

JUILLET 2010

SÉMINAIRE DU 6 MAI 2010

# Développer la recherche translationnelle et clinique française dans le mélanome

RÉSUMÉS DES INTERVENTIONS

## GROUPE DE TRAVAIL

### Coordonatrices

- Pr Brigitte DRENO, dermatologue, CHU, Nantes
- Pr Céleste LEBBÉ, Hôpital Saint-Louis, Paris

### Membres

- Pr Marie-Françoise AVRIL, dermatologue, Hôpital Cochin, Paris
- Pr Jean-Yves BLAY, oncologue médical, Centre Léon Bérard, Lyon
- Dr Christine CHEVREAU, oncologue médical, Institut Claudius Régaud, Toulouse
- Dr Véronique DELMAS, chercheur, Institut Curie, Paris
- Dr Florence DEMENAI, chercheur, Inserm U794, Fondation Jean Dausset-CEPH, Paris
- Pr Jean-Jacques GROB, dermatologue, Hôpital Sainte-Marguerite, Marseille
- Pr Bernard GUILLOT, dermatologue, Hôpital Saint-Eloi, Montpellier
- Dr Elif HINDIÉ, médecine nucléaire, Hôpital Saint-Louis, Paris
- Dr Véronique Lapras, Service de Radiologie, Hospices civils, Lyon
- Dr Lionel LARUE, chercheur, Institut Curie, Paris
- Dr Laurent MORTIER, dermatologue, CHRU Lille
- Pr Georges NOEL, radiothérapeute, Centre Paul Strauss, Strasbourg
- Dr Caroline ROBERT, dermatologue, Institut Gustave Roussy, Villejuif
- Pr Philippe SAÏAG, dermatologue, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt
- Dr Sophie TAIEB, imageur, Centre Oscar Lambret, Lille
- Pr Luc THOMAS, dermatologue, Hôtel Dieu, Lyon
- Dr Béatrice VERGIER, pathologiste, CHU Bordeaux

### Pour l'Institut National du Cancer

- Iris PAUपोर्टÉ, PhD, responsable de projets
- Claire VERBEKE, assistante de direction



CE DOCUMENT S'INSCRIT DANS LA MISE EN ŒUVRE  
DU PLAN CANCER 2009-2013.

## Mesure 4

**Dynamiser la recherche clinique.**



## PRÉAMBULE

L'Institut National du Cancer, agence nationale sanitaire et scientifique en cancérologie a, parmi ses missions, la mise en œuvre, le financement et la coordination d'actions de recherche en biologie, clinique et sciences humaines et sociales.

Pour cela, l'Institut a mis en place des Groupes de Recherche Clinique (GRC) ayant, entre autres, pour missions de jouer un rôle fédérateur des différents acteurs de la recherche clinique (biologistes, imageurs, chirurgiens, cancérologues, spécialistes d'organes) en intergroupes dans le but de faire émerger des projets innovants en recherche clinique (stratégies, associations, comparatifs).

Le GRC Peau et tissus conjonctifs a constaté en juin 2009 la nécessité d'une fédération au niveau national des acteurs impliqués dans la recherche clinique et translationnelle dans le domaine des mélanomes : biologistes, pathologistes, cancérologues et autres. La responsabilité d'une mission de réflexion et de mise en œuvre d'un groupe français des mélanomes a été confiée au Pr Brigitte Dreno et au Pr Céleste Lebbé. Cette mission devait s'appuyer sur des initiatives locales ou interrégionales et celles de la

Société française de dermatologie afin d'envisager les bases d'un groupe fédératif interdisciplinaire capable de répondre aux enjeux modernes des études cliniques et translationnelles.

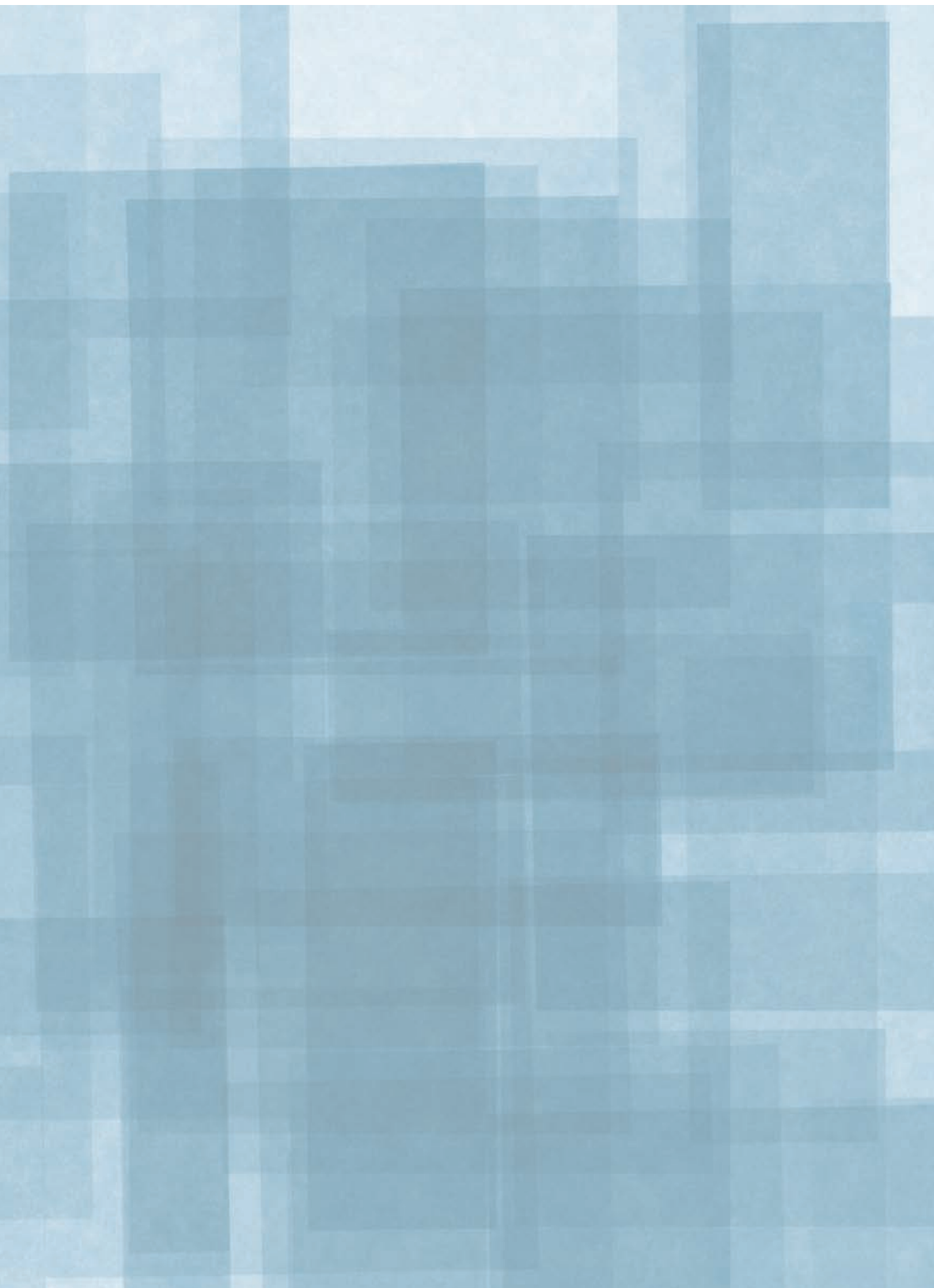
Un séminaire fondateur a eu lieu le 6 mai 2010 qui a rencontré un large succès auprès de toutes les disciplines. Près de 150 chercheurs, pathologistes, imageurs, cliniciens, se sont retrouvés pour débattre autour des thématiques sélectionnées par le comité de pilotage. Près de 60 résumés de travaux de recherche en cours ont été déposés très rapidement après un appel à abstracts ce qui témoigne de la vivacité de la recherche française dans le domaine. Nous avons décidé de vous les présenter dans ce rapport. Il serait nécessaire de poursuivre cet effort de structuration dans les années à venir notamment par l'intermédiaire de projets communs à déposer dans les appels à projets français ou européens. Ainsi, les chercheurs français dans le domaine des mélanomes pourront être mieux représentés au niveau international pour l'accès aux médicaments en développement en fournissant un front uni et multidisciplinaire associant une prise en charge optimale des patients et une recherche cognitive d'excellence.

**Pr Fabien CALVO**

Directeur de la Recherche

**Pr Jean-Yves BLAY**

Président du Groupe Recherche clinique  
Peau et tissus conjonctifs



## PROGRAMME DE LA JOURNÉE DU 6 MAI 2010

Journée organisée par le groupe multidisciplinaire français sur le mélanome cutané (GMFMel) et le Groupe de Recherche Clinique Peau et tissus conjonctifs

**09:30 – 10:00** F. CALVO - J.-Y. BLAY  
**Introduction**

---

**Présentation et objectifs du nouveau réseau national mélanome**  
B. DRÉNO

---

**10:00 – 11:00** **Épidémiologie du mélanome**  
Coordinateurs : J.-J. GROB et P. SAÏAG

---

**11:00 – 11:30** **Recherche en génétique**  
Coordinateur : F. DEMENAI

---

**11:30 – 12:30** **Recherche fondamentale**  
Coordinateur : V. DELMAS

---

**13:00 – 14:00** **Diagnostic du mélanome (Clinique, Pathologie, Imagerie)**  
Coordinateurs : L. THOMAS, B. VERGIER, E. HINDIE

---

**14:00 – 15:00** **Recherche Translationnelle dans le mélanome en France**  
Coordinateurs : M.-F. AVRIL et C. CHEVREAU

---

**15:00 – 15:30** **Synthèse**  
C. LEBBÉ

---

Les coordonnateurs organisent un exposé de 30 minutes en adoptant le plan suivant :

- État des lieux en France et évaluation au niveau international.
- Travaux de recherche et problématique de chaque domaine.
- Proposition de travaux de recherche.

Cet exposé est suivi d'une table ronde de 30 minutes animée par les coordonnateurs.

## PRÉSENTATION ET OBJECTIFS DU NOUVEAU RÉSEAU NATIONAL MÉLANOME

### Réseau français multidisciplinaire sur le mélanome cutané (RFMMC) Première rencontre sous l'égide de l'INCa

L'augmentation significative de l'incidence du mélanome qui touche des sujets jeunes ces dernières années fait de cette tumeur un axe de mobilisation important qui justifie aujourd'hui la volonté de l'INCa de mettre en place un réseau français multidisciplinaire de tous les acteurs intervenant dans la recherche autour du mélanome.

Ce réseau multidisciplinaire a pour mission d'aider à coordonner et à stimuler la recherche fondamentale, translationnelle, clinique et épidémiologique dans le domaine du mélanome.

L'objectif final est ainsi de donner une visibilité internationale à toute la recherche française sur le mélanome de manière à en faire un interlocuteur de qualité aussi bien auprès des instances européennes qu'auprès des industriels.

Ce réseau constitué de cliniciens, chercheurs, biologistes, vise à faire émerger des projets innovants dans la recherche sur le mélanome. Il doit aussi avoir un rôle fédérateur entre les différents acteurs.

Né d'une initiative du groupe d'études cliniques « Peau et tissus conjonctifs de l'INCa », il a aussi pour mission d'aider à structurer et à soutenir les projets déposés au PHRC ou tout

autre appel d'offres de l'INCa pouvant intéresser le domaine du mélanome.

Il est un interlocuteur privilégié du CenGEPS. Sa mission est aussi de faciliter les interactions avec les industriels pour pouvoir accéder aux phases de recherche clinique précoces sur les nouvelles molécules.

