
AUC	0,44	0,31	0,49
Youden	0,113	0,000	0,175
OA	0,688	0,750	0,660
Δ C1 – C3			
AUC	0,38	0,29	0,40
Youden	0,037	0,107	0,066
OA	0,650	0,744	0,660
Δ C1 – M3			
AUC	0,34	0,40	0,26
Youden	0,000	0,217	0,000
OA	0,655	0,744	0,660
Cinétique C1-C2-C3			
AUC	0,38	0,36	0,41
Youden	0,037	0,183	0,074
OA	0,650	0,765	0,653

FA : Fréquence allélique ; AUC : Aire sous la courbe ; OA : Overall Acuracy.

1. ADNtot

Sur le plan quantitatif, les performances diagnostiques pour la prédiction de la RO en fonction des seuils déterminés à C1, pour les variations (en %) entre C1 et C2, C1 et C3, C1 et M3 et pour la cinétique entre C1 et C3 sont rapportées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Valeurs seuils retenues pour le taux d'ADNtot à C1, pour ses variations et sa cinétique avec leurs performances diagnostiques pour la prédiction de la RO à M3.

	Seuils	Sp	Se	VPP	VPN
C1	34,3 ng/mL	0,51	0,48	0,32	0,67
Δ C1 – C2	- 12,8 %	0,50	0,45	0,32	0,64
Δ C1 – C3	- 23,0 %	0,44	0,33	0,24	0,55
Δ C1 – M3	- 13,8 %	0,39	0,25	0,18	0,50
Cinétique C1-C2-C3	- 0,130	0,44	0,33	0,24	0,55

Sp : Spécificité ; Se : Sensibilité ; VPP : Valeur Prédictive Positive ; VPN : Valeur Prédictive négative.

Sur le plan qualitatif, le sens de variation du taux d'ADNtot entre C1-M3 était significativement prédictif de la RO à M3. Le taux d'ADNtot a diminué entre C1-M3 chez 15/32 (46,9 %) patients ayant été classés en RO à M3 contre 5/26 (19,2 %) patients pour lesquels le taux a augmenté ($p = 0,03$). Le sens de variation précoce du taux d'ADNtot entre C1-C2 et C1-C3 n'était pas significativement prédictif de la RO à M3 ($p = 0,40$ et $p = 0,25$, respectivement).

2. ADNtum

Sur le plan quantitatif, les performances diagnostiques pour la prédiction de la RO en fonction des seuils déterminés à C1, pour les variations (en %) entre C1 et C2, C1 et C3 et C1 et M3 et pour la cinétique entre C1 et C3 sont rapportées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Valeurs seuils retenues de FA d'ADNtum à C1, pour ses variations et sa cinétique avec leurs performances diagnostiques pour la prédiction de la RO à M3.

	Seuils	Sp	Se	VPP	VPN
C1	8,7 %	0,50	0,45	0,23	0,74
Δ C1 – C2	- 64,0 %	0,47	0,40	0,20	0,70
Δ C1 – C3	- 87,4 %	0,45	0,30	0,16	0,65
Δ C1 – M3	- 96,3 %	0,52	0,50	0,26	0,75
Cinétique C1-C2-C3	- 1,111	0,46	0,38	0,18	0,71

Sp : Spécificité ; Se : Sensibilité ; VPP : Valeur Prédictive Positive ; VPN : Valeur Prédictive négative.

Sur le plan qualitatif, la positivité ou non de la FA d'ADNtum à chaque temps de prélèvement (C1, C2, C3 et M3) ainsi son sens de variation entre C1 et chaque temps de prélèvement (C2, C3 et M3) n'étaient pas significativement prédictifs de la RO à M3.

3. ACE

Sur le plan quantitatif, les performances diagnostiques pour la prédiction de la RO en fonction des seuils déterminés à C1, pour la variation (en %) entre C1 et C2, C1 et C3 et C1 et M3 et pour la cinétique entre C1 et C3 sont rapportées dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Valeurs seuils retenues pour le taux d'ACE à C1, pour ses variations et sa cinétique avec leurs performances diagnostiques pour la prédiction de la RO à M3.

	Seuils	**Sp**	**Se**	**VPP**	**VPN**
C1	49,7 ng/mL	0,50	0,48	0,32	0,66
Δ C1 – C2	- 8,4 %	0,48	0,44	0,31	0,63
Δ C1 – C3	- 19,0 %	0,52	0,47	0,33	0,65
Δ C1 – M3	- 62,7 %	0,35	0,19	0,13	0,46
Cinétique C1-C2-C3	- 0,130	0,53	0,53	0,38	0,68

Sp : Spécificité ; Se : Sensibilité ; VPP : Valeur Prédictive Positive ; VPN : Valeur Prédictive négative.

Sur le plan qualitatif, le sens de variation du taux d'ACE entre C1 et M3 était significativement prédictif de la RO à M3 : 16/39 (41 %) patients ayant présenté une diminution du taux d'ACE ont été classé en RO versus 0/8 (0 %) de ceux ayant présenté une augmentation ($p = 0,04$). Le sens de variation entre C1-C2 et C1-C3 n'était pas associé significativement à la RO à M3. Un taux d'ACE non élevé ($\leq$ 5 ng/mL) à C1, C2, C3 et M3 n'était pas prédictif de la RO à M3.

ii. PD versus Non PD

De la même manière que pour la RO, des courbes ROC ont été réalisées pour chaque marqueur circulant aux différents temps de prélèvement, pour chaque variation et pour la cinétique entre C1 et C3 en fonction de l'évaluation à M3 : PD versus non PD. Les différentes AUC mesurées ainsi que les indices de Youden et l'Overall Acuracy sont rapportés dans le Tableau 12. Les seuils retenus pour l'ADNtot, la FA d'ADNtum, l'ACE et leurs performances diagnostiques pour la prédiction de la PD sont rapportés dans les Tableaux 13, 14 et 15, respectivement.

Tableau 12 : Caractéristiques des courbes ROC obtenues pour les marqueurs circulants à C1, C2, C3 et M3, leurs variations et leur cinétique pour la prédiction de la PD à M3.

	ADNtot	**ADNtum (FA)**	**ACE**
Inclusion = C1			
AUC	0,80	0,75	0,66
Youden	0,642	0,658	0,482
OA	0,829	0,844	0,812
C2			
AUC	0,69	0,77	0,67
Youden	0,474	0,686	0,491
OA	0,844	0,875	0,841
C3			
AUC	0,68	0,90	0,70
Youden	0,423	0,857	0,442
OA	0,867	0,897	0,881
M3			
AUC	0,62	1	0,82
Youden	0,397	1	0,686
OA	0,897	1	0,912
Δ C1 – C2			
AUC	0,30	0,58	0,56
Youden	0,019	0,486	0,337
OA	0,844	0,875	0,811
Δ C1 – C3			
AUC	0,36	0,63	0,53
Youden	0,087	0,657	0,266
OA	0,867	0,897	0,860
Δ C1 – M3			
AUC	0,30	0,71	0,21
Youden	0,128	0,743	0,000
OA	0,897	0,897	0,872
Cinétique C1-C2-C3			
AUC	0,36	0,67	0,45
Youden	0,087	0,667	0,143
OA	0,867	0,882	0,878

FA : Fréquence allélique ; AUC : Aire sous la courbe ; OA : Overall Acuracy.

1. ADNtot

Sur le plan quantitatif, les performances diagnostiques pour la prédiction de la PD en fonction des seuils déterminés à C1, pour la variation (en %) entre C1-C2, C1-C3 et C1-M3 et pour la cinétique C1-C2-C3 sont rapportées dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Valeurs seuils retenues d'ADNtot à C1 et pour les variations avec leurs performances diagnostiques pour la prédiction de la PD à M3.

	Seuil	Sp	Se	VPP	VPN
C1	38,7 ng/mL*	0,72	0,92	0,43	0,98
Δ C1 – C2	- 12,8 %	0,48	0,30	0,10	0,79
Δ C1 – C3	- 23,0 %	0,48	0,25	0,07	0,81
Δ C1 – M3	- 13,8 %	0,48	0,17	0,04	0,83
Cinétique C1-C2-C3	- 0,130	0,48	0,25	0,07	0,81

* : Valeur seuil obtenue par une courbe ROC présentant une AUC > 0,7.
Sp : Spécificité ; Se : Sensibilité ; VPP : Valeur Prédictive Positive ; VPN : Valeur Prédictive négative.

Sur le plan qualitatif, le sens de variation du taux d'ADNtot entre C1-C2, C1-C3 ou C1-M3 n'était pas significativement prédictif de la PD à M3 ($p = 0,07$, $p = 0,45$ et $p = 0,21$, respectivement).

2. ADNtum

Sur le plan quantitatif, les performances diagnostiques pour la prédiction de la PD en fonction des seuils déterminés à C1, pour la variation (en %) entre C1-C2, C1-C3 et C1-M3 et pour la cinétique entre C1 et C3 sont rapportées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Valeurs seuils retenues de FA d'ADNtum à C1, pour les variations et pour la cinétique avec leurs performances diagnostiques pour la prédiction de la PD à M3.