L'adhésion au réseau est ouverte à toute personne qui le souhaite. Il suffit pour cela d'adresser un mail à **[brigitte.dreno@wanadoo.fr](mailto:brigitte.dreno@wanadoo.fr)** ou **[celeste.lebbe@sls.aphp.fr](mailto:celeste.lebbe@sls.aphp.fr)**.

Cette réunion du 6 mai 2010 représente la première journée du réseau. Elle a donné lieu à de nombreux abstracts et communications témoins de l'intérêt que suscite le mélanome en France. Elle vise notamment à établir une cartographie des acteurs français de la recherche sur le mélanome et favoriser le développement d'interactions.

Le réseau sera un succès si nous le faisons vivre ensemble. Il doit avant tout être un outil à votre disposition et nous serons très heureux de recevoir vos propositions dans les semaines ou les mois à venir.

Bien cordialement.

**Pr Brigitte DRÉNO** (Nantes)

**Pr Céleste LEBBÉ** (Paris)

# ÉPIDÉMIOLOGIE DU MÉLANOME

Coordinateurs : J.-J. GROB et P. SAÏAG

Les sujets abordés lors de cette partie du séminaire concernent des :

- Facteurs de risques « endogènes » de développer un mélanome (population générale) :
  - mélanome cutané et facteurs hormonaux endogènes : résultats de la cohorte prospective E3N.
- Facteurs de risque « extérieurs » de développer un mélanome (population générale) :
  - étude de l'exposition aux UV solaires en Europe ;
  - évaluation du risque solaire individuel, Formation, information, désinformation sur la prévention solaire, Facteurs de risque de nævus.
- Études menées chez les patients ayant un mélanome :
  - mélanome à croissance rapide ;
  - mélanome métastatique : l'apparition spontanée d'auto-anticorps est un facteur de bon pronostic ;
  - études épidémiologiques du mélanome dans l'inter-région Nord-est : une approche des inégalités face au cancer ;
  - étude de l'impact de l'exposition solaire et du statut vitaminique D sur le pronostic des mélanomes malins.

Lors de la table ronde, les aspects suivants ont été abordés :

- forces et faiblesses de la recherche épidémiologique sur le mélanome en France ;
- dégager des collaborations ;
- place de la France dans une perspective européenne/monde ;
- cerner des axes d'améliorations réalistes.

## 1. ÉTUDE DE L'EXPOSITION AUX UV SOLAIRES EN EUROPE (PROJETS UV-FRANCE ET EUROSUN)

■ BONIOL M *et al.* ■ International Prevention Research Institute (iPRI), Lyon

L'objectif général du projet est de développer un outil de mesure de l'exposition des personnes et des populations au rayonnement ultraviolet solaire utilisant les données de satellites météorologiques. Cet outil pourra permettre de quantifier le spectre de l'exposition aux UV en France et en Europe, et d'étudier ses effets sur l'incidence des cancers cutanés, mais aussi d'autres cancers (lymphomes non hodg-

kiniens notamment) et de pathologies oculaires : cataracte et dégénérescence maculaire liée à l'âge. Le projet est actuellement bien avancé : l'atlas d'irradiation UV est réalisé, l'étude des expositions a été conduite en France et se poursuit dans d'autres pays européens. Un site web est en cours de réalisation pour diffuser ces résultats à la communauté scientifique.

## 2. ANALYSE DES TENDANCES TEMPORELLES D'INCIDENCE ET DE MORTALITÉ DU MÉLANOME CUTANÉ

■ BONIOL M *et al.* ■ International Prevention Research Institute (iPRI), Lyon

L'épidémiologie descriptive de l'incidence et de la mortalité du mélanome nous permet de mieux connaître son impact actuel et son évolution. Notamment, nous avons décrit une diminution de l'incidence des stades avancés et de la mortalité pour les femmes en Irlande du Nord. Ce changement ayant démarré autour des années 1990, nous suspectons que le mélanome cutané a subi un véritable changement de nature avec actuellement de nouvelles formes moins invasives.

L'analyse des tendances temporelles d'incidence en Islande, nous a permis de montrer l'existence d'une véritable épidémie

de mélanomes chez les femmes jeunes. Cette « épidémie » étant contemporaine des changements d'expositions aux solariums.

Enfin, nous nous sommes également intéressés à l'étude de la variation saisonnière d'incidence des mélanomes cutanés qui sont plus fréquemment diagnostiqués en été. Cette variation saisonnière a fait l'objet de nombreuses hypothèses et nécessite encore de nombreuses études. Il est probable que cette variation saisonnière nous renseigne sur la possibilité d'effets de promotion (à très court terme) des expositions ultraviolets.

## 3. ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES DU MÉLANOME DANS L'INTER-RÉGION NORD-EST : UNE APPROCHE DES INÉGALITÉS FACE AU CANCER

■ GRANGE F<sup>1</sup>, BARBE C<sup>2</sup>, VITRY F<sup>2</sup>, LIPSKER D<sup>3</sup>, AUBIN F<sup>4</sup>, HÉDELIN G<sup>5</sup>, DALAC S<sup>6</sup>, TRUCHETET F<sup>7</sup>, MICHEL C<sup>8</sup>, BATARD ML<sup>9</sup>, GRANEL-BROCARD F<sup>10</sup>, LE CLAINCHE A<sup>2</sup>, HALNA JM<sup>5</sup>, DALLE S<sup>11</sup>, HIBON E<sup>12</sup>, BERNARD P<sup>1</sup>, LAVOLE B<sup>13</sup>, COLOMB M<sup>13</sup>, DANZON A<sup>5</sup>

■ <sup>1</sup>Service de dermatologie, CH(U) de Reims ; <sup>2</sup>CRICAM Reims<sup>2</sup> ; <sup>3</sup>Strasbourg ; <sup>4</sup>Besançon ; <sup>5</sup>registres des cancers-FRANCIM ; <sup>6</sup>Dijon ; <sup>7</sup>Thionville ; <sup>8</sup>Mulhouse ; <sup>9</sup>Colmar ; <sup>10</sup>Nancy ; <sup>11</sup>Lyon ; <sup>12</sup>CRISAP Champagne-Ardenne ; <sup>13</sup>Réseau ONCOCHA

### INTRODUCTION

L'étude des inégalités face au cancer et leur réduction sont un des axes prioritaires du Plan cancer 2009-2013. Une série d'études épidémiologiques observationnelles a été réalisée dans l'inter-région NE depuis 2004 concernant le

mélanome (M), la variabilité des pratiques, la prise en charge des sujets âgés, les inégalités géographiques, les facteurs associés aux M épais. Des études complémentaires et/ou interventionnelles visant à préciser et corriger ces inégalités ont été entreprises.



## PATIENTS ET MÉTHODES

Une enquête rétrospective auprès des dermatologues (D), des registres des cancers et des laboratoires de pathologie a permis de recueillir avec une exhaustivité estimée à 83 % des informations détaillées sur les M diagnostiqués en 2004 en Alsace, Lorraine, Champagne-Ardenne (CH-A), Bourgogne, Franche-Comté (8,2 M.habitants), incluant leurs circonstances de diagnostic, leurs caractéristiques et leur prise en charge réelle. Les facteurs associés à telle ou telle variabilité de prise en charge ont été étudiés par régression logistique multivariée. Les différences de prise en charge selon l'âge (< vs > 70 ans) ont été étudiées. Ces données ont été à nouveau recueillies pour les M diagnostiqués en 2008. Dans la région CH-A où il n'existe pas de registre des cancers, un Observatoire du Mélanome (OMECHA) a été créé. L'épaisseur au diagnostic a été comparée selon l'âge, le sexe, ainsi qu'entre les départements et entre les régions.

## RÉSULTATS

Des données détaillées ont été obtenues pour 710 M, survenus en 2004 chez 373 F et 332 H d'âge moyen de 58 ans. L'indice de Breslow moyen était plus élevé chez les H que chez les F (1,9 vs 1,35 mm,  $p = 0,03$ ). Les malades étaient pris en charge dans une filière de soin purement libérale dans 42 % des cas, impliquant l'hôpital dans 52 % (75 % pour les M > 1,5 mm), un centre de lutte contre le cancer (CLCC) dans 4 %. Le dossier était discuté en RCP dans 29 % des cas, plus souvent pour les tumeurs épaisses, dans la filière hospitalière et dans certaines régions. L'exérèse initiale était le plus souvent réalisée par un D libéral (70 %), la reprise par un chirurgien (63 %). Des marges étroites (8 % des cas) étaient associées à un âge élevé, aux tumeurs épaisses et au siège céphalique. L'étude du ganglion sentinelle (34 % des M > 1 mm) était associée aux filières « hospitalière/CLCC » et à la région. Des traitements adjuvants (surtout interféron faible dose) étaient proposés pour 53 % des M > 1,5 mm, en fonction de l'âge et de la région. Le bilan initial comportait dans 83 % des examens d'imagerie. La périodicité du suivi suivait les recommandations, mais des imageries systématiques étaient prescrites près d'une fois sur deux. Des différences significatives étaient observées chez les plus de 70 ans à tous les stades de la prise en charge : délais plus longs, marges plus faibles, moins de recours à l'hôpital, moins de RCP, moins de traitements adjuvants, moins de ganglions sentinelles, moins d'imagerie.

L'étude des circonstances du diagnostic des M montrait que le mode d'accès le plus fréquent au D en 2004 était la consultation directe (45 %). Les malades adressés par

des MG (26 %) avaient la plus grande fréquence de M épais (> 3 mm), nodulaires et/ou ulcérés. Les M dépistés par des D lors d'un suivi de nævus (8,4 %) ou d'une consultation pour un autre motif (14 %) étaient les plus fins. En analyse multivariée, le dépistage par un D et une densité géographique élevée de D autour du domicile du malade étaient associés à un Breslow fin indépendamment de l'âge et du type histologique du M.

L'Observatoire OMECHA a permis recueillir 135 M *in situ* et 484 M invasifs diagnostiqués entre 2004 et 2007 en CH-A. L'indice de Breslow (médiane 1 mm ; moyenne 2,05 mm) était nettement supérieur à celui des 623 M recensés en 2004 dans les 4 autres régions du NE (médiane 0,78 mm ; moyenne 1,59 mm). Il était nettement plus épais chez les sujets âgés. De plus, on notait des inégalités intra-régionales entre les départements, avec une tendance à observer des M plus épais dans les départements ruraux et peu peuplés.

## ÉTUDES EN COURS, ÉTUDES INTERVENTIONNELLES, PERSPECTIVES

Les résultats de l'étude des pratiques en 2004 ont été communiqués et cette étude a été renouvelée pour l'année 2008. Les nouveaux résultats sont en cours d'analyse. L'impact de la réforme du « parcours de soins » sur le diagnostic du M sera étudié. Une étude complémentaire visera à identifier, pour les M diagnostiqués en 2008, les caractéristiques sociodémographiques des malades atteints de M épais, comparés aux M fins.

Certains M particuliers, et plus graves, nécessitent des études spécifiques : une étude basée sur la population de CH-A et de Franche-Comté est en cours avec l'aide du registre du Doubs et de l'observatoire OMECHA concernant les M des extrémités et les ALM.

Sur le plan interventionnel, une large action de sensibilisation et de formation des médecins généralistes (MG) et des médecins du travail (MT) au diagnostic précoce du M a été déployée dans le Haut-Rhin en 2004. Trois-cent-cinquante médecins, incluant 44 % des MG du département et 60 % des MT ont participé à 18 séances de FMC réalisées par 2 D formateurs. Le même type d'action a été réalisé en 2008 dans la région CH-A à une plus vaste échelle, associant D et MG et comportant un axe de communication plus large vers le public. Sis-cent-huit professionnels de santé, incluant 26 % des MG de la région et 42 % des MT ont participé à 40 séances de FMC réalisées par 27 D formateurs. Les résultats de ces deux actions seront évalués grâce au registre des cancers du Haut-Rhin et à l'Observatoire OMECHA.

## 4. ÉTUDE DES FACTEURS DE RISQUE ET CARACTÉRISATION CLINIQUE DES MÉLANOMES À CROISSANCE RAPIDE (MMCR)

■ GROB JJ *et al.* ■ Hôpital Sainte-Marguerite, Marseille

### INTRODUCTION

Différents patterns de croissance au sein des MM :

- concept de MM à croissance rapide (MMCR) ;
- plus mauvais pronostic (Grob Int J Cancer. 2002) à Breslow égal.

Pourrait être une des causes de l'échec du screening/diagnostic précoce (stabilité de l'incidence des tumeurs épaisses).

Tumeurs biologiquement différentes : Comment les identifier, les prévenir ?

- caractéristiques cliniques particulières ? souvent nodulaires symétriques, achromiques à bords réguliers (Liu Arch Dermatol 2006) ;
- facteurs de risque particuliers ? hommes âgés, peu de nevi, peu d'éphélides, peu d'association aux expositions solaires (Liu Arch Dermatol 2006) ;
- profils moléculaires particuliers ? peu de mutations de B-RAF, présence de mutations de N-RAS (Liu 2006, Liu 2008, Purdue 2005, Sasaki 2004).

### OBJECTIF

Identifier les facteurs de risque et les caractéristiques cliniques des MMCR dans une population de patients avec MM primitifs de Breslow  $\geq$  1mm.

### MÉTHODES

Étude épidémiologique multicentrique. Quatre centres : Marseille, Paris, Lyon, Reims. 472 patients.

### DURÉE DES INCLUSIONS

3 ans. Financements : APHM /SFD. Début des inclusions prévu courant 2010.

### DÉFINITION DES MMCR

- Méthode de calcul de la vitesse de croissance (Grob 2002, reprise par Liu 2008) : Rate of Growth = Thickness/Time between first detection of a change (t2) and resection (tR).
- Australie (Liu 2006) : 1/3 de la population étudiée, VDC  $>$  0,5mm/mois.
- Pas de définition consensuelle des MMCR.
- Notre choix : ne pas définir les MMCR *a priori* mais les définir comme ceux ayant la vitesse de croissance la plus rapide dans notre population.

MM classés à la fin de la période d'inclusion.

Le 25ème percentile des VDC les plus rapides définira les MMCR :

- Comparaison MMCR (cas) vs reste de la population (témoins).

### VARIABLES ÉTUDIÉES

- Caractéristiques cliniques au moment de et avant l'exérèse *via* la présentation d'un panel de photographies incluant les principales formes morphologiques (forme, taille, couleur) des nævus, nævus atypiques et mélanomes).
- Facteurs de risque potentiels : caractéristiques démographiques, localisation, mode de détection, visibilité, délai nécessaire au diagnostic, facteurs de risque de cancers cutanés, phototype, caractéristiques pigmentaires, phénotype nævique.
- Caractéristiques histologiques.
- Caractéristiques biologiques :
  - marqueurs de prolifération (ki67, PH3) et de lymphangiogénèse (LYVE-1, VEGFR-3 et Podoplanine) ;
  - angiogénèse tumorale (CD31, CD34, facteur Von Willebrand, CD105/endogline, actine musculaire lisse, NG2) ;
  - profil moléculaire : mutations de BRaf et NRas.

## 5. MÉLANOME CUTANÉ ET FACTEURS HORMONAUX ENDOGENES: RÉSULTATS DE LA COHORTE PROSPECTIVE E3N

■ KVASKOFF M<sup>1,2</sup>, BIJON A<sup>1,2</sup>, MESRINE S<sup>1,2</sup>, BOUTRON-RUAULT MC<sup>1,2</sup>, CLAVEL-CHAPELON F<sup>1,2</sup>

■ <sup>1</sup>Inserm U1018, Centre de recherche en Épidémiologie et Santé des Populations (CESP), Équipe 9 : « Nutrition, Hormones et Santé de la femme », Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif ; <sup>2</sup>Université Paris Sud 11, UMRS 1018, 94805 Villejuif

### INTRODUCTION

Plusieurs observations ont mené à l'hypothèse d'une dépendance hormonale du mélanome ; cependant, les résultats des précédentes recherches étaient incohérents en ce qui concerne l'influence des facteurs reproductifs et hormonaux sur le risque de mélanome, et la plupart d'entre eux reposaient sur une méthodologie d'étude cas-témoin.

### MÉTHODES

Afin d'évaluer le rôle de ces facteurs sur le risque de mélanome, nous avons mené une analyse prospective de 91 972 femmes françaises affiliées à la Mutuelle générale de l'éducation nationale, âgées de 40 à 65 ans à l'inclusion dans la cohorte E3N (étude épidémiologique auprès de femmes de l'éducation nationale). Les données sur les facteurs reproductifs et hormonaux ont été collectées à l'inclusion et ont été mises à jour environ tous les deux/trois ans. Entre 1990 et 2005, 460 cas incidents de mélanome ont été déclarés et confirmés par compte rendu anatomopathologique. Les risques relatifs (RR) ont été calculés en utilisant des modèles de Cox, ajustés sur les facteurs phénotypiques (nombre de nævi, nombre de taches de rousseur, couleur de la peau, couleur des cheveux, et sensibilité de la peau à l'exposition au soleil), la dose journalière moyenne de rayonnement ultraviolet dans la région de naissance et à l'inclusion, les antécédents d'endométriose et de fibrome, l'âge à la

ménarche, la durée des cycles menstruels, la parité, l'âge à la ménopause, et le niveau d'éducation.

### RÉSULTATS

Nous avons observé une relation inverse significative entre le risque de mélanome et une ménarche tardive (RR=0,68, intervalle de confiance 95 % (IC) = 0,47-0,99 ; pour une ménarche  $\geq$  15 ans comparé à 13-15 ans), et l'irrégularité des cycles menstruels (RR = 0,54, IC 95 % = 0,31-0,91; comparé à des cycles réguliers de 25-31 jours). Une ménopause précoce était associée de façon marginalement significative au risque de mélanome (RR = 0,72, IC 95 % = 0,51-1,02, pour une ménopause < 48 ans comparé à 48-52 ans). Les autres facteurs reproductifs étudiés (parité, nombre de grossesses, âge à la première grossesse, antécédents de fausse-couche) n'étaient pas significativement associés au risque de mélanome dans notre étude.

### CONCLUSION

Nos résultats suggèrent une association inverse entre le mélanome et certains facteurs menstruels. Ces résultats provenant d'une grande enquête de cohorte prospective suggèrent un rôle des hormones endogènes sur le risque de mélanome chez les femmes. Les mécanismes biologiques qui sous-tendent ces résultats sont peu clairs à ce jour et devraient être davantage explorés par le biais d'études expérimentales.

## 6. PRÉVENTION PRIMAIRE ET SECONDAIRE DES CANCERS CUTANÉS

■ MAHÉ E, BAUCHET A, FAY-CHATELARD F, SAÏAG Ph ■ EA4339 - Université Versailles-Saint-Quentin en Yvelines

### ÉVALUATION DU RISQUE SOLAIRE INDIVIDUEL :

- collaboration avec des physiciens du climat afin de : corréler les mesures satellites-mesures au sol, définir des capteurs UV individuels fiables, utiliser ces techniques dans des campagnes de mesures (paris, tournois sportifs, parcours touristiques) afin de mieux définir les risques individuels ;
- travaux sur les indices de confort cutané afin de mieux comprendre les comportements d'exposition et l'épidémiologie du mélanome en France ;

### FORMATION, INFORMATION, DÉSINFORMATION SUR LA PRÉVENTION SOLAIRE :

- travail sur l'information concernant la prévention solaire. Information transmise aux patients par les médias : messages sur internet, problème des lobbies de cabines UV ;
- information connue et transmise par les professionnels de la santé : pédiatres et étudiants en médecine ;
- information et formation chez l'enfant : étude de la cohorte « Tête Brûlée 2007 » ;
- idées reçues (coût, efficacité) sur les crèmes solaires.

### FACTEURS DE RISQUE DE NÆVUS :

- travaux sur les facteurs de risque de nævus : marqueurs de risque d'exposition solaire chez l'enfant et probablement de risque de mélanome précoce. Travaux sur des cohortes : « Tête Brûlée 2007 », « ELFE ».

### COLLOQUES RISC-UV :

- organisation en 2009 et 2010 des 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> colloques RISC-UV visant à faire interagir des intervenants de la prévention solaire d'horizons différents ;
- 1<sup>er</sup> Colloque Risc-UV, janvier 2009. Physiciens du climat-dermatologues ;
- 2<sup>ème</sup> Colloque Risc-UV, novembre 2010. Épidémiologistes-gestionnaires de risques-épidémiologistes (+Physiciens du climat-dermatologues).

# RECHERCHE EN GÉNÉTIQUE

Coordinateur : F. DEMENAI

## PROJETS DE RECHERCHE EN COURS :

- recherche de mutations rares conférant un risque élevé de mélanome : gènes candidats, cartographie fine des régions de liaison identifiées par criblage du génome ;
- recherche de variants génétiques rares conférant un risque modéré : gènes candidats, régions identifiées par études d'association pangénomiques ;
- recherche de variants fréquents conférant un risque faible /modéré : études d'association pangénomiques, approches gènes-pathways candidats ;
- études d'expression des gènes (+ souvent dans des modèles animaux) ;
- recherche clinique/translationnelle associée aux études génétiques.

## PHÉNOTYPES CONCERNÉS :

- mélanome (et sous-groupes) ;
- phénotypes pigmentaires, nævus ;
- marqueurs du pronostic et de l'évolution.

Collections de familles, cas-témoins (données phénotypiques, environnementales), MELA-RISK, MelanCohort associés à des échantillons biologiques : dérivés du sang principalement mélanocytes, tumeurs (disponibles dans des modèles animaux essentiellement).

Études chez l'homme + modèles animaux (porc, chien).

Études menées par des équipes françaises + collaborations Internationales.

## PERSPECTIVES :

- étude fine des loci caractérisés pour aboutir à l'identification des variants causaux ;
- combiner les études d'association génétiques et les études d'expression des gènes à différents stades du développement tumoral (mélanocyte, nævus, mélanome) ;
- développer les études de génétique/génomique comparative homme/modèles animaux ;
- développer les études génétiques combinées de mélanome et d'autres cancers (déterminants communs) ;
- élucider le rôle fonctionnel des variants génétiques identifiés → recherche fondamentale ;
- étudier les applications potentielles des études génétiques → recherche translationnelle :
  - évaluer l'intérêt du test génétique des mutations/variants génétiques identifiés sur la prise en charge et la surveillance ciblée ;
  - études de pharmacogénétique.
- utilité d'augmenter les collections cliniques associées à des collections biologiques (sang, tissus sains, tumeurs) ;
- faciliter l'accès aux nouvelles technologies et études « omiques » à haut débit pour combiner les études génétiques au niveau constitutionnel, génomiques au niveau tumoral, transcriptomiques, épigénomiques...
- développer les méthodologies statistiques et bioinformatiques pour intégrer les études « omiques » et évoluer vers une biologie des systèmes ;
- développer la multidisciplinarité.