	Seuil	Sp	Se	VPP	VPN
C1	13,0 %*	0,66	1	0,35	1
Δ C1 – C2	- 61,9 %	0,54	0,60	0,16	0,90
Δ C1 – C3	- 87,4 %	0,57	1	0,21	1
Δ C1 – M3	- 76,6 %*	0,74	1	0,31	1
Cinétique C1-C2-C3	- 1,111	0,57	1	0,24	1

* : Valeur seuil obtenue par une courbe ROC présentant une AUC > 0,7.
Sp : Spécificité ; Se : Sensibilité ; VPP : Valeur Prédictive Positive ; VPN : Valeur Prédictive négative.

Sur le plan qualitatif, une FA d'ADNtum détectable (> 0,1 %) à M3 était significativement prédictive d'une PD : 4/18 (22,2 %) patients avec une FA détectable ont été classés en PD contre 0/21 (0 %) avec une FA indétectable (p = 0,04). Il n'existait pas d'association significative le fait d'avoir une FA d'ADNtum détectable à C1, C2 ou C3, le sens de variation de la FA d'ADNtum entre C1-C2, C1-C3 et C1-M3, le type de variation de la FA d'ADNtum entre C1-C2, C1-C3 et C1-M3 (détectable aux deux temps ; détectable puis indétectable ; indétectable puis détectable ; indétectable aux deux temps) et la PD à M3.

3. ACE

Sur le plan quantitatif, les performances diagnostiques pour la prédiction de la PD en fonction des seuils déterminés à C1, pour la variation (en %) entre C1-C2, C1-C3 et C1-M3 et pour la cinétique entre C1 et C3 sont rapportées dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Valeurs seuils retenues pour le taux d'ACE à C1, pour les variations et pour la cinétique avec leurs performances diagnostiques pour la prédiction de la PD à M3.

	Seuil	Sp	Se	VPP	VPN
C1	49,7 ng/mL	0,55	0,69	0,26	0,89
Δ C1 – C2	- 8,4 %	0,56	0,60	0,24	0,86
Δ C1 – C3	- 19,0 %	0,51	0,57	0,16	0,88
Δ C1 – M3	- 62,7 %	0,46	0,17	0,04	0,79
Cinétique C1-C2-C3	- 0,130	0,50	0,43	0,13	0,84

Sp : Spécificité ; Se : Sensibilité ; VPP : Valeur Prédictive Positive ; VPN : Valeur Prédictive négative.

Sur le plan qualitatif, une augmentation du taux d'ACE entre C1 et M3 était significativement prédictive de la PD à M3 : 3/8 (37,5 %) patients avec un taux d'ACE en augmentation ont été classés en PD à M3 contre 3/39 (7,7 %) de ceux pour lesquels le taux diminuait (p = 0,05). Le sens de variation entre C1-C2 et C1-C3 n'était pas associé significativement à la PD à M3. Un taux d'ACE supérieur à la normale (> 5 ng/mL) à C1, C2, C3 et M3 n'était pas prédictif de la PD à M3.

IV. Corrélations biologiques avec les paramètres de survie

a. SSP

Une analyse des données de SSP a été réalisée pour chacun des biomarqueurs en fonction des seuils précédemment définis pour les valeurs à C1, les variations entre C1-C2, C1-C3 et C1-M3 et la cinétique entre C1 et C3. L'ensemble des résultats obtenus est rapporté dans le Tableau 16. La valeur absolue de chaque seuil a été retenue pour les variations par soucis de compréhension.

Tableau 16 : Durées de SSP médianes selon les taux d'ADNtot, d'ADNtum et d'ACE à C1, leur variation et leur cinétique entre C1 et C3.

	ADNtot		**ADNtum (FA)**		**ACE**
Inclusion = C1 : seuil	**34,3 ng/mL***	**38,7 ng/mL****	**8,7 %***	**13,0 %****	49,7 ng/mL
SSP : ≥ seuil SSP : < seuil p	**7,5 mois** **13,1 mois** **0,0007**	**5,7 mois** **13,1 mois** **< 0,0001**	**5,8 mois** **13,1 mois** **0,02**	**7,5 mois** **13,1 mois** **0,03**	8,2 mois 12,9 mois 0,13
Δ C1 – C2 : seuil en VA	12,8 %		64,0 %*	61,9 %**	**8,4 %**
SSP : ↓ ≥ seuil SSP : ↓ < seuil ou ↑ p	8,2 mois 12,9 mois 0,08		9,2 mois 8,1 mois 0,92	9,2 mois 8,4 mois 0,79	**11,8 mois** **6,7 mois** **0,05**
Δ C1 – C3 : seuil en VA	23,0 %		**87,4 %**		19,0 %
SSP : ↓ ≥ seuil SSP : ↓ < seuil ou ↑ p	9 mois 12,9 mois 0,09		**11,8 mois** **6,7 mois** **0,007**		11,6 mois 6,7 mois 0,14
Δ C1 – M3 : seuil en VA	13,8 %		96,3 %*	76,6 %**	62,7 %
SSP : ↓ ≥ seuil SSP : ↓ < seuil ou ↑ p	8,2 mois 12,9 mois 0,10		9,2 mois 8,4 mois 0,19	9,1 mois 7,4 mois 0,28	11,6 mois 7,5 mois 0,10
Cinétique C1-C3 : seuil	- 0,130		**- 1,111**		- 0,130
SSP : ≤ seuil SSP : > seuil p	8,8 mois 12,9 mois 0,09		**11,8 mois** **6,7 mois** **0,0007**		11,6 mois 6,7 mois 0,10

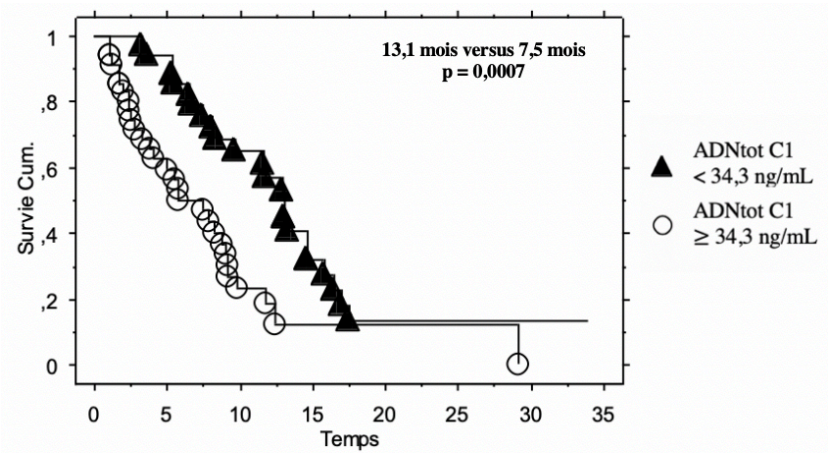
VA : Valeur absolue ; ↓ : diminution ; ↑ : augmentation
* Valeur seuil déterminée par la courbe ROC réalisée pour la prédiction de la RO à M3. ** Valeur seuil déterminée par la courbe ROC réalisée pour la prédiction de la PD à M3. Les autres seuils correspondent aux valeurs médianes. Les SSP significativement différentes ($p < 0,05$) apparaissent en caractères gras.

i. ADNtot

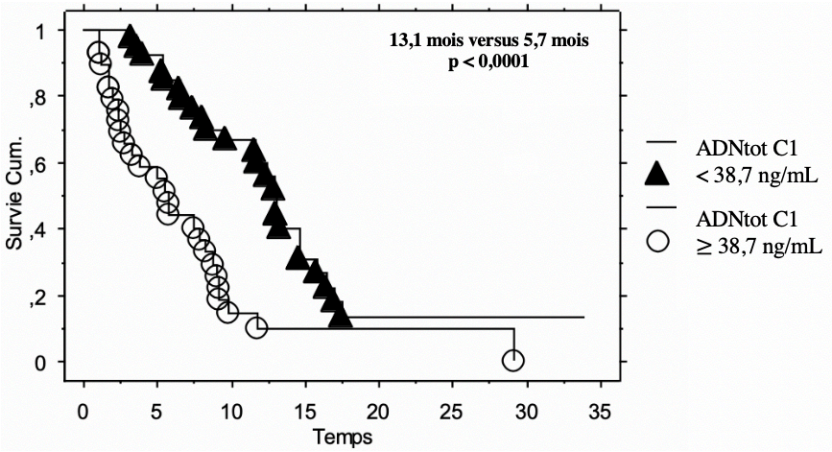
Une concentration en ADNtot à C1 inférieure aux seuils définis pour la RO et pour la PD était prédictive d'une SSP plus longue : 13,1 mois versus 7,5 mois (p = 0,0007) (Figure 10A) et 13,1 mois versus 5,7 mois (p < 0,0001), respectivement (Figure 10B). Aucune valeur pronostique pour la SSP n'a été mise en évidence pour les différentes variations et la cinétique des taux d'ADNtot.

Figures 10 : Courbes de survie selon la méthode de Kaplan-Meier pour la SSP en fonction de la concentration en ADNtot à C1 (A et B).