## 7. LES MÉLANOMES CHEZ LE CHIEN : CARACTÉRISATION DE L'HOMOLOGIE AVEC LES MÉLANOMES HUMAINS ET RECHERCHE DES BASES GÉNÉTIQUES

■ André C *et al.* ■ CNRS - Rennes

Nous travaillons sur les cancers chez le chien en tant que modèle pour identifier de nouveaux gènes de prédisposition ainsi que des mutations somatiques spécifiques afin de transférer ces connaissances à l'Homme. En effet, chaque race de chien pouvant être considérée comme un isolat génétique, se trouve « enrichie » en certains allèles, sélectionnés pour se conformer au « standard de race ». Cette sélection artificielle a eu pour conséquence l'apparition de nombreux cancers différents, spontanés chez le chien, spécifiques de races et ségrégant avec de fortes fréquences. Qui plus est ces tumeurs sont homologues aux tumeurs humaines, tout au moins sur le plan clinique et de réponse aux traitements. Nous avons débuté un travail sur le mélanome depuis deux ans par la collecte de cas et de contrôles pour des mélanomes muqueux (fréquents chez le chien et spécifiques de certaines races), des mélanomes cutanés (moins fréquents, mais là encore spécifiques de races), ainsi que des mélanomes oculaires, moins sévères que chez l'Homme, mais présentant aussi des prédispositions raciales.

En collaboration avec des vétérinaires (réseau que j'ai développé, avec une banque d'ADN et tissus), nous caracté-

risons ces mélanomes sur le plan clinique, histologique et moléculaire (profils d'expression, séquençage de gènes fréquemment mutés chez l'Homme...). Nous procéderons à une étude d'association cas/contrôles, quand nous aurons collecté au moins 100 cas et 100 contrôles (bien moins que chez l'Homme, car les régions en déséquilibre de liaison sont plus grandes que chez l'Homme au sein d'une race). Nous disposons tout récemment d'une puce SNP dédiée au chien de 170 000 SNP, pour laquelle nous avons participé à la validation sur un panel de races de chiens.

Pour finir, le chien présente également un intérêt très particulier pour des essais cliniques, plus accessibles que chez l'Homme et qui présentent le double avantage de tester des thérapies pour le bénéfice de l'Homme, mais aussi du chien lui-même dans un contexte de consultations vétérinaires.

Plusieurs cliniciens et généticiens se sont très récemment intéressés à ce modèle et il serait intéressant de se rapprocher pour allier différents « modèles » et utiliser leur complémentarité.

## 8. MELARISK – ÉTUDE PILOTE DANS UNE COHORTE DE FAMILLE À RISQUE

■ AVRIL MF, DEMENAI F, MAUBEC E, CHAUDRU V, MOHAMDI H, THOMAS L, GRANGE F, CHEVRANT-BRETON J, VINCENT-FETITA L

■ Hôpital Cochin, Inserm U794, CEPH, Institut Gustave Roussy, Villejuif, Hôpital Bichat

Nous avons mené une étude pilote dans 28 familles de notre collection MELARISK, avec une mutation identifiée de CDKN2A, qui a montré, au cours de périodes de surveillance variant de 2 à 27 ans selon les familles, la découverte de 20 nouveaux mélanomes primitifs (14 chez des malades et 6 chez des apparentés, tous porteurs de mutation de CDKN2A). De manière intéressante, l'épaisseur des mélanomes découverts était plus faible après la connaissance du risque familial puis le résultat du test génétique, cette faible épaisseur étant un bon indicateur d'un meilleur pronostic (Toulon *et al.*, 2003). Parallèlement, la surveillance pendant 3 ans, de

67 cas sporadiques avec des mélanomes primitifs multiples, a également permis d'identifier de nouveaux mélanomes de faible épaisseur (Breslow < 0,5 mm). Cette étude pilote suggère que le test pourrait être utile puisque, parmi les nouveaux mélanomes découverts, deux sur six sont survenus chez des malades avec mutations et trois sur 61 chez des malades sans mutations identifiées. En outre, cette étude a montré une association du MMC avec d'autres carcinomes cutanés (20 % des malades), l'identification d'autres cancers (sein, endomètre, prostate, pancréas) chez 15 % des malades et la découverte au cours de l'évolution de formes familiales.

Nous avons entrepris de confirmer ces résultats préliminaires sur un plus grand nombre de familles porteuses de mutations de CDKN2A (125 familles) et de les comparer aux résultats de la surveillance dans des familles sans mutation identifiée (520 familles). Ce travail est également prévu dans toute la série de cas de mélanomes multiples sporadiques. L'objectif final est de déterminer si la pra-

tique du test génétique est utile pour le diagnostic précoce du mélanome dans ces groupes à risques.

La caractérisation d'autres cancers au niveau individuel et familial en fonction des mutations identifiées permettrait d'inclure des mesures de prévention de ces cancers dans le programme de surveillance.

## 9. ÉTUDE D'UN MODÈLE DE MÉLANOME CHEZ LE PORC

■ BOURNEUF E, VINCENT-NAULLEAU S. *et al.* ■ Centre d'Énergie Atomique (CEA)

Notre équipe travaille sur un modèle de mélanome cutané chez le porc. Les animaux développent spontanément des lésions cutanées qui apparaissent très précocement autour de la naissance. Ces lésions et leur dissémination métastatique présentent des similitudes avec les lésions humaines à la différence près que chez les porcs après 2-3 mois d'évolution, les lésions régressent spontanément chez la majorité des animaux. Dans ce modèle, nous étudions la susceptibilité génétique par des approches de balisage du génome à l'aide de puces SNP pangénomiques (60K) ou dédiées à des régions chromosomiques porcines, ou par l'étude de gènes candidats (MC1R, CDKN2A, MITF...). La cartographie comparée entre les génomes humain et porcin a permis de mettre en évidence que certaines régions

associées au développement de mélanomes chez le porc correspondent à des intervalles contenant des gènes de susceptibilité chez l'homme. En parallèle, nous étudions également les facteurs moléculaires impliqués dans l'apparition et la régression du mélanome chez le porc. Une première étude des profils d'expression de tumeurs au cours de la régression a permis de décrire une signature de la régression chez le porc et a montré l'implication de gènes majeurs dans le processus invasif chez l'homme mais avec une régulation opposée. L'ensemble de ces travaux visent à une meilleure connaissance du développement du mélanome chez le porc mais surtout à améliorer la prise en charge et le diagnostic du mélanome chez l'homme.

## 10. GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE MÉLANOME ET SON ÉVOLUTION : RECHERCHE ÉTIOLOGIQUE ET TRANSLATIONNELLE

■ DEMENAI F, BRESSAC-DE PAILLERETS B, MAUBEC E, CHAUDRU V, CORDA E, MOHAMDI H, JEANNIN P, DE LICHY M, VINCENT-FETITA L, AVRIL MF

■ Hôpital Cochin, Inserm U794, CEPH, Institut Gustave Roussy, Villejuif, Hôpital Bichat

Notre programme de recherche s'articule autour de la collection MELARISK, initiée par MF Avril et F Demenais dans les années 80 et établie avec des dermatologues et oncogénéticiens au niveau national. La collection biologique est conservée dans le CRB de l'IGR et une partie est également stockée dans le CRB du CEPH. La collection MELARISK comprend des cas familiaux de mélanome et leurs apparentés et plusieurs séries de cas de mélanome sporadiques à occurrence multiple, apparaissant à un âge jeune et/ou associés à d'autres cancers (au total, plus de 3 000 sujets avec des échantillons biologiques et des données cliniques, histologiques, phénotypiques et environnementales). Une partie de ce pro-

gramme se fait en lien étroit avec le Consortium international sur la génétique du mélanome (consortium GenoMEL/FP6).

L'objectif général de nos recherches est d'identifier les gènes impliqués dans la survenue du mélanome et son évolution, d'élucider les relations génotypes/phénotypes/environnement et de réaliser une évaluation clinique des tests génétiques (CDKN2A) sur la survenue et l'évolution de ce cancer.

Les principaux travaux actuels incluent :

- La caractérisation de gènes prédisposant à des entités particulières, mélanome à forte agrégation familiale,

association de mélanomes et d'autres cancers et l'étude de ces gènes sur le plan fonctionnel en collaboration avec des équipes du réseau mélanome IDF (cancéropole IDF).

- L'identification de variants génétiques associés à la survenue et à l'évolution du mélanome par une étude d'association pangénomique à l'aide de différentes méthodes simples marqueurs et multi-marqueurs (identification de pathways) et par une approche de génomique comparative avec des modèles animaux (modèle porc en collaboration avec l'équipe du CEA/INRA-UMR1313 (E Bourneuf, S Vincent-Naulleau) et modèle chien avec l'équipe du CNRS-UMR601 (C. André). Les phénotypes associés au mélanome (pigmentation, nevus) et ceux associés à son pronostic sont aussi explorés afin d'élucider les relations gènes/phénotypes/environnement dans le déterminisme et l'évolution de ce cancer. Ces études se font en collaboration avec le Centre national de génotypage (CNG, M Lathrop).
- Une recherche clinique et translationnelle incluant :

- la caractérisation clinique et phénotypique de nouvelles entités comme les associations de cancers ;
- l'identification des facteurs qui prédisent la présence de mutations du gène *CDKN2A* selon le degré d'agrégation familiale ;
- l'évaluation de l'impact du test génétique des mutations du gène *CDKN2A* sur la survenue et l'évolution du mélanome ;
- la définition des bonnes pratiques de prescription et de prise en charge de ce test génétique (réseau oncogénétique).

Ces travaux conduiront à identifier les mécanismes génétiques prédisposant au mélanome (ou en association avec d'autres cancers) et ceux pouvant jouer un rôle dans son évolution. Ils permettront de mieux comprendre les relations gènes, phénotypes (pigmentation, nevus, marqueurs du pronostic), environnement (exposition aux UV) et cancer et, à terme, d'améliorer les stratégies de prévention et de surveillance ciblées sur des groupes à risque.

## 11. RECHERCHE DE VARIANTS GÉNÉTIQUES RARES INFLUENÇANT LE RISQUE DE MÉLANOME DANS LES POPULATIONS EUROPÉENNES PAR UNE NOUVELLE APPROCHE MULTIDISCIPLINAIRE

■ F. LESUEUR *et al.* ■ International Agency on Research on Cancer

L'étude EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition) est une étude prospective multicentrique mise en place il y a plus de 15 ans pour étudier les relations entre nutrition, style de vie et facteurs environnementaux et l'incidence du cancer et des maladies chroniques en Europe. Plus de 520 000 sujets originaires de 10 pays européens ont été enrôlés dans cette étude. En décembre 2009, 1 069 participants ayant fourni un prélèvement sanguin avaient développé un mélanome malin. Nous avons mis en place une étude cas-témoins nichée au sein de la cohorte EPIC afin d'étudier la contribution des différents types de variations génétiques sur le risque de mélanome. Des études pangénomiques ont impliqué des SNPs fréquents (> 1-5 % dans la population) dans l'étiologie du mélanome. Ces SNPs sont associés à un risque relativement faible de développer la maladie (RR<1,5), contrairement aux mutations dans les gènes *CDKN2A* et

*CDK4*, responsables de la maladie dans 20 à 25 % des familles prédisposées. L'existence d'autres gènes « forts » étant peu probable et les SNPs ne pouvant expliquer plus de 12 % du risque familial, nous nous intéressons plus particulièrement à la classe des gènes dits « intermédiaires ». Les tests d'association classiques ne peuvent s'appliquer aux variants peu représentés dans la population. Nous avons donc développé une nouvelle stratégie d'analyse applicable à cette catégorie de variants. Nous avons récemment validé notre approche dans le modèle du cancer du sein. Les substitutions faux-sens identifiées par criblage mutationnel des gènes candidats sont classées en différents grades par une approche bioinformatique, selon leur probabilité d'être délétère. La classification des variants repose sur l'histoire évolutive de la protéine. L'association entre les différents grades et la maladie est ensuite testée par régression logistique.