A. En fonction du seuil défini pour la RO à M3



B. En fonction du seuil défini pour la PD à M3



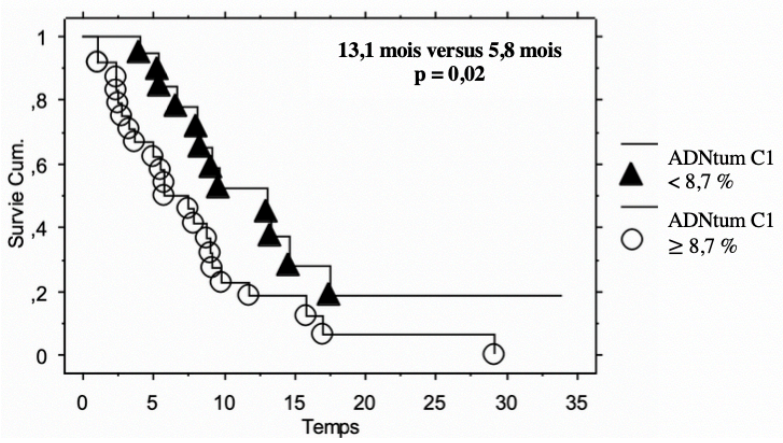
RO : Réponse Objective ; PD : Maladie Progressive.

ii. ADNtum

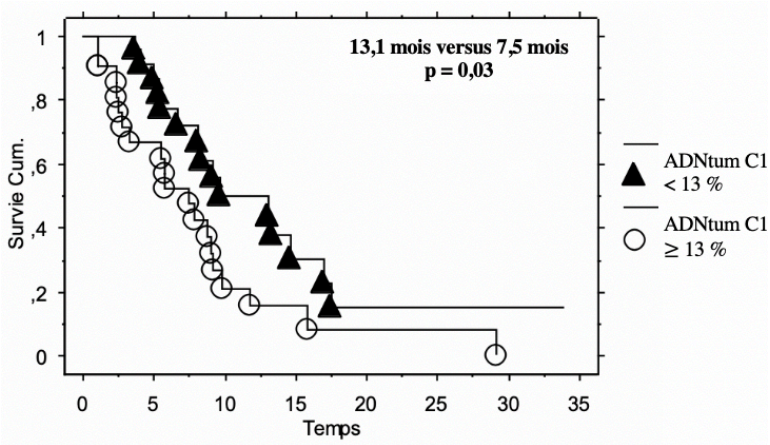
Une FA d'ADNtum à C1 < au seuil de 8,7 % défini pour la RO et < au seuil de 13 % défini pour la PD était prédictive d'une SSP plus longue, 13,1 mois versus 5,8 mois (p = 0,02) (Figure 11A) et 13,1 mois versus 7,5 mois (p = 0,03) (Figure 11B), respectivement. La variation de la FA d'ADNtum entre C1 et C3 était associée à la SSP. La SSP médiane était de 11,8 mois en cas de diminution ≥ 87,4 % versus 6,7 mois en cas de diminution < 87,4 % (p = 0,007) (Figure 11C). Une cinétique entre C1 et C3 ≤ - 1,111 était prédictive d'une SSP médiane plus longue, 11,8 mois versus 6,7 mois (p = 0,0007) (Figure 11D).

Figures 11 : Courbes de survie selon la méthode de Kaplan-Meier pour la SSP en fonction de la FA d'ADNtum à C1 pour le seuil défini pour la RO (A) et celui défini pour la PD (B), de sa variation entre C1 et C3 (C) et de sa cinétique (D).

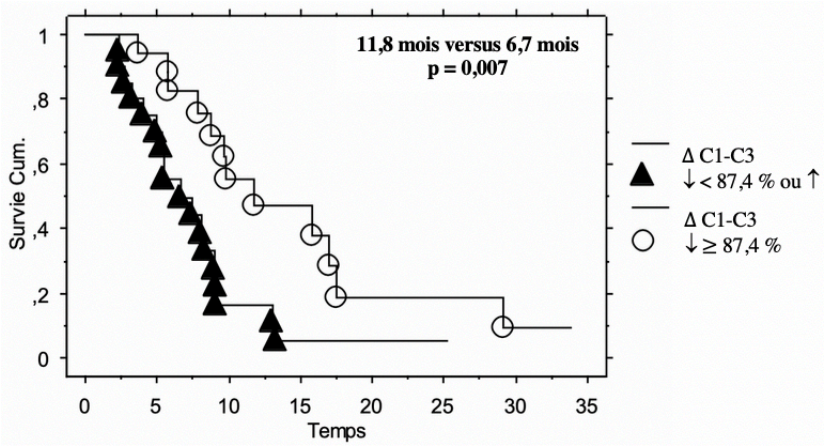
A. FA d'ADNtum à C1 selon le seuil défini pour la RO à M3



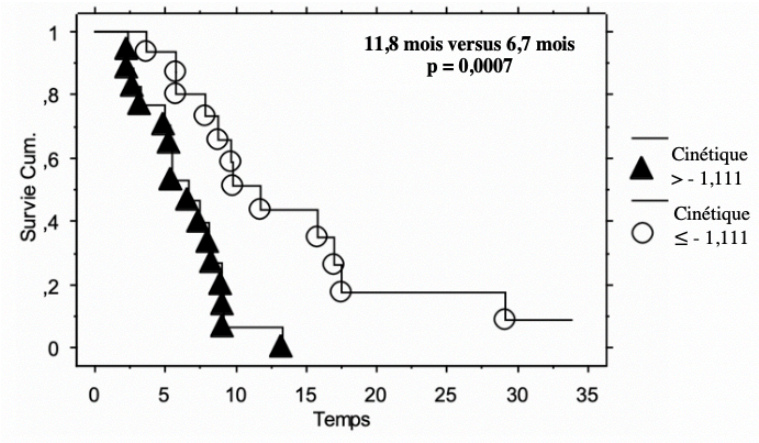
B. FA d'ADNtum à C1 selon le seuil défini pour la PD à M3



C. ΔC1-C3 de la FA d'ADNtum



D. Cinétique entre C1 et C3 de la FA d'ADNtum

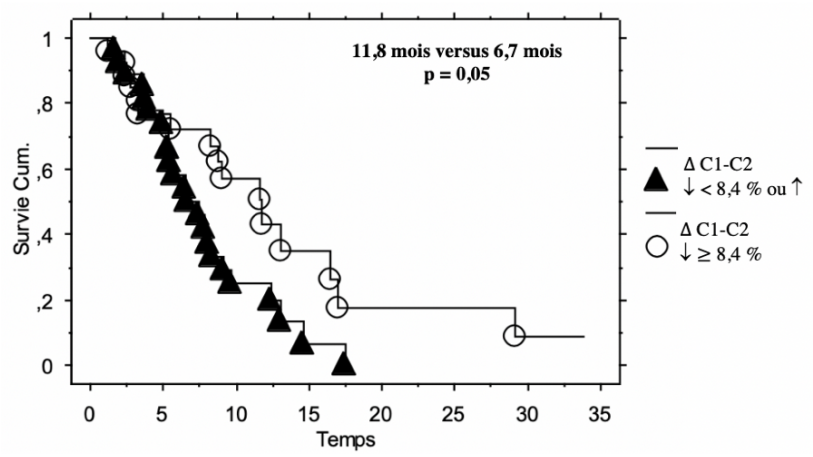


FA : Fréquence allélique ; RO : Réponse Objective ; PD : Maladie Progressive ; ↓ : diminution ; ↑ : augmentation.

iii. ACE

Seule la variation entre C1 et C2 avait une valeur pronostique. La SSP médiane était de 11,8 mois en cas de diminution ≥ 8,4 % versus 6,7 mois en cas de diminution < 8,4 % (p = 0,05) (Figure 12). Aucune valeur pronostique concernant la SSP n'a été mise en évidence pour les taux d'ACE à C1, les autres variations et pour la cinétique.

Figure 12 : Courbe de survie selon la méthode de Kaplan-Meier pour la SSP en fonction de la variation entre C1 et C2 du taux d'ACE.



↓ : diminution ; ↑ : augmentation.

b. SG

Une analyse des données de SG a été réalisée pour chacun des biomarqueurs en fonction des seuils précédemment définis pour les valeurs à C1, les variations entre C1-C2, C1-C3 et C1-M3 et leur cinétique. L'ensemble des résultats obtenus est rapporté dans le Tableau 17. La valeur absolue de chaque seuil de variation a été retenue par soucis de compréhension.

Tableau 17 : Durées de SG médianes selon les taux, les variations et la cinétique des taux d'ADNtot, d'ADNtum et d'ACE.