## 12. RECHERCHE DE GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA PRÉDISPOSITION ET LA PROGRESSION DU MÉLANOME

■ SOUFIR N, DESCAMPS V, BASSET-SEGUIN N, HUI-HAN H, MAIDER I

■ Laboratoire de Biochimie Hormonale et Génétique, Hôpital Bichat, Inserm U596 (Centre de recherche sur la peau, Hôpital Saint-Louis)

### CONTEXT

Melanoma represents a major and growing public health problem. At the present time, several genetic markers have been identified that modulate melanoma susceptibility and the mainly implicated in pigmentation (*MC1R*, *ASIP*, *TYR*, *TYRP1*), DNA repair (*XPC*, *ERCC2*, *POLH*). In addition, auto-immune factors and DNA repair genes have been suggested to modulate melanoma progression. Our aim is to further identify risk alleles for MM susceptibility and genetic biomarkers of melanoma progression and prognosis using a candidate gene strategy. Our ultimate goal is to propose new therapeutic targets or tools for the treatment of melanoma.

### DESCRIPTION OF THE PROJECT

Our objective is to characterize genetic variants implicated in susceptibility to melanoma and in melanoma progression. We propose a candidate gene strategy, the studied candidate genes being implicated in pigmentation, immune response (auto-immunity, innate immunity and adaptive response), DNA repair and cell cycle. Two groups of subjects will be studied.

- A cohort of melanoma patients (1200 patients included)
- A cohort of healthy control subjects with no personal or familial history of skin cancer (1600 currently included) prospectively enrolled at the Établissement français du sang (EFS).

Two types of analyses will be carried out: case-control studies between each group of patients and the group of controls in order to search for melanoma susceptibility genetic biomarkers, and studies to find out genetic biomarkers associated with melanoma progression. Six hundred candidate genes (approximately 6000 SNPs with on average, 10 SNPs by gene) will be studied, according to a double strategy. Known or predicted functional SNPs (non synonymous and/or affecting mRNA splicing and/or disrupting potential sites of miRNA or transcription factor fixation) with a frequency  $\geq 5\%$  will be genotyped in priority.

Genes without functional SNPs will be explored by genotyping Tag SNPs. Made-to-order Illumina chips according to Infinium technology will be used to carry out genotyping. Statistical analyses will be conducted to investigate: 1) Association between SNPs belonging to the selected candidate genes and predisposition to melanoma. 2) Association between SNPs and melanoma prognostic factors and progression will be evaluated by (i) the effect of SNPs on Breslow index, (ii) comparing lymphatic sentinel node invasion (SNLB+ and SNLB - subjects); (iii) association study of SNPs with overall survival (OS) and disease free survival (DFS) at 60 months

Association between each SNP and melanoma susceptibility or melanoma progression will be assessed by logistic regression. Polymorphisms that had shown an association with melanoma susceptibility or evolution in the French Cohort will be tested in a German Cohort (1000 patients), a Spanish cohort of melanoma (800 patients) and in an Italian cohort (300 patients).

In parallel, functional consequences the associated-polymorphisms will be assessed by studying their effect on human and murine melanocytes or keratinocytes, the immune system, the cell cycle, and DNA repair.

### EXPECTED RESULTS

We thus think identify genetic biomarkers implicated in susceptibility and progression to melanoma. Finding of such variants may have multiple implications.

- 1) Melanoma risk genetic biomarkers might be very useful to identify more precisely patients to be target for skin cancer prevention and clinical survey
- 2) The identification of genetic biomarkers linked to melanoma prognosis could allow identifying new therapeutic targets, and/or defining groups of subjects having high-risk alleles that could beneficiate from a particular survey and/or treatment (targeted therapies...).



## RECHERCHE FONDAMENTALE

Coordinateur : V. DELMAS

Le mélanome est une tumeur complexe qui associe des altérations génétiques à des facteurs environnementaux. Bien que les altérations géniques soient de mieux en mieux caractérisées, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'initiation et la progression tumorale sont très loin d'être élucidés. La recherche fondamentale sur le mélanome a pour objectif d'identifier ces mécanismes en développement des approches originales et des modèles cellulaires et physiopathologiques reflétant le mieux possible la chronologie des mélanomes humains. Deux réseaux régionaux « Mélanome » ont été créés, le réseau Mélanome IDF coordonné par L Larue et A Sarasin et le réseau Grand-Ouest RCBM coordonné par B Dréno. Ces réseaux ont permis de créer des liens entre équipes de recherche fondamentale et recherche clinique issues de structures très diverses (Inserm, CNRS, AP/HP, Institut Curie et Gustave Roussy...).

Dix-neuf équipes de recherche fondamentale ont participé à la journée du 6 mai 2010 « Développer la Recherche Translationnelle et Clinique Française dans le Mélanome ». Ces équipes de recherche ont montré un vif intérêt pour cette journée renforçant les liens entre la recherche fondamentale et la recherche translationnelle et clinique. Ces équipes, réparties sur tout le territoire français, développent des programmes très variés et complémentaires. Certains chercheurs ont un ancrage très solide dans le domaine du mélanome au niveau international comme en témoignent le nombre de conférences invitées à l'étranger, les responsabilités dans les sociétés savantes ainsi que l'activité éditoriale. Les programmes de recherche développés par les différentes équipes peuvent se regrouper en trois axes : 1) Signaux intrinsèques des cellules tumorales, 2) Relation Cellule-Environnement et 3) Plasticité et dormance. Le premier axe rassemble de nombreuses équipes dont l'objectif est de mettre en évidence et de disséquer le rôle des voies de signalisation et métaboliques impliquées dans l'évolution tumorale des mélanocytes en mélanome. Les programmes sont très divers et non redondants. Le deuxième axe adresse l'importance de la relation des cellules tumorales avec leur environnement. L'importance de l'environnement est abordée sous plusieurs aspects : microenvironnement, matrice extracellulaire et rayonnement ultraviolet. Le troisième axe aborde la plasticité cellulaire et la problématique de la dormance tumorale. Dans cet axe le problème d'identification des cellules souches tumorales est abordé, thématique développée également dans de nombreux programmes de recherche. En conclusion, par la diversité des programmes développés, la recherche fondamentale française sur le mélanome est remarquablement exhaustive. De plus, par l'existence des réseaux mélanomes, les chercheurs interagissent et développent des programmes collaboratifs.

Au niveau des perspectives et des programmes à développer, ils sont bien évidemment nombreux. Ils passent par l'amélioration des connaissances et une meilleure compréhension de la spécificité du mélanome, pas assez souvent pris en considération dans les projets. Pour rester compétitif au niveau international, la recherche française sur le mélanome doit développer des programmes intégratifs ambitieux avec des modèles physiopathologiques pertinents. Il est à noter que les meilleurs modèles murins développés actuellement sont issus en particulier de la recherche française. Cette recherche intégrative a un coût important, mais permet de prendre en compte la complexité du système dans des modèles physiopathologiques pertinents pour les mélanomes humains.

## 13. LA CULTURE TRIDIMENSIONNELLE COMME MODÈLE D'INDUCTION DES CAPACITÉS INVASIVES DU MÉLANOME HUMAIN

■ ALCAIDE-LORIDAN C *et al.* ■ CNRS UMR7592

La mise en culture de lignées de mélanome cutané humain dans un milieu classiquement utilisé pour le maintien des neurosphères en un état indifférencié permet à certaines lignées de pousser sous forme de sphéroïdes (SPH). Une analyse par *microarray* a révélé que cette mise en culture tridimensionnelle induit de nombreuses modulations transcriptionnelles, avec une activation d'expression de gènes des crêtes neurales, des gènes de pluripotence ou encore des gènes requis pour l'invasion cellulaire. En accord avec ces données, les cellules SPH ont des capacités de migration

accrues dans le collagène. Ces phénomènes s'accompagnent de modulations épigénétiques conséquentes sur différents promoteurs tels que Nanog ou CXCR4. L'arrêt de prolifération des cellules SPH, de même que la majeure partie des dérégulations géniques et modulations de cascades de signalisation, sont réversibles lors de la remise en culture des cellules en monocouche. Ce type de culture tridimensionnelle pourrait donc constituer un modèle d'obtention de cellules invasives à partir de cellules de mélanome, mimant la plasticité de ces cellules lors de leur métastase.

## 14. ROLE OF SPHINGOSINE 1-PHOSPHATE METABOLISM IN MELANOMA-STROMA INTERACTIONS

■ ANDRIEU-ABADIE N ■ Inserm U858, I2MR, Toulouse

The general aim is to provide a better understanding of the molecular mechanisms that regulate the balance between survival and death of cancer cells. Our studies are focused on the analysis of the effects and modes of action of an emerging class of bioactive lipids, namely sphingolipids, in the regulation of cancer cell death pathways. Our project aims at defining novel targets in lipid metabolism able to interfere with cell death programs and, as a consequence, to halt tumor progression. Among the enzymes and proteins which control sphingolipid metabolism and traffic we are investigating, some relate to sphingosine 1-phosphate (S1P) metabolism. S1P is believed to act as a

'tumor-promoting' agent. We have just found that the expression of all three enzymes (sphingosine kinase, S1P phosphatase and S1P lyase) that control S1P metabolism is dysregulated in human melanoma cell lines as compared to melanocytes. Yet, although the tumor surrounding environment is a key factor in melanoma development, the role of S1P in melanoma-stroma interactions is still unknown. Part of this project aims at determining whether the lysosphingolipid S1P can influence melanoma progression either directly (*per se*) or indirectly (through diffusible signals such as growth factors or proteases) by modifying the tumor-stromal fibroblasts dialogue.

## 15. OPTIMISATION DES FONCTIONS EFFECTRICES, MÉMOIRES ET MIGRATOIRES DES LYMPHOCYTES T CD8 : APPLICATION AUX THÉRAPIES ADOPTIVES ANTI-TUMORALES DANS LE MÉLANOME

■ GRANGE M, BUFERNE M, LESERMAN L, SCHMITT-VERHULST AM, AUPHAN-ANEZIN N

■ CIML, Inserm U631, CNRS UMR6102, Université Aix-Marseille, Parc Scientifique de Luminy, Case 906, 13288 Marseille cedex 9.

Pour évaluer l'efficacité des lymphocytes T (LT) CD8 face aux tumeurs, nous avons développé un modèle destiné à reproduire le développement naturel des mélanomes, tant en termes d'antigène tumoral (TA) que d'oncogénèse (Huijbers *et al.*, Cancer Res. 2006). Le TA choisi est codé par le gène P1A dont la distribution s'apparente à celle des TA de type «germinal-cancer» chez l'homme. Dans ce modèle de mélanome inductible, nous avons montré que l'immunité adaptative est initialement protectrice contre le développement du mélanome, mais qu'elle est ensuite supplantée par une inflammation chronique de type Th2/Th17, avec des LT CD8 intra-tumoraux de phénotype «épuisé» et dépourvus de molécules effectrices cytotoxiques (Soudja *et al.*, Cancer Res, 2010, in press). Des LT CD8 anti-P1A, que nous avons montrés efficaces dans l'éradication de tumeurs transplantées (Shanker, Verdeil *et al.*, JI 2007) sont incapables d'infiltrer les mélanomes induits.