	ADNtot		**ADNtum (FA)**		**ACE**
Inclusion = C1 : seuil	**34,3 ng/mL***	**38,7 ng/mL****	8,7 %*	**13 %****	49,7 ng/mL
SG ≥ seuil SG < seuil p	**17,7 mois** **NA** **0,0009**	**17,7 mois** **NA** **0,0005**	19,9 mois NA 0,06	**17,7 mois** **NA** **0,04**	26,4 mois NA 0,38
Δ C1 – C2 : seuil en VA	12,8 %		64 %*	61,9 %**	8,4 %
SG : ↓ ≥ seuil SG : ↓ < seuil ou ↑ p	24,7 mois NA 0,90		23,6 mois NA 0,56	26,4 mois NA 0,66	NA NA 0,44
Δ C1 – C3 : seuil en VA	23 %		87,4 %		19 %
SG : ↓ ≥ seuil SG : ↓ < seuil ou ↑ p	19,9 mois NA 0,28		NA 23,6 mois 0,09		NA NA 0,97
Δ C1 – M3 : seuil en VA	13,8 %		96,3 %	76,6 %	62,7 %
SG : ↓ ≥ seuil SG : ↓ < seuil ou ↑ p	24,7 mois NA 0,41		NA 23,6 mois 0,15	26,4 mois NA 0,66	26,4 mois NA 0,79
Cinétique C1-C3 : seuil	- 0,130		- 1,111		- 0,130
SG : ≤ seuil SG : > seuil p	19,9 mois NA 0,28		NA 19,9 mois 0,06		NA NA 0,59

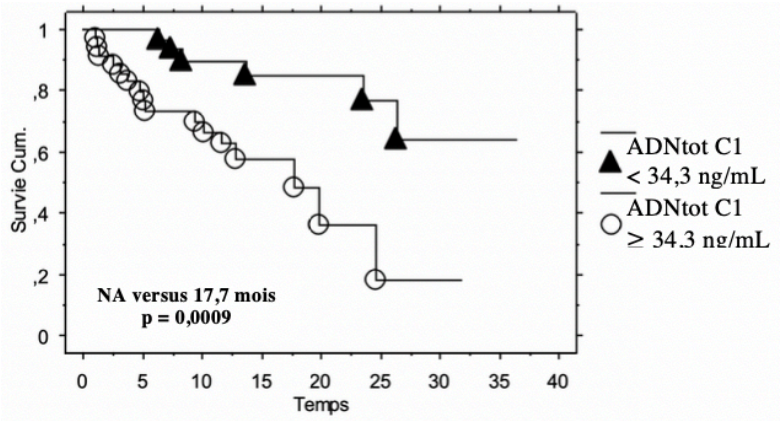
VA : Valeur absolue ; ↓ : diminution ; ↑ : augmentation.
* Valeur seuil déterminée par la courbe ROC réalisée pour la prédiction de la RO à M3. ** Valeur seuil déterminée par la courbe ROC réalisée pour la prédiction de la PD à M3. Les autres seuils correspondent aux valeurs médianes.
NA : Médiane de survie non atteinte.
Les SG significativement différentes ($p < 0,05$) apparaissent en caractères gras.

i. ADNtot

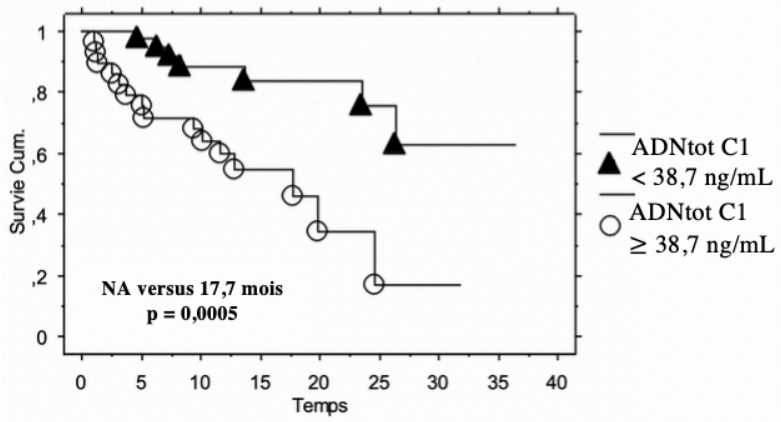
Aucune valeur pronostique concernant la SG n'a été mise en évidence pour les différentes variations et la cinétique du taux d'ADNtot. Une concentration d'ADNtot à C1 < au seuil de 34,3 ng/mL, défini pour la prédiction de la RO à M3, était prédictive d'une SG plus longue : la médiane de survie n'était pas atteinte compte tenu du nombre (29/35) de patients ayant des données de SG censurées à la fin du suivi contre 17,7 mois pour ceux ayant un taux ≥ 34,3 ng/mL (p = 0,0009) (Figure 13A). De la même manière une concentration en ADNtot à C1 < au seuil de 38,7 ng/mL, défini pour la prédiction de la PD à M3, était prédictive d'une SG plus longue avec une médiane de survie non atteinte (34/41 patients censurés) versus 17,7 mois pour ceux ayant un taux ≥ 38,7 ng/mL (p = 0,0005) (Figure 13B).

Figures 13 : Courbes de survie selon la méthode de Kaplan-Meier pour la SG en fonction de la concentration en ADNtot à C1 par rapport au seuil défini pour la RO (A) et pour la PD (B).

A. En fonction du seuil défini pour la RO à M3



B. En fonction du seuil défini pour la PD à M3

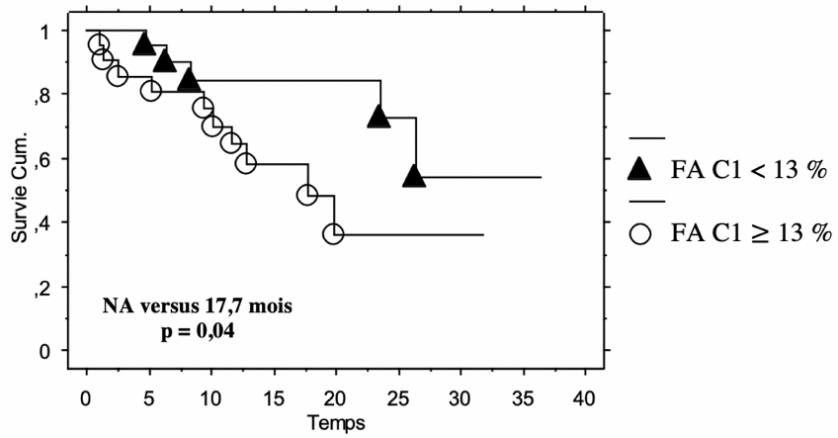


RO : Réponse Objective ; PD : Maladie Progressive ; NA : Médiane de survie non atteinte.

ii. ADNtum

Une FA d'ADNtum à C1 < au seuil de 13 %, défini pour la prédiction de la PD, était prédictive d'une SG plus longue : la médiane de survie n'était pas atteinte (19/24 patients censurés) contre 17,7 mois pour ceux ayant un taux ≥ à 13 % (p = 0,04) (Figure 14). Aucune valeur pronostique concernant la SG n'a été mise en évidence pour les différentes variations et la cinétique entre C1 et C3 de la FA d'ADNtum.

Figure 14 : Courbe de survie selon la méthode de Kaplan-Meier pour la SG en fonction de la FA d'ADNtum à C1 selon le seuil défini pour la PD à M3.



FA : Fréquence allélique ; NA : Médiane de survie non atteinte.

iii. ACE

Aucune valeur pronostique concernant la SG n'a été mise en évidence pour les taux d'ACE à C1, les différentes variations et la cinétique entre C1 et C3.

DISCUSSION

L'objectif de notre étude était d'évaluer prospectivement les corrélations de trois marqueurs tumoraux circulants : l'ADN total circulant, l'ADN tumoral circulant, l'ACE, de leurs variations et de leur cinétique avec l'évaluation selon RECIST 1.1. et les paramètres de survie chez des patients traités pour un CCRm en 1ère ligne de traitement.

En effet, les données de la littérature concernant le monitoring de la réponse clinique par le dosage de l'ADN circulant sont hétérogènes notamment quant au temps des prélèvements et à la ligne de traitement. Notre étude est une étude prospective multicentrique. Elle se voulait homogène concernant le recrutement des patients en incluant uniquement des patients naïfs de chimiothérapie. Notre population est représentative de la population générale atteinte d'un CCRm. L'âge médian des patients était de 67 ans et le sexe ratio de 1,5 hommes pour 1 femme ce qui concorde avec les données épidémiologiques (3,90). Il était nécessaire d'inclure 74 patients pour un taux de patients en réponse objective à M3 attendu entre 60 et 65 % (91). Le taux de réponse objective observé dans notre étude est de 32,9 %. La sélection des patients semble expliquer ce faible taux de réponse. En effet, 12,9 % des patients présentaient un statut OMS à 2 contre 8 % et 3,9 % dans les précédentes études (85,87). L'association entre le pronostic et le statut OMS initial a été largement décrite. Le statut OMS $\geq$ 2 a été mis en évidence comme étant un facteur de progression indépendant (92), à l'inverse, le statut OMS à 0 comme étant un facteur prédictif d'une SSP plus longue (12). Nos résultats confirment ces données en mettant en évidence une relation entre le statut OMS initial et la progression à M3 ($p = 0,004$). Par ailleurs nous avons réalisé une analyse détaillée de la cinétique des marqueurs circulants en procédant à un recueil standardisé de l'ADN total circulant, l'ADN tumoral circulant et l'ACE à 4 temps du suivi.

L'objectif principal de notre étude était d'estimer la sensibilité de la variation précoce, après 2 cycles de chimiothérapie du taux d'ADN total circulant pour la réponse objective à 3 mois définie selon les critères RECIST 1.1. Nous ne sommes pas parvenus à établir de seuil de variation précoce du taux d'ADN total circulant après 2 cycles de chimiothérapie avec une sensibilité suffisante. Ainsi, une diminution du taux d'ADNtot entre C1 et C3 supérieure à 23 % obtient une sensibilité de 33 % et une spécificité de 44 % pour la prédiction de la réponse objective à 3 mois. Ces performances sont insuffisantes. Nous ne mettons pas non plus en évidence de seuil pertinent pour les autres variations étudiées du taux d'ADNtot et pour les variations du taux d'ADNtum pour la prédiction de la réponse à 3 mois. Ceci peut s'expliquer par notre faible effectif de patients répondeurs entrainant un manque de puissance ($1 - \beta$).