L'IL-2 peut être utilisée comme adjuvant pour accroître la réactivité des LT CD8 anti-tumoraux. Toutefois, l'IL-2 étant impliquée dans l'expansion/fonction des LT régulateurs, il était important de montrer que ses effets sur les LT CD8 peuvent être mimés par la transduction du LT avec une

forme constitutivement active de STAT5 (Verdeil *et al.*, JI 2006a, EJI 2006b). Cette approche est utilisée pour rendre les LT CD8 anti-P1A efficaces, même dans les conditions inflammatoires/immunosuppressives prévalant dans le modèle de mélanome inductible.

Nos études en cours montrent que la manipulation de la voie STAT5 dans des LT CD8 leur confère des propriétés intéressantes pour leur utilisation dans des protocoles d'immunothérapie :

- ils ont une longue durée de vie après transfert adoptif dans un hôte syngénique conditionné ou immunodéficient ;
- ils montrent une capacité accrue à infiltrer les tissus ;
- ils conservent une forte activité cytolytique spécifique de l'Ag P1A ;
- ils rejettent plus efficacement que des LT CD8 contrôles des tumeurs transplantées. Des résultats préliminaires montrent qu'ils infiltreront très efficacement les mélanomes induits. Leur capacité à résister aux mécanismes d'immunosuppression et à la polarisation de type Th2/Th17, de même que leur potentiel à «reprogrammer» vers «Th1» l'infiltrat tumoral dans le mélanome sont en cours d'évaluation.

## 16. IDENTIFICATION DES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES QUI CONTRÔLENT LA TRANSITION ENTRE LES CELLULES SOUCHES DE MÉLANOME ET LEUR LIGNAGE PROLIFÉRATIF

■ BALLOTTI R *et al.* ■ Inserm U895

Malgré une controverse récente, il existe dans les mélanomes métastatiques, qui sont la plupart du temps pigmentés et donc différenciés, une population de cellules indifférenciées (cellules souches, cellules initiatrices) qui pourrait être la cible de choix pour prévenir le développement de ces tumeurs. Le projet, que nous avons initié il y a un an, a pour but de caractériser les cellules initiatrices de mélanomes, et d'identifier les mécanismes qui régulent la transition entre les cellules initiatrices de mélanomes et

leur lignage prolifératif. Nous avons identifié MITF, le «master gene» de la différenciation mélanocytaire et p27, l'inhibiteur CDK, comme les molécules clés qui contrôlent la transition entre les cellules initiatrices de mélanome et leur lignage différencié. En effet, l'inhibition de l'expression de MITF augmente le potentiel tumorigénique et métastatique des cellules de mélanome. L'inhibition de MITF induit également une augmentation de l'expression des marqueurs de cellules souches, Oct4 et Nanog, ainsi qu'une

transition mésenchymateuse de cellules de mélanome qui peut être responsable la stimulation de leurs propriétés invasives *in vitro* et *in vivo*. En outre, dans les mélanomes, il existe de manière spontanée une population de cellules, qui n'expriment pas MITF, et qui a un fort potentiel tumorigénique. La suppression de cette population diminue considérablement le potentiel tumoral de ces cellules, indiquant que l'éradication de la population MITF négative

peut être une stratégie attrayante pour le traitement des mélanomes. Le but de nos projets est d'identifier un marqueur de surface spécifique des cellules MITF-négatives qui nous permettra d'isoler et d'étudier les propriétés des cellules initiatrices de mélanomes. Nous avons également développé un screening moyen débit pour identifier des substances capables d'éliminer spécifiquement ces cellules initiatrices de mélanome.

## 17. GENOME WIDE ANALYSIS OF GENE REGULATION BY TRANSCRIPTION FACTOR MITF IN HUMAN MELANOMA CELLS

■ STRUB T, KOBI D, LEGRAS S, YE T, JOST B, BERTOLOTTO C, DAVIDSON I

■ IGBMC, 1 Rue Laurent Fries 67404 Illkirch France. + Inserm U895, Biologie et pathologies des cellules mélanocytaires, Nice

Malignant melanoma involves the transformation of melanocytes to form a primary tumour before disseminating to form distant metastasis. While immortalisation and transformation can often be ascribed to mutations in the *Braf* and *Cdkn2a* genes, the transcription factor MITF plays an important role in regulating the metastasis properties of melanoma cells. MITF (Microphthalmia transcription factor) is a bHLH-leucine zipper transcription factor which is a master gene for development and survival of melanocytes as well as a key regulator for expression of major melanogenic proteins. Changes in the levels of expression and/or activity of MITF control key decisions in proliferation, differentiation, quiescence and apoptosis and the control of invasive and metastatic properties. To fully define the repertoire of target genes that may be regulated by MITF, we performed chromatin immunoprecipitation coupled to high throughput sequencing (ChIP-seq) in human 501Mel cells. ChIP-seq was performed for MITF, mono and trimethylated lysine 4 of histone H3 (marking enhancers and active promoters) and RNA polymerase II (pol II). More than 7500 high confidence MITF binding sites were observed of which around 4800 lie within +/- 10 kb of 3300 potential target genes. The binding sites are strongly enriched in subclasses of E box sequences.

To determine which of the target genes are regulated by MITF, we have made an siRNA-mediated MITF knock-down. As previously described, MITF knock-down 501Mel cells undergo growth arrest and show pronounced morphological changes. We then analysed the changes in gene expression by RNA-sequencing. More than 12000 transcripts could be annotated showing significant expression of which 455 were up-regulated and 315 were repressed. In each category, around 80 genes are direct targets with one or several

MITF binding sites in their regulatory regions, while the others are regulated indirectly presumably as a result of changes in expression of the direct targets. Analysis of the regulated genes shows that a significant fraction of those up-regulated are associated with membrane signalling and secreted signalling factors. In contrast, the down-regulated genes are predominantly nuclear and involved in cell cycle. We further analysed the genes bound by MITF and those that are up-regulated by MITF overexpression using previously published Affymetrix datasets. Our comparison shows that of around 3000 regulated genes, almost 1000 are direct targets, and that this group clusters to the most up-regulated set. MITF has been considered as a transcriptional activator, however our results clearly show that many genes are upregulated upon loss of MITF suggesting that it can also act as a transcriptional repressor at some promoters.

The cell cycle arrest and morphological changes in the MITF knockdown cells have previously been described as a G1/S cell cycle arrest due to upregulation of *Cdkn1a* and *Cdkn1b* expression, where *Cdkn1a* is directly regulated by MITF and *Cdkn1b*, indirectly via *Diaph1*. More recently however it has been shown that MITF knockdown does not lead to a G1/S arrest, but rather to a senescence phenotype induced by activation of the DNA-damage response leading to stabilisation of p53 and activation of downstream target genes. Examination of our RNA-seq data shows MITF knockdown leads to only a mild upregulation of *Diaph1* but, we see no expression of *Cdkn1a* under any conditions. Analysis of the deregulated gene expression programme supports the idea that MITF knockdown leads to a senescent state rather than a G1/S arrest. We will discuss the role of several of the MITF target genes in establishment of the senescent state.

## 18. MARQUEURS ET CIBLES THÉRAPEUTIQUES : CARACTÉRISATION DE PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA DISSÉMINATION DU MÉLANOME. ANXA1 : MARQUEUR DE DISSÉMINATION DU MÉLANOME ?

■ DEGOUL F *et al.* ■ UMR990, Inserm, Université d'Auvergne

Les métastases survenant lors d'un cancer sont souvent associées à des mauvais pronostics pour la survie des patients et ceci est particulièrement vrai pour le mélanome qui métastasé entraîne le décès de 80 % des sujets. Notre laboratoire développe des traceurs avec une affinité spécifique pour le mélanome du fait d'une liaison au pigment mélanine. Parallèlement à ces recherches, un projet de caractérisation de protéines impliquées dans la dissémination est activement développé : il s'agit de déterminer sur un modèle de mélanome de souris les dérégulations de protéines associées au risque de développer des tumeurs secondaires à partir d'une tumeur primitive. Nous avons comparé au niveau protéique deux lignées B16 ayant des potentiels métastatiques différents. Nous avons mis en évidence des différences d'expression de protéines parmi lesquelles, l'annexine A1 (ANXA1) qui joue un rôle pro-invasif *in vitro* sur les lignées de souris et humaines, et *in*

*vivo* dans le modèle syngénique. Une analyse rétrospective chez l'homme, en collaboration avec les services de dermatologie et d'anatomopathologie de Clermont-Ferrand et de Saint-Etienne est en cours. ANXA1 est présente dans plusieurs compartiments cellulaires ainsi qu'à l'extérieur de la cellule sous une forme complète ou tronquée. Les données actuelles soulignent l'importance de la matrice extracellulaire dans l'invasion et plus spécifiquement la présence de peptides effecteurs. Développer des approches de détection et de quantification d'ANXA1 *in vivo* chez la souris (marquage d'anticorps spécifiques, gamma-caméra), dans les fluides biologiques (ELISA, NanoLC-MS) ou sur les tumeurs de souris et humaines (Imagerie MALDI-TOF) constituera la suite de notre programme. Par ailleurs, l'intérêt thérapeutique de molécules ciblant les protéines différentielles ou les voies cellulaires dans lesquelles elles sont impliquées sera évalué.

## 19. RÔLE ET RÉGULATION DES KINASES RAF DANS LE MÉLANOME

■ MARQUETTE A<sup>1,2</sup>, ANDRÉE J<sup>1,2</sup>, BAGOT M<sup>1,2,3</sup>, BENSUSSAN A<sup>1,2</sup>, DUMAZ N<sup>1,2</sup>

■ <sup>1</sup>Inserm U976, Hôpital Saint-Louis, Paris; <sup>2</sup>Université Paris 7-Denis Diderot, Hôpital Saint-Louis, Paris ;  
<sup>3</sup>Département de Dermatologie, AP-HP, Hôpital Saint-Louis, Paris

Le mélanome, la tumeur cutanée la plus agressive, est devenu un problème majeur de santé publique dans de nombreux pays. Dans le but de développer de nouvelles thérapies pour traiter cette tumeur, nous étudions les voies de signalisation qui jouent un rôle prépondérant dans la prolifération, la survie et la différenciation des mélanocytes et des mélanomes. La voie de transduction du signal appelée « Mitogen Activated Protein Kinase » (MAPK) régule la prolifération des mélanocytes en culture et *in vivo*. Des mutations des gènes codant pour les protéines impliquées dans cette voie de signalisation ont été identifiées chez l'homme et induisent une prolifération anormale des mélanocytes. Ainsi, l'activation constitutive de la voie des MAPK dans les mélanomes, soit par des mutations du gène Ras soit par des mutations du gène B-Raf, a été décrite dans 15 % et 50 % des mélanomes

respectivement. Les sérines-thréonines kinases de la famille Raf jouent un rôle prédominant dans la régulation de l'activité de la voie MAPK. Dans les cellules de mammifère, il y a trois isoformes de Raf (A-Raf, B-Raf et C-Raf) qui ont des activités biologiques légèrement différentes. La présence de mutations de B-Raf dans environ 50% des mélanomes humains a permis de mettre en évidence les propriétés oncogéniques de cette kinase dans les mélanomes. Des inhibiteurs chimiques de B-Raf sont d'ailleurs en développement clinique. Cependant, nous avons récemment montré que la protéine kinase B-Raf était inactivée dans les mélanomes contenant une mutation de Ras. Cette inhibition est due à une régulation négative de B-Raf par son substrat Erk. En effet, Erk phosphoryle B-Raf sur sa partie amino-terminale pour empêcher son interaction avec Ras. Ce mécanisme de régulation

négative de B-Raf force ces lignées de mélanome à utiliser l'isoforme C-Raf. Ce travail a des conséquences sur le traitement du mélanome. En effet, si B-Raf n'est pas utilisé pour l'activation de la voie des MAPK dans les mélanomes mutés Ras, les inhibiteurs de B-Raf seront inefficaces dans ces cancers. Nous avons par ailleurs démontré qu'un inhibiteur capable d'inactiver à la fois B-Raf et C-Raf et qui est en déve-

loppement clinique (sorafenib), induisait paradoxalement l'activation de ces kinases par hétérodimérisation. Ces résultats mettent en évidence de nouveaux mécanismes de régulation des kinases Raf qui pourraient jouer un rôle important dans la résistance des mélanomes aux inhibiteurs de Raf qui sont en développement clinique.