En revanche, nous montrons qu'une diminution inférieure à 87,4 % ou une augmentation du taux d'ADN tumoral circulant à C3 est une valeur seuil associée à la prédiction de la progression à 3 mois avec une sensibilité de 100 % correspondant à une VPN de 100 %. Ainsi, les patients présentant une diminution du taux d'ADNtum ≥ 87,4 % avaient une probabilité nulle de progression.

Un de nos objectifs secondaires était d'étudier la corrélation entre les marqueurs circulants et les paramètres de survie.

Nos résultats confirment la valeur pronostique des taux initiaux d'ADNtot et d'ADNtum pour la SSP ($p < 0,0001$ et $p = 0,03$, respectivement) et pour la SG ($p = 0,0005$ et $p = 0,04$, respectivement). La valeur pronostique de la concentration initiale en ADNtot et en ADNtum a été mise en évidence dans plusieurs travaux, nos résultats sont en accord avec ces données. Ainsi, Bidard *et coll.* étudiaient des patients ayant un CCRm au niveau hépatique bénéficiant d'une chimiothérapie de 1ère ligne avant une éventuelle métastasectomie. Ils mettaient en évidence que la concentration en ADNtum initiale était corrélée à un taux de résection R1 plus élevé ($p = 0,05$) (89). Spindler *et coll.* montraient, en considérant le taux d'ADNtot en tant que variable continue, une diminution de la SSP avec un HR = 1,4 [IC95 % 1,1 – 1,7], $p = 0,03$ et de la SG avec un HR = 1,6 [IC95 % 1,3 – 2,0], $p < 0,0001$ pour chaque augmentation de quartile du taux initial d'ADNtot (69). La concentration initiale médiane en ADNtot est plus élevée dans notre étude que dans la littérature : 33,9 ng/mL contre 24,4 ng/mL (48) et 26,6 ng/mL (87). Il en était de même pour la FA médiane initiale d'ADNtum qui était de 8,7 % contre 1,84 % dans l'étude de Vidal *et coll.* (88). Cet élément peut contribuer à expliquer le faible de taux de réponse observé.

Nous mettons en évidence une association significative entre la variation de la FA d'ADNtum entre C1 et C3 et la SSP. Ainsi, la SSP médiane est de 11,8 mois en cas de diminution ≥ 87,4 % contre 6,7 mois en cas de diminution < 87,4 % ($p = 0,007$). La valeur seuil de 87,4 % est intéressante. L'étude prospective PLACOL mettait en évidence des données similaires pour ce qui est du seuil et du moment de prélèvement. Ainsi, une diminution d'ADNtum entre C1 et C2 ou C3 supérieure à 80 % était prédictive d'une SSP médiane plus longue : 8,5 mois versus 2,4 mois ($p < 0,0001$) (86). La majorité des travaux portant sur l'intérêt de l'évaluation précoce basée sur les biomarqueurs se sont intéressés à la variation entre l'inclusion et la seconde ou troisième cure de chimiothérapie (85–87). Tie *et coll.* avaient étudié l'intérêt d'un dosage plus précoce réalisé le troisième jour après la première cure de

chimiothérapie, et n'avaient pas mis en évidence de différence significative entre ce dosage et celui réalisé à l'inclusion (p = 0,139). La variation du taux d'ADN circulant nécessite un processus de diminution de la charge tumorale qui ne survient pas immédiatement après l'initiation de la chimiothérapie.

Dans notre étude, la variation de l'ADNtum entre C1 et C3 ou la cinétique de l'ADNtum entre C1 et C3 semblent corrélées à la SG sans atteindre la significativité (p = 0,09 et p = 0,06, respectivement). Ainsi, une diminution de l'ADNtum supérieure à 87,4 % entre C1 et C3 semble associée à une augmentation de survie globale en comparaison avec une diminution inférieure à 87,4 %.

L'absence de significativité de ce résultat peut être expliquée d'une part par notre faible effectif de patients pour lesquels l'ADNtum était analysable (ΔADNtum C1-C3, n = 39) et détecté. La détection de l'ADNtum a été effectuée en utilisant une technique de dPCR nécessitant de connaître au préalable une mutation tissulaire. Dans notre étude, 45/70 (64,3 %) des patients présentaient une mutation tissulaire portant sur le gène RAS pour 38/70 (54,3 %) patients et sur le gène BRAF pour 7/70 (10 %) patients. Les taux mutationnels observés sont en accord avec la littérature (67,68). La sensibilité de la dPCR est élevée mais elle reste inférieure à 100 %. Dans notre étude, le taux de détection de l'ADNtum est de 86,7 % parmi les patients mutés pour RAS ou BRAF. Ce taux est retrouvé dans la plupart des études ayant utilisé la dPCR. Dans l'étude de validation COCACOLON le taux de détection était de 92,1 % (48), il était de 76,8 % pour Garlan *et coll.* (86) et de 91,3 % pour Bidard *et coll.* (89). La détection d'un plus large panel de mutations pourrait permettre de préciser nos résultats. Aussi, des changements et émergences mutationnels sont décrits en cours de chimiothérapie modifiant les données d'ADNtum. Ainsi, Spindler *et coll.* ont mis en évidence 19 % de différences mutationnelles entre le début de la chimiothérapie et le diagnostic de progression de la maladie (87). La plupart des études portant sur l'ADN circulant dans le CCRm se sont intéressées de manière plus approfondie à l'analyse de l'ADNtum. Il nous paraissait pertinent d'étudier l'ADNtot avec pour objectif d'évaluer un biomarqueur accessible à l'ensemble des patients. Une analyse plus large de l'ADNtum pourrait se faire en prenant en compte les changements mutationnels et en appliquant nos résultats à l'ensemble des patients traités. Cela nécessiterait l'utilisation de techniques de détection réalisant un séquençage complet du génome à haut débit de type NGS. Cette technique ne nécessite pas l'identification au préalable des mutations tissulaires, mais, elle est couteuse et sa sensibilité est inférieure à la dPCR.

D'autre part, le faible recul actuel nous expose à des données manquantes concernant le suivi et en particulier la SG. L'actualisation de nos données d'ici quelques mois, telle qu'elle est prévue dans l'étude COCA-MACS devrait permettre d'affiner ces résultats.

Nous pouvons néanmoins mettre ces résultats en parallèle avec le principe de rétrécissement précoce de la tumeur, défini par la variation relative des diamètres des lésions cibles par rapport aux mesures réalisées sur le scanner pratiqué à l'inclusion et celui de la profondeur de la réponse, défini comme le changement relatif dans la somme des diamètres selon RECIST par rapport au nadir. Chez les patients en cours de chimiothérapie de 1ère ligne, la relation entre le rétrécissement précoce de la tumeur et le pronostic à long terme concernant la SSP et la SG a été démontrée dans plusieurs travaux. Ainsi, Giessen *et coll.* ont mis en évidence une association entre le rétrécissement précoce de la tumeur, ≥ 20 %, évalué à 7 semaines et la SSP médiane : 9,9 mois versus 6,1 mois (p = 0,029) et avec la SG médiane : 27,5 mois versus 17,8 mois (p = 0,002) (11). Cremolini *et coll.* ont mené une étude similaire avec une évaluation à 8 semaines. La SSP médiane était de 8,8 mois versus 7,2 mois (p = 0,009) et la SG médiane de 31,9 mois versus 21,9 mois (p = 0,002) (12). Piessevaux *et coll.* ont démontré pour un seuil de rétrécissement tumoral précoce > 10 % évalué à la 6ème semaine une association avec la SSP médiane : 6,1 mois [IC95 % 5,1 – 7,2] versus 1,5 mois [IC95 % 5,1 – 7,2], (p < 0,001) et avec la SG : 13,7 mois [IC non atteint] versus 6,9 mois [IC95 % 6,1 – 7,7], (p < 0,001) (93). De la même manière, Suzuki *et coll.* ont mis en évidence une association entre le rétrécissement tumoral précoce évalué à 8 semaines et une augmentation de la SSP et de la SG (94). La principale limite de ces deux paramètres est leur délai d'évaluation. Ils ont été évalués entre 6 et 8 semaines après le début de la chimiothérapie dans les travaux précédemment décrits. Ce délai est court en comparaison au délai de l'évaluation scannographique réalisée en routine mais le patient est exposé durant cette période à une toxicité importante d'un schéma de chimiothérapie possiblement inefficace.