## 20. RACK1 : POTENTIEL MARQUEUR DE MALIGNITÉ ET FUTURE CIBLE THÉRAPEUTIQUE ?

- EGIDY G, JULÉ S, CAMPAGNE C, SASTRE-GARRAU X, BERNEX F, AUBIN-HOUZELSTEIN G, PANTHIER JJ
- Laboratoire de Génétique fonctionnelle et médicale, UMR955 INRA-ENVA, Maisons-Alfort ; Unité Génétique fonctionnelle de la souris CNRS URA 2578 ; Institut Pasteur ; Service Anatomopathologie, Institut Curie ; Service d'Anatomie Pathologique, ENVA, Maisons-Alfort

Le terme de mélanome recouvre une multiplicité de tumeurs malignes qui se développent par transformation des mélanocytes de la peau, des muqueuses, de la choroïde de l'œil, et parfois des organes internes. Les mélanomes sont également hétérogènes par leur forme et l'âge de survenue qui peut être très jeune. Le mélanome cutané est le cancer de la peau le plus grave. Bien que la mortalité due aux mélanomes ait augmenté ces dernières années, cette augmentation a été moins rapide que l'accroissement de son incidence. Ceci est peut-être dû au dépistage plus précoce. En effet, l'excision des mélanomes à un stade précoce est associée à un pronostic favorable. Le pronostic est sombre si des métastases sont présentes, car les traitements systémiques actuels ne sont pas efficaces. Les lésions histologiques des mélanomes sont également d'aspect hétérogène. Bien que l'examen d'anatomie pathologique à visée diagnostique soit assez précis, les caractéristiques histopathologiques ne sont pas toujours assez discriminantes pour prédire l'agressivité des mélanomes.

La distinction entre tumeur bénigne et maligne est parfois délicate. La plupart des marqueurs du lignage mélanocytaire utilisés en diagnostic, correspondent à des protéines impliquées dans la production du pigment. Ces marqueurs sont communs aux tumeurs bénignes et malignes. Des marqueurs de la progression tumorale, qui permettraient de conforter le diagnostic, sont aujourd'hui recherchés. Dans une étude récente, nous avons découvert que RACK1 (*Receptor for Activated C Kinase*) pourrait être un marqueur spécifique de la malignité des mélanocytes. Nous avons montré que la protéine RACK1 est facilement détectée

dans les cellules de mélanomes cutanés et métastatiques. Par comparaison, RACK1 n'est pas décelée dans les mélanocytes normaux de l'épiderme sain. RACK1 est absente voire présente en faible quantité dans les échantillons de naevi<sup>1</sup>. En collaboration avec A. Janin, C. Lebbé et R. Barnhill de l'hôpital Saint-Louis, nous faisons des études complémentaires sur des échantillons de mélanomes précoces cutanés et choroïdiens pour établir la preuve de concept de l'intérêt diagnostique de RACK1.

D'autre part, nous analysons le rôle fonctionnel de RACK1 *in vivo* dans l'initiation et la progression du mélanome sur des modèles expérimentaux murins de mélanomes<sup>2</sup>. RACK1 est une protéine échafaudage, qui intègre différentes voies de signalisation. Dans les cellules de mélanome, *in vitro*, il a été montré que RACK1 est un acteur dans le croisement de signalisation des voies ERK (*Extracellular signal Regulated Kinase*) et JNK (*c-Jun N terminal Kinase*)<sup>3</sup>. Dans des conditions de stress, RACK1 est à la croisée de la formation de granules de stress et de l'activation de la voie de signalisation SAPK (*Stress Activated Protein Kinase*) et déterminerait l'acquisition de la résistance aux thérapies anticancéreuses<sup>4</sup>. Nos résultats préliminaires sur une lignée de mélanome murin traitée avec des shRNA contre RACK1 par vecteurs lentiviraux suggèrent que RACK1 est une potentielle cible thérapeutique chez la souris.

1. Egidy G et al., *Molecular Cancer* 7:34 2008.
2. Ackermann et al., *Cancer Res.* 65:4005-11, 2005
3. Lopez-Bergami P et al., *Cancer Cell* 11:447-460, 2007.
4. Arimoto K et al., *Nat Cell Biol* 10:1324-1332, 2008.



## 21. ÉTUDES *IN VIVO* DU RÔLE DES PROTÉINES CRAF ET BRAF DANS LE DÉVELOPPEMENT DU LIGNAGE MÉLANOCYTAIRE ET DU MÉLANOME CUTANÉ INDUIT PAR NRAS

■ EYCHÈNE A *et al.* ■ Inserm U1021 - CNRS UMR3347. Institut Curie Recherche, Orsay

Des études *in vitro* ont suggéré un rôle important de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK pour la prolifération, la survie et la différenciation des mélanocytes. Cependant, jusqu'à présent, aucune étude *in vivo* n'a été conduite afin de valider ces fonctions. En particulier, le rôle spécifique de deux membres de la famille des kinases Raf, C-Raf et B-Raf, est l'objet de nombreux débats. De plus, la dérégulation de cette voie de signalisation dans les mélanocytes peut conduire à la transformation cellulaire et à la progression tumorale. En effet, des mutations activatrices soit du gène NRAS, soit du gène BRAF, sont retrouvées avec une haute fréquence chez des patients atteints de mélanome cutané. Cependant, tout comme dans le cas du développement normal du lignage mélanocytaire, les rôles respectifs des kinases C-Raf et B-Raf en aval d'une GTPase Ras activée pour la progression vers le mélanome, n'ont jamais été étudiés jusqu'à présent dans des modèles animaux. Les données de la littérature indiquent que la

contribution de chacune des kinases est probablement plus complexe qu'initialement prévu, tant au niveau du développement normal du lignage mélanocytaire que lors de la progression tumorale du mélanome.

L'objectif de notre projet de recherche est de générer des modèles animaux afin d'étudier *in vivo* le rôle de C-Raf et de B-Raf dans le développement normal du lignage mélanocytaire ainsi que dans la formation de mélanomes. Pour cela, nous utilisons des lignées de souris permettant l'inactivation conditionnelle de ces gènes. Nos résultats suggèrent que l'inactivation de la voie de signalisation Raf dans le lignage mélanocytaire chez la souris affecte la capacité d'auto-maintenance des cellules souches mélanocytaires dans leur niche. Ces modèles sont également utilisés pour étudier le rôle respectif de C-Raf et de B-Raf dans le développement et le maintien de mélanomes cutanés induits par un allèle activé du gène NRAS.

## 22. HUMAN MELANOMA PROGRESSION IS CONTROLLED BY PROCATHEPSIN L SECRETION: A NEW GENE THERAPY TO INHIBIT PROGRESSION OF TUMORS INDUCED BY HUMAN MELANOMA CELLS

■ FRADE R ■ Inserm U.672 (former U.354), Immunochimistry of Cell Regulations and Virus Interactions, Évry

We previously demonstrated that the switch from non to highly tumorigenic phenotype of human melanoma cells is directly related to procathepsin L secretion, which modified tumor microenvironment. Indeed, we demonstrated that secreted procathepsin L cleaves human C3, the third component of complement and consequently increases cell resistance to complement-mediated cell lysis. In addition, secreted procathepsin L cleaves other extracellular components.

We clearly demonstrated the involvement of procathepsin L secretion in tumor progression by developing three different assays: 1) the inhibition of secreted procathepsin L activity by preincubating human melanoma cells with polyclonal anti-cathepsin L antibodies; 2) the increase of

procathepsin L secretion by transfecting non-tumorigenic cells with cathepsin L cDNA to overexpress procathepsin L and to increase its secretion; 3) the inhibition of procathepsin L secretion. This latter was triggered by intracellular expression of an anti-human cathepsin L single chain variable fragment (ScFv), prepared in our laboratory from a monoclonal anti-cathepsin L antibody. In all these previous experiments, melanoma cells were processed before their injection into nude mice.

Recently, we designed a new lentiviral vector in which this anti-cathepsin L-ScFv was cloned. This anti-cathepsin L-ScFv lentiviral construct was optimized to transduce human melanoma cells with the highest intracellular expression of anti-cathepsin L-ScFv. In these transduced cells, proca-

thepsin L secretion was strongly inhibited. In addition, injection of this anti-cathepsin L-ScFv lentiviral vector into tumors already induced in nude mice, inhibits tumor progression and associated angiogenesis.

This is the first report to demonstrate that targeting pro-cathepsin L secretion with anti-cathepsin L-ScFv lentiviral construct constitutes a new gene therapy to inhibit the progression of tumors induced by human melanoma cells.

## 23. THE EXPRESSION OF RB18A/MED1, A CO-FACTOR OF TRANSCRIPTION, TRIGGERS STRONG TUMORIGENIC PHENOTYPE OF HUMAN MELANOMA CELLS

### ■ FRADE R

■ Inserm U.672 (former U.354), Immunochimie de Cell Regulations and Viral Interactions, 5, rue Henri Desbruères, Évry

The RB18A/MED1 human gene, also referred to as TRAP220, DRIP205 and PBP, encodes for a single 205 kDa component, which interacts with nuclear receptors and transcription factors. RB18A/MED1 chromosome localization on locus 17q12-q21.1 suggests its involvement in human cancers. We herein analyzed RB18A/MED1 expression in human melanoma cell lines. We found that RB18A/MED1 is either highly or weakly expressed in melanoma cells, depending on their respectively non- or highly-tumorigenic phenotype. We therefore investigated the possible existence of a relationship between the RB18A/MED1 expression level and melanoma cell phenotype. For this purpose, we down-regulated RB18A/MED1 expression by transfecting melanoma cells with a RB18A/MED1 siRNA, specific to the 3'-untranslated region of native RB18A/MED1 RNA, already demonstrated to inhibit specifically RB18A/MED1 protein expression. A non-specific (scrambled) siRNA was used as control.

We demonstrated that this RB18A/MED1 siRNA did not modify the expression of cathepsin L forms or lamin A/C, nor the secretion of procathepsin L and MMP2 in transfected cells. Analysis using a *microarray* membrane with 113 cancer-related genes, western blot and specific tests, demonstrated that RB18A/MED1 knockdown significantly inhibits TIMP-3 expression, and increases uPAR expression, two genes well known to be involved in melanoma cell invasion, through modifications of the tumor microenvironment. Indeed, RB18A/MED1 knockdown in melanoma cells *in vitro* increased their invasive properties, without modification of cell proliferation. Furthermore, RB18A/MED1 knockdown *in vivo* switched melanoma phenotype from non- to strongly-tumorigenic in nude mice. Our data thus demonstrated for the first time that a decrease of RB18A/MED1 expression in human melanoma cells increases their tumorigenic phenotype.

## 24. ÉTUDE DE L'AXE DE SIGNALISATION TGF- $\beta$ /GLI2 AU COURS DU DÉVELOPPEMENT ET DE LA PROGRESSION MÉTASTATIQUE DU MÉLANOME

■ JAVELAUD D, DENNLER S, PIERRAT MJ, NALLET F, MAUVIEL A

■ Institut Curie, Inserm u1021, UMR CNRS 3347

Le facteur de transcription GLI2, connu comme un médiateur de la voie de signalisation Hedgehog, est impliqué dans l'initiation et le maintien de nombreux cancers humains. Nous avons démontré que GLI2 est une cible transcriptionnelle directe de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  dans de nombreuses lignées cellulaires (Dennler *et al.*, Cancer Res., 2007; JBC 2009).

Nous avons également caractérisé l'importance de la voie autocrine du TGF- $\beta$  dans l'invasion et la capacité métastatique des cellules de mélanome (Rodeck *et al.*, 1999, Cancer Res. ; Javelaud *et al.*, 2005, *Oncogene*) et l'efficacité de cibler la voie TGF- $\beta$  dans des modèles précliniques (Javelaud *et al.*, 2007, Cancer Res.). Enfin, nous avons montré que dans les mélanomes, l'expression de GLI2 est hétéro-

gène d'une lignée cellulaire ou d'une tumeur à l'autre. L'expression de GLI2 est opposée à celle de CDH1, aussi bien dans les lignées de mélanome en culture que dans les lésions de patients atteints de mélanome. Les lignées qui expriment fortement GLI2 sont les plus invasives et forment davantage de métastases osseuses après inoculation intracardiaque dans la souris. Le knockdown de GLI2 dans

ces lignées inhibe fortement leurs capacités invasives et métastatiques (Alexaki *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, provisionally accepted). Le facteur de transcription GLI2 est à la croisée des chemins entre deux voies de signalisation importantes dans la tumorigénèse et semble constituer un acteur central dans le développement d'un comportement agressif dans les cellules de mélanome.

## 25. RÔLE DE LA $\beta$ -CATÉNINE ET DE SES PROTÉINES ASSOCIÉES DANS LA FORMATION ET LA PROGRESSION TUMORALE DES MÉLANOMES

■ LARUE L *et al.* ■ Inserm 1021, CNRS 3347, Institut Curie

L'incidence des mélanomes cutanés augmente régulièrement dans les pays occidentaux et double tous les 12 ans. Les raisons épidémiologiques sont assez claires : climat, pollution, déplacements d'ethnies et façon de vivre. En 2006, 1 330 nouveaux cas de mélanomes ont été diagnostiqués dans la région Île-de-France et l'incidence continue à augmenter. Afin d'améliorer la prévention, le diagnostic précoce et la thérapie des mélanomes, il est fondamental d'élucider les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement des mélanocytes et dans leurs transformations en mélanomes. Les voies de signalisation principalement altérées dans les mélanomes sont les voies Wnt/ $\beta$ -caténine (Icat, Mitf, Brn2), MAP kinases (N-Ras, B-Raf), Tgf/Smad et PI3K (Pten, Akt). Ces voies de signalisation sont impliquées dans de nombreux événements cellulaires (détermination, prolifération, immortalisation, migration, transition épi-

thélio-mésenchymateuse). Sans ignorer les autres voies de signalisation, nous avons centré principalement notre recherche sur  $\beta$ -caténine (bcat) et ses protéines associées dans le développement normal et pathologique des mélanocytes. Bcat est une protéine multifonctionnelle dont les fonctions dépendent de sa localisation cellulaire. Bcat contrôle l'adhérence cellulaire avec les cadhérines (cad), la transmission des signaux Igf1R/Pten/Akt et Wnt/Icat et l'expression d'un grand nombre de gènes dont les facteurs de transcription clés du lignage mélanocytaire Mitf et Brn2. Il nous paraît essentiel d'étudier le rôle de bcat dans la transformation car cette protéine pivot a une activité oncogénique dans un tiers des mélanomes. Des échantillons de mélanomes humains, un répertoire bien caractérisé de lignées cellulaires et des modèles animaux seront utilisés dans cette étude intégrative pour évaluer la pertinence pour l'homme.

## 26. RÔLES D'EMMPRIN/CD147 DANS LA MODULATION DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL DU MÉLANOME

■ MOURAH S, LEBBÉ C, MENASHI S, HUET E, DUMAZ N

■ Laboratoire de pharmacologie APHP, Inserm UMRS 940, Hôpital Saint-Louis, CRRET CNRS

Les interactions tumeur-stroma favorisent l'oncogénèse en modifiant le microenvironnement tumoral. Ces interactions sont à l'origine de l'activation des différents types cellulaires du stroma, principalement les fibroblastes, les cellules endothéliales et lymphendothéliales et, qui induit l'altération du stroma péri-tumoral. Nos travaux suggèrent qu'EMMPRIN (CD147), une glycoprotéine membranaire enrichie à la surface des cellules tumorales dont les cellules de mélanomes, est un médiateur crucial de cette coopéra-

tion tumeur-stroma. En effet, nous avons montré que EMM-PRIN induit : 1) la production des protéases matricielles (MMPs, uPA) dans les différentes cellules stromales ; 2) la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, considérés comme des acteurs centraux dans la tumorigénèse et 3) l'angiogenèse en régulant le VEGF et le VEGFR-2 *via* HIF-2 $\alpha$  dans les cellules endothéliales. Plus récemment, nous avons montré cette régulation dans des modèles de mélanomes avec des conséquences sur leurs propriétés

malignes, suggérant que cette régulation de VEGFR-2/HIF-2 $\alpha$  par EMMPRIN peut être un mécanisme plus général. Notre projet de recherche propose d'examiner ce nouveau mécanisme de régulation de VEGFR-2/ HIF-2 $\alpha$  par EMMPRIN dans les autres cellules du stroma tumoral : les cellules lymphendothéliales et les myofibroblastes, ainsi que les conséquences fonctionnelles de cette régulation dans la progression des mélanomes. Au centre de ce projet est l'analyse des mécanismes impliqués, notamment les voies de signalisation par lesquels EMMPRIN régule VEGFR-2 *via*

l'induction de HIF-2 $\alpha$ . Le domaine de la molécule d'EMMPRIN responsable de cette régulation est recherché par mutagenèse dirigée afin de développer des inhibiteurs spécifiques de cette régulation. Nos travaux permettront la compréhension des mécanismes par lesquelles EMMPRIN modifie le microenvironnement tumoral dans le mélanome. Ils nous permettront d'envisager une inhibition spécifique de ses effets afin d'agir sur l'activation du stroma tumoral. Ceci constitue une nouvelle voie prometteuse dans le traitement des mélanomes.

## 27. EXPLOITATION DU MÉTABOLISME BIOÉNERGÉTIQUE DES MÉLANOMES POUR VAINCRE LA RÉSISTANCE AUX TRAITEMENTS ANTICANCÉREUX

■ MARCHETTI PH *et al.* ■ CHRU Lille ; Inserm U837

Depuis le début du siècle dernier, on sait que la plupart des cellules tumorales présentent un métabolisme bioénergétique particulier. Cette singularité, appelée effet Warburg, se caractérise par l'existence d'une glycolyse accrue au détriment de la phosphorylation oxydative mitochondriale. L'effet Warburg constitue la base fondamentale d'une technique d'imagerie des cancers appelé tomographie par émission de positons (TEP). Ces dernières années, l'étude de ce phénomène a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques. En effet, il est possible de sensibiliser les cellules tumorales à la mort cellulaire en modifiant le métabolisme glucidique. Notre hypothèse est que la glycolyse, particulièrement élevée dans le mélanome métastatique, constitue un élément clé de sa résistance aux chimiothérapies. Celle-ci est basée sur les arguments suivants : (i) les mélanomes sont constitués de cellules tumorales qui métabolisent le glucose avec avidité et sont parmi les tumeurs les plus visibles en TEP ; (ii) Les mélanocytes résident dans un environnement particulièrement hypoxique qui est nécessaire à la transformation maligne et expriment de manière constitutive des taux élevés de HIF-1 $\alpha$  facteur clé responsable des changements métaboliques des cellules tumorales ; (iii) les taux sériques de lactate

déhydrogenase (LDH), enzyme terminale de la glycolyse, constituent un paramètre reconnu pour prédire la non-réponse aux traitements des patients atteints de mélanomes aux stades métastatiques. Nous voulons comprendre comment le métabolisme énergétique peut influencer la mort cellulaire chimio-induite, et réduire la réponse aux traitements anticancéreux classiques. Ce projet s'inscrit dans la continuité de nos travaux sur le rôle des mitochondries dans la résistance/sensibilité à l'apoptose des cellules tumorales induite par les agents anticancéreux. Pour se faire notre travail s'articule en 3 étapes : (a) caractériser le métabolisme énergétique de lignées de mélanome humain ; (b) À partir d'outils cellulaires créés au laboratoire (clones de mélanomes déficients en respiration mitochondriale, déficients en glycolyse (shRNA LDH-A, shRNA HIF-1), évaluer et comprendre la sensibilité/résistance de ces modèles vis-à-vis de la mort cellulaire chimio-induite ; (c) manipuler pharmacologiquement le métabolisme énergétique dans le but de sensibiliser les cellules tumorales à la mort cellulaire *in vitro* comme *in vivo* dans des modèles murins xénotransplantés. Ce travail devrait apporter de nouvelles stratégies pour augmenter l'efficacité des chimiothérapies dans le cadre du mélanome métastatique.

## 28. CONTRÔLE DE LA PROGRESSION TUMORALE DU MÉLANOME PAR DES MATRIKINES DÉRIVÉES DES COLLAGÈNES DE MEMBRANE BASALE

■ MONTBOISSE JC *et al.* ■ CNRS UMR 6237, CHU Reims

La progression du mélanome met en jeu des interactions entre les cellules cancéreuses ou les cellules endothéliales et les macromolécules de la matrice extracellulaire environnante, et plus particulièrement des membranes basales. Certains domaines des collagènes de membrane basale (collagènes IV, XV, XVIII et XIX), libérés par protéolyse ménagée, les matrikines, peuvent contrôler ces différentes interactions en inhibant les cascades protéolytiques intervenant dans la migration des cellules cancéreuses ou l'angiogenèse tumorale. Parmi ces matrikines, nous avons démontré que le domaine C-terminal de la tumstatine, domaine NC1 de la chaîne  $\alpha 3$  du collagène de type IV, inhibe la progression tumorale dans un modèle de mélanome *in vivo* chez la souris. Cette inhibition s'exerce à la fois sur la prolifération, la migration des cellules cancéreuses et sur leurs propriétés

invasives. Nous avons développé un cyclopentapeptide, analogue structural de cette séquence peptidique, qui exerce une forte activité anti-tumorale et anti-angiogénique *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de mélanome. De même, le domaine NC1 de la chaîne  $\alpha 4$ (IV) de ce collagène exerce une forte activité anti-tumorale. La surexpression de ces domaines, induite *in vivo* chez la souris par électrotransfert d'ADN, induit une forte réduction du volume tumoral.

L'ensemble de ces résultats montrent que des domaines de macromolécules de la matrice extracellulaire peuvent exercer un contrôle de la progression tumorale et que certains analogues structuraux, dérivés de ces matrikines, sont susceptibles de développement comme agents anticancéreux potentiels dans le cadre du mélanome.

## 29. ÉTUDE DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUÉS DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DES MÉLANOMES : N OCT-3/BRN-2 ET HIF

■ NIETO L *et al.* ■ CNRS/UPS, Toulouse

### Étude structurale et fonctionnelle de N Oct-3/Brn-2 dans des lignées de mélanome

Nous avons mis en évidence une interaction directe entre N-Oct-3 et les promoteurs de différents gènes impliqués dans la progression tumorale des mélanomes. Ces résultats donnent un fondement structural aux corrélations fonctionnelles liant l'expression accrue de N-Oct-3 et la tumorigenèse des mélanocytes *via* l'activation ou la répression anormales de gènes