Nos résultats offrent la perspective d'une évaluation précoce, après 2 cures de chimiothérapie, soit 4 semaines après son initiation, permettant de préciser le pronostic à long terme. Les patients ayant une réponse précoce insuffisante pourraient bénéficier d'une intensification ou adaptation du schéma de chimiothérapie dès la troisième ou quatrième cure plutôt qu'au moment de l'évaluation radiologique réalisée en général à 3 mois après 6 cures de chimiothérapie. Il a été montré qu'un schéma thérapeutique intensifié de type triplet de chimiothérapie et/ou chimiothérapie associée à une thérapie ciblée augmentait la profondeur de la réponse et les paramètres de survie. Mansmann *et coll.* ont mis en évidence une profondeur

de réponse moyenne à 8 semaines de 35,52 % chez 348 patients traités par FOLFIRI seul versus 50,07 % chez 315 patients traités par FOLFIRI + CETUXIMAB ($p < 0,00001$). La profondeur de la réponse était associée de manière significative à la SSP ($p = 0,0023$) (95). Dans l'essai TRIBE, Cremolini *et coll.* ont mis en évidence une profondeur de réponse médiane de 37,8 % [IC95 % -16,3 % – 100 %] chez 198 patients recevant une chimiothérapie de 1ère ligne par FOLFIRI + BEVACIZUMAB versus 43,4 % [IC95 % -15,5 % – 100 %] chez 209 patients traités par FOLFOXIRI + BEVACIZUMAB ($p = 0,003$) (12). La prise de décision concernant la stratégie thérapeutique à adopter chez ces patients doit être approfondie au cours d'études prospectives. Elle apparait comme une piste intéressante pour améliorer le pronostic à long terme de ces patients.

Notre étude a soulevé la pertinence du dosage de l'ADNtum en pratique clinique. Ainsi, le patient n°65, était atteint d'un CCR avec une évolution métastatique métachrone. Il présentait comme antécédents : un cancer sigmoïdien muté NRAS, exon 3, c181C>A et un cancer colique droit muté KRAS, exon 2, c35G>T. Le dosage de l'ADNtum a permis de déterminer quel cancer était à l'origine de l'évolution métastatique. En cas de mutations prédictives de résistance aux anti-EGFR discordantes, cette distinction est essentielle pour guider la stratégie thérapeutique et rend nécessaire la réalisation de nouvelles biopsies tissulaires. Ces biopsies sont invasives et nécessitent des étapes intermédiaires de traitement et de conservation du tissu tumoral allongeant le délai de leur interprétation. Le dosage de l'ADNtum pourrait être appliqué en pratique clinique dans le CCRm pour accéder de manière non morbide, par un simple prélèvement sanguin, et dans un délai plus court au génome tumoral. Le dosage de l'ADNtum dans ce but est notamment largement développé pour la recherche des mutations du gène de l'EGFR dans le cancer du poumon non à petites cellules (96).

Nous avons également étudié l'ACE en tant que biomarqueur. A l'inclusion, le taux d'ACE était non significatif (≤ 5 ng/mL) pour 12/70 (17,1 %) patients. Ce résultat est en accord avec les données précédemment établies (44) et confirme le fait que ce biomarqueur ne peut pas être appliqué à l'ensemble des patients ayant un CCRm. Le sens de variation du taux d'ACE entre C1 et M3 est significativement prédictif de la RO et de la PD à M3 ($p = 0,04$ et $p = 0,05$, respectivement). Ces données confirment la place du dosage de l'ACE en complément de l'évaluation radiologique réalisée à M3. De façon similaire aux travaux précédemment publiés, nous n'avons pas mis en évidence de relation entre les variations précoces du taux d'ACE, l'évaluation à M3 selon les critères RECIST 1.1. et les paramètres de survie. Tie *et coll.* n'avaient pas mis en évidence de différence significative entre les taux d'ACE à C1 et à C2

(24,0 ng/mL versus 26,6 ng/mL, p = 0,198) (85). Dans notre étude, entre C1 et C2, le taux d'ACE a augmenté chez 21/53 (39,6 %) patients, parmi eux 17/21 (81 %) n'ont pas présenté de progression radiologique à M3. Entre C1 et C3, le taux d'ACE a augmenté chez 17/50 (34 %) patients, parmi eux 15/17 (88,2 %) n'ont pas présenté de progression radiologique à M3. Ces données confirment les observations menées par Sorbye *et coll*. qui avaient décrit un « flare up » initial du taux d'ACE chez certains patients en l'absence de progression ultérieure documentée (49).

CONCLUSION

Nos résultats issus de l'analyse préliminaire de l'étude prospective COCA-MACS confirment la valeur pronostique des taux initiaux d'ADN total et d'ADN tumoral circulant dans le cancer colorectal métastatique.

Nous montrons une association significative entre la variation précoce de l'ADN tumoral, après 2 cures de chimiothérapie ainsi que sa cinétique calculée entre l'inclusion et la 2ème cure de chimiothérapie et la survie sans progression.

Nos résultats offrent la perspective d'un monitoring précoce de l'ADN tumoral circulant, permettant de préciser le pronostic à long terme et d'adapter de manière précoce la stratégie thérapeutique en première ligne de chimiothérapie. Ces résultats pourront être précisés dans les prochains mois par les résultats finaux de l'étude COCA-MACS.

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2018; 68 (6): 394-424.

2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on 2018 SEER data submission.

3. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. Lancet. 2014; 383 (9927): 1490-502.

4. Taylor DP, Burt RW, Williams MS, Haug PJ, Cannon-Albright LA. Population-based family history-specific risks for colorectal cancer: a constellation approach. Gastroenterology. 2010; 138 (3): 877-85.

5. Win AK, Jenkins MA, Dowty JG, Antoniou AC, Lee A, Giles GG, et al. Prevalence and Penetrance of Major Genes and Polygenes for Colorectal Cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2017; 26 (3): 404-12.

6. Dowty JG, Win AK, Buchanan DD, Lindor NM, Macrae FA, Clendenning M, et al. Cancer risks for MLH1 and MSH2 mutation carriers. Hum Mutat. 2013; 34 (3): 490-7.

7. Buecher B. Colorectal adenomatous polyposis syndromes: Genetic determinism, clinical presentation and recommendations for care. Bull Cancer. 2016; 103 (2): 199-209.

8. Rosenbluh J, Wang X, Hahn WC. Genomic insights into WNT/β-catenin signaling. Trends Pharmacol Sci. 2014; 35 (2): 103-9.

9. Aihara H, Kumar N, Thompson CC. Diagnosis, surveillance, and treatment strategies for familial adenomatous polyposis: rationale and update. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2014; 26 (3): 255-62.

10. Buyse M, Thirion P, Carlson RW, Burzykowski T, Molenberghs G, Piedbois P. Relation between tumour response to first-line chemotherapy and survival in advanced colorectal cancer: a meta-analysis. Meta-Analysis Group in Cancer. Lancet. 2000; 356 (9227): 373-8.

11. Giessen C, Laubender RP, Fischer von Weikersthal L, Schalhorn A, Modest DP, Stintzing S, et al. Early tumor shrinkage in metastatic colorectal cancer: retrospective analysis from an irinotecan-based randomized first-line trial. Cancer Sci. 2013; 104 (6): 718-24.

12. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lonardi S, Masi G, Salvatore L, et al. Early tumor shrinkage and depth of response predict long-term outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy plus bevacizumab: results from phase III TRIBE trial by the Gruppo Oncologico del Nord Ovest. Ann Oncol. 2015; 26 (6): 1188-94.

13. Karoui M, Penna C, Amin-Hashem M, Mitry E, Benoist S, Franc B, et al. Influence of preoperative chemotherapy on the risk of major hepatectomy for colorectal liver metastases. Ann Surg. 2006; 243 (1): 1-7.

14. Phelip JM, Benhaim L, Bouché O, Christou N, Desolneux G, Dupré A, Léonard D, Michel P, Penna C, Rousseaux B, Tougeron D, Tournigand C. «Cancer colorectal métastatique». Thésaurus National de Cancérologie Digestive, 2019.

15. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer. 2009; 45 (2): 228-47.

16. Bellomi M, De Piano F, Ancona E, Lodigiani AF, Curigliano G, Raimondi S, et al. Evaluation of inter-observer variability according to RECIST 1.1 and its influence on response classification in CT measurement of liver metastases. Eur J Radiol. 2017; 95: 96-101.

17. Chun YS, Vauthey J-N, Boonsirikamchai P, Maru DM, Kopetz S, Palavecino M, et al. Association of computed tomography morphologic criteria with pathologic response and survival in patients treated with bevacizumab for colorectal liver metastases. JAMA. 2009; 302 (21): 2338-44.

18. Sharma MR, Maitland ML, Ratain MJ. RECIST: No Longer the Sharpest Tool in the Oncology Clinical Trials Toolbox—Point. Cancer Res. 2012; 72 (20): 5145-9.

19. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, et al. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. N Engl J Med. 2011; 364 (6): 514-23.

20. Grothey A, Cutsem EV, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet. 2013; 381 (9863): 303-12.

21. Edeline J, Boucher E, Rolland Y, Vauléon E, Pracht M, Perrin C, et al. Comparison of tumor response by Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) and modified RECIST in patients treated with sorafenib for hepatocellular carcinoma. Cancer. 2012; 118 (1): 147-56.

22. Tan MC, Linehan DC, Hawkins WG, Siegel BA, Strasberg SM. Chemotherapy-induced normalization of FDG uptake by colorectal liver metastases does not usually indicate complete pathologic response. J Gastrointest Surg. 2007; 11 (9): 1112-9.

23. Geus-Oei L-F de, Vriens D, Laarhoven HWM van, Graaf WTA van der, Oyen WJG. Monitoring and Predicting Response to Therapy with 18F-FDG PET in Colorectal Cancer: A Systematic Review. J Nucl Med. 2009; 50 (Suppl 1): 43S-54S.

24. Wahl RL, Jacene H, Kasamon Y, Lodge MA. From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET Response Criteria in Solid Tumors. J Nucl Med. 2009; 50 (Suppl 1): 122S-150S.

25. Byström P, Berglund A, Garske U, Jacobsson H, Sundin A, Nygren P, et al. Early prediction of response to first-line chemotherapy by sequential [18F]-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography in patients with advanced colorectal cancer. Ann Oncol. 2009; 20 (6): 1057-61.

26. Liu F-Y, Yen T-C, Wang J-Y, Yang T-S. Early prediction by 18F-FDG PET/CT for progression-free survival and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer receiving third-line cetuximab-based therapy. Clin Nucl Med. 2015; 40 (3): 200-5.

27. Findlay M, Young H, Cunningham D, Iveson A, Cronin B, Hickish T, et al. Noninvasive monitoring of tumor metabolism using fluorodeoxyglucose and positron emission tomography in colorectal cancer liver metastases: correlation with tumor response to fluorouracil. J Clin Oncol. 1996; 14 (3): 700-8.

28. Bender H, Bangard N, Metten N, Bangard M, Mezger J, Schomburg A, et al. Possible role of FDG-PET in the early prediction of therapy outcome in liver metastases of colorectal cancer. Hybridoma. 1999; 18 (1): 87-91.

29. de Geus-Oei LF, van Laarhoven HWM, Visser EP, Hermsen R, van Hoorn BA, Kamm YJL, et al. Chemotherapy response evaluation with FDG–PET in patients with colorectal cancer. Ann Oncol. 2008; 19 (2): 348-52.

30. Hendlisz A, Golfinopoulos V, Garcia C, Covas A, Emonts P, Ameye L, et al. Serial FDG–PET/CT for early outcome prediction in patients with metastatic colorectal cancer undergoing chemotherapy. Ann Oncol. 2012; 23 (7): 1687-93.

31. Hong YS, Kim HO, Kim K, Lee J-L, Kim HJ, Lee SJ, et al. 3′-Deoxy-3′-18F-Fluorothymidine PET for the Early Prediction of Response to Leucovorin, 5-Fluorouracil, and Oxaliplatin Therapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. J Nucl Med. 2013; 54 (8): 1209-16.

32. Woff E, Hendlisz A, Garcia C, Deleporte A, Delaunoit T, Maréchal R, et al. Monitoring metabolic response using FDG PET-CT during targeted therapy for metastatic colorectal cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2016; 43 (10): 1792-801.

33. Mogensen MB, Loft A, Aznar M, Axelsen T, Vainer B, Osterlind K, et al. FLT-PET for early response evaluation of colorectal cancer patients with liver metastases: a prospective study. EJNMMI Res. 2017; 7 (1): 56.

34. Pickles MD, Gibbs P, Lowry M, Turnbull LW. Diffusion changes precede size reduction in neoadjuvant treatment of breast cancer. Magn Reson Imaging. 2006; 24 (7): 843-7.

35. Harry VN, Semple SI, Parkin DE, Gilbert FJ. Use of new imaging techniques to predict tumour response to therapy. Lancet Oncology. 2010; 11 (1): 92-102.

36. Koh D-M, Scurr E, Collins D, Kanber B, Norman A, Leach MO, et al. Predicting response of colorectal hepatic metastasis: value of pretreatment apparent diffusion coefficients. AJR Am J Roentgenol. 2007; 188 (4): 1001-8.

37. Donati F, Boraschi P, Pacciardi F, Cervelli R, Castagna M, Urbani L, et al. 3T diffusion-weighted MRI in the response assessment of colorectal liver metastases after chemotherapy: Correlation between ADC value and histological tumour regression grading. Eur J Radiol. 2017; 91: 57-65.

38. Byun WM, Shin SO, Chang Y, Lee SJ, Finsterbusch J, Frahm J. Diffusion-weighted MR imaging of metastatic disease of the spine: assessment of response to therapy. AJNR Am J Neuroradiol. 2002; 23 (6): 906-12.

39. Chen C-Y, Li C-W, Kuo Y-T, Jaw T-S, Wu D-K, Jao J-C, et al. Early response of hepatocellular carcinoma to transcatheter arterial chemoembolization: choline levels and MR diffusion constants--initial experience. Radiology. 2006; 239 (2): 448-56.

40. Xie H, Sun T, Chen M, Wang H, Zhou X, Zhang Y, et al. Effectiveness of the Apparent Diffusion Coefficient for Predicting the Response to Chemoradiation Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer. Medicine. 2015; 94 (6): e517.

41. Sugita R, Ito K, Fujita N, Takahashi S. Diffusion-weighted MRI in abdominal oncology: Clinical applications. World J Gastroenterol. 2010; 16 (7): 832-6.

42. Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. J Exp Med. 1965; 121: 439-62.

43. Hashino J, Fukuda Y, Oikawa S, Nakazato H, Nakanishi T. Metastatic potential of human colorectal carcinoma SW1222 cells transfected with cDNA encoding carcinoembryonic antigen. Clin Exp Metastasis. 1994; 12 (4): 324-8.

44. Duffy MJ. Carcinoembryonic Antigen as a Marker for Colorectal Cancer: Is It Clinically Useful? Clin Chem. 2001; 47 (4): 624-30.

45. Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, Hoffman RG, Stearns M, Schwartz MK, et al. Preoperative Carcinoembryonic Antigen Level as a Prognostic Indicator in Colorectal Cancer. N Engl J Med. 1978; 299 (9): 448-51.

46. Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jessup JM, et al. 2000 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast and Colorectal Cancer: Clinical Practice Guidelines of the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol. 2001; 19 (6): 1865-78.

47. Iwanicki-Caron I, Di Fiore F, Roque I, Astruc E, Stetiu M, Duclos A, et al. Usefulness of the Serum Carcinoembryonic Antigen Kinetic for Chemotherapy Monitoring in Patients With Unresectable Metastasis of Colorectal Cancer. J Clin Oncol. 2008; 26 (22): 3681-6.

48. Sefrioui D, Vasseur N, Toure E, Blanchard F, Delacour J, Thill C, et al. Prospective analysis of CEA, circulating DNA (cDNA) and circulating tumor cells (CTC) kinetics in patients (pts) treated for a metastatic colorectal cancer (mCRC). En cours de soumission. Ann Oncol. 2016; 27 (Suppl 6): 71.

49. Sørbye H, Dahl O. Carcinoembryonic Antigen Surge in Metastatic Colorectal Cancer Patients Responding to Oxaliplatin Combination Chemotherapy: Implications for Tumor Marker Monitoring and Guidelines. J Clin Oncol. 2003; 21 (23): 4466-7.

50. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. Nat Rev Clin Oncol. 2019; 16 (7): 409-24.

51. Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S, O'Hara SM, Smirnov DA, Terstappen LWMM, et al. Isolation and Characterization of Circulating Tumor Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. Clin Colorectal Cancer. 2006; 6 (2): 125-32.

52. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. Ann Oncol. 2009; 20 (7): 1223-9.

53. Tol J, Koopman M, Miller MC, Tibbe A, Cats A, Creemers GJM, et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. Ann Oncol. 2010; 21 (5): 1006-12.

54. Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2008; 26 (19): 3213-21.

55. Barbazán J, Muinelo-Romay L, Vieito M, Candamio S, Díaz-López A, Cano A, et al. A multimarker panel for circulating tumor cells detection predicts patient outcome and therapy response in metastatic colorectal cancer. Int J Cancer. 2014; 135 (11): 2633-43.

56. Silva VS e, Chinen LTD, Abdallah EA, Damascena A, Paludo J, Chojniak R, et al. Early detection of poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer: tumor kinetics evaluated by circulating tumor cells. Onco Targets Ther. 2016; 13 (9): 7503-13.

57. Corcoran RB, Chabner BA. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. N Engl J Med. 2018; 379 (18): 1754-65.

58. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. Cancer Res. 1977; 37 (3): 646-50.

59. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. Nat Rev Clin Oncol. 2013; 10 (8): 472-84.

60. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2017; 14 (9): 531-48.

61. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102 (45): 16368-73.

62. Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. Cancer Res. 2001; 61 (12): 4675-8.

63. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. Sci Transl Med. 2014; 6 (224): 224ra24.

64. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. Clin Chim Acta. 2013; 424: 222-30.

65. Diaz LA, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. J Clin Oncol. 2014; 32 (6): 579-86.

66. Perkins G, Lu H, Garlan F, Taly V. Droplet-Based Digital PCR: Application in Cancer Research. Makowski GS. Adv Clin Chem. 2017; 79: 43-91.

67. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? Nat Rev Drug Discov. 2014; 13 (11): 828-51.

68. Thiel A, Ristimäki A. Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of BRAF. Front Oncol. 2013; 3: 281.

69. Spindler K, Appelt A, Pallisgaard N, Andersen R, Brandslund I, Jakobsen A. Cell-free DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. Int J Cancer. 2014; 135 (12): 2984-91.

70. Marchetti A, Palma JF, Felicioni L, Pas TMD, Chiari R, Grammastro MD, et al. Early Prediction of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors by Quantification of EGFR Mutations in Plasma of NSCLC Patients. J Thorac Oncol. 2015; 10 (10): 1437-43.

71. Mok T, Wu Y-L, Lee JS, Yu C-J, Sriuranpong V, Sandoval-Tan J, et al. Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. Clin Cancer Res. 2015; 21 (14): 3196-203.

72. Lee JY, Qing X, Xiumin W, Yali B, Chi S, Bak SH, et al. Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02). Oncotarget. 2016; 7 (6): 6984-93.

73. Goldberg SB, Narayan A, Kole AJ, Decker RH, Teysir J, Carriero NJ, et al. Early Assessment of Lung Cancer Immunotherapy Response via Circulating Tumor DNA. Clin Cancer Res. 2018; 24 (8): 1872-80.

74. Raja R, Kuziora M, Brohawn PZ, Higgs BW, Gupta A, Dennis PA, et al. Early Reduction in ctDNA Predicts Survival in Patients with Lung and Bladder Cancer Treated with Durvalumab. Clin Cancer Res. 2018; 24 (24): 6212-22.

75. Taus Á, Camacho L, Rocha P, Hardy-Werbin M, Pijuan L, Piquer G, et al. Dynamics of EGFR Mutation Load in Plasma for Prediction of Treatment Response and Disease Progression in Patients With EGFR-Mutant Lung Adenocarcinoma. Clin Lung Cancer. 2018; 19 (5): 387-394.e2.

76. Giroux Leprieur E, Herbretau G, Dumenil C, Julie C, Giraud V, Labrune S, et al. Circulating tumor DNA evaluated by Next-Generation Sequencing is predictive of tumor response and prolonged clinical benefit with nivolumab in advanced non-small cell lung cancer. Oncoimmunology. 2018; 7 (5): e1424675.

77. 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. 2016; 14: 95.

78. Xi L, Pham TH-T, Payabyab EC, Sherry RM, Rosenberg SA, Raffeld M. Circulating Tumor DNA as an Early Indicator of Response to T-cell Transfer Immunotherapy in Metastatic Melanoma. Clin Cancer Res. 2016; 22 (22): 5480-6.

79. 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. 2017; 28 (5): 1130-6.

80. Herbreteau G, Vallée A, Knol A-C, Théoleyre S, Quéreux G, Varey E, et al. Quantitative monitoring of circulating tumor DNA predicts response of cutaneous metastatic melanoma to anti-PD1 immunotherapy. Oncotarget. 2018; 9 (38): 25265-76.

81. Capizzi E, Gabusi E, Grigioni AD, De Iaco P, Rosati M, Zamagni C, et al. Quantification of free plasma DNA before and after chemotherapy in patients with advanced epithelial ovarian cancer. Diagn Mol Pathol. 2008; 17 (1): 34-8.

82. Parkinson CA, Gale D, Piskorz AM, Biggs H, Hodgkin C, Addley H, et al. Exploratory Analysis of TP53 Mutations in Circulating Tumour DNA as Biomarkers of Treatment Response for Patients with Relapsed High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: A Retrospective Study. PLoS Med. 2016; 13 (12): e1002198.

83. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. N Engl J Med. 2013; 368 (13): 1199-209.

84. Clatot F, Perdrix A, Augusto L, Beaussire L, Delacour J, Calbrix C, et al. Kinetics, prognostic and predictive values of ESR1 circulating mutations in metastatic breast cancer patients progressing on aromatase inhibitor. Oncotarget. 2016; 7 (46): 74448-59.

85. Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. Ann Oncol. 2015; 26 (8): 1715-22.

86. Garlan F, Laurent-Puig P, Sefrioui D, Siauve N, Didelot A, Sarafan-Vasseur N, et al. Early Evaluation of Circulating Tumor DNA as Marker of Therapeutic Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer Patients (PLACOL Study). Clin Cancer Res. 2017; 23 (18): 5416-25.

87. Spindler K-LG, Pallisgaard N, Andersen RF, Jakobsen A. Changes in mutational status during third-line treatment for metastatic colorectal cancer—Results of consecutive measurement of cell free DNA, KRAS and BRAF in the plasma. Int J Cancer. 2014; 135 (9): 2215-22.

88. Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, Jones F, Edelstein D, Iglesias M, et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. Ann Oncol. 2017; 28 (6): 1325-32.

89. Bidard F-C, Kiavue N, Ychou M, Cabel L, Stern M-H, Madic J, et al. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA Detection in Potentially Resectable Metastatic Colorectal Cancer: A Prospective Ancillary Study to the Unicancer Prodige-14 Trial. Cells. 2019; 8 (6): 516.

90. White A, Ironmonger L, Steele RJC, Ormiston-Smith N, Crawford C, Seims A. A review of sex-related differences in colorectal cancer incidence, screening uptake, routes to diagnosis, cancer stage and survival in the UK. BMC Cancer. 2018; 18 (1): 906.

91. Heinemann V, Weikersthal LF von, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran S-E, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2014; 15 (10): 1065-75.

92. Aparicio T, Ghiringhelli F, Boige V, Le Malicot K, Taieb J, Bouché O, et al. Bevacizumab Maintenance Versus No Maintenance During Chemotherapy-Free Intervals in Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Phase III Trial (PRODIGE 9). J Clin Oncol. 2018; 36 (7): 674-81.

93. Piessevaux H, Buyse M, De Roock W, Prenen H, Schlichting M, Van Cutsem E, et al. Radiological tumor size decrease at week 6 is a potent predictor of outcome in chemorefractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab (BOND trial). Ann Oncol. 2009; 20 (8): 1375-82.

94. Suzuki C, Blomqvist L, Sundin A, Jacobsson H, Byström P, Berglund Å, et al. The initial change in tumor size predicts response and survival in patients with metastatic colorectal cancer treated with combination chemotherapy. Ann Oncol. 2012; 23 (4): 948-54.

95. Mansmann UR, Sartorius U, Laubender RP, Giessen CA, Esser R, Heinemann V. Deepness of response: A quantitative analysis of its impact on post-progression survival time after first-line treatment in patients with mCRC. J Clin Oncol. 2013; 31 (Suppl 4): 427-427.

96. Antoinette Lemoine, Couraud S, Fina F, Lantuejoul S, Lamy P-J, Denis M, et al. Recommandations du GFCO pour l'utilisation diagnostique des analyses génétiques somatiques sur l'ADN tumoral circulant. Innov Ther Oncol. 2016; 2 (5): 225-32.

RESUME

INTRODUCTION : Dans le cancer colorectal métastatique (CCRm), l'évaluation d'une chimiothérapie (CT) repose sur un examen d'imagerie avant et après 2-3 mois de traitement. L'étude des marqueurs tumoraux circulants tels que l'ADN circulant total (ADNtot), l'ADN tumoral circulant (ADNtum) constituerait une approche innovante afin d'envisager un ajustement thérapeutique précoce. L'objectif était d'étudier les corrélations de trois biomarqueurs : l'ADN total circulant, l'ADN tumoral circulant et l'ACE prélevés avant les cycles de chimiothérapie 1, 2, 3 (C1, C2, C3) et lors de l'évaluation réalisée à M3, de leurs variations, de de leur cinétique avec l'évaluation selon RECIST 1.1. et avec les paramètres de survie.

METHODES : Ce travail est une analyse préliminaire de l'étude prospective, multicentrique, COCA-MACS incluant des patients traités en L1 pour un CCRm histologiquement prouvé, mesurable selon les critères RECIST 1.1, par CT +/- thérapie ciblée de juillet 2016 à février 2019. Des prélèvements sanguins ont été réalisés avant C1, C2, C3 et à 3 mois pour le dosage de l'ADNtot, de l'ADNtum et de l'ACE. La détection de l'ADNtum a été réalisée par Droplet Digital™ PCR (Bio-Rad QX200™).

RESULTATS : Au total, 70 patients ont été inclus. Respectivement, 38 (55,9 %) et 7 (10,3 %) patients présentaient une mutation de RAS ou BRAF. Les SSP et SG médianes étaient respectivement de 9,2 mois (1,1-34) et 27,1 mois (1,1-36,5). Un taux faible d'ADNtot et d'ADNtum à C1 (selon la médiane) était significativement associé à une survie prolongée avec respectivement des SSP médianes de 13,1 vs 5,7 mois (p<0,0001) et 13,1 vs 7,5 mois, (p=0,03) et des SG médianes non atteintes vs 17,7 mois (p=0,0005) et non atteintes vs 17 ,7 mois (p=0,04). Une diminution précoce de l'ADNtum entre C1 et C3, inférieure à la variation médiane de la population (87,4 %), était associée à la progression avec une sensibilité de 100 %, une spécificité de 57% et une VPN de 100 %. Une diminution précoce de l'ADNtum entre C1 et C3, supérieure à la variation médiane de la population (87,4 %), était associée et à un allongement de la SSP, à 11,8 vs 6,7 mois (p=0,007), de même que la cinétique de l'ADNtum entre C1 et C3 (11,8 vs 6,7 mois, p=0.0007). L'ACE à l'inclusion et ses variations précoces n'étaient pas associés aux données de survie.

CONCLUSION : Nos résultats confirment la valeur pronostique des valeurs de baseline de l'ADN circulant dans le CCRm. Le monitoring précoce (C1-C3) de l'ADNtum apparaît comme un marqueur fiable pour envisager de tester de manière précoce de nouvelles stratégies thérapeutiques (intensification vs désescalade) en L1 du CCRm.

MOTS CLES : ADN total circulant, ADN tumoral circulant, Cancer colorectal métastatique, Biomarqueurs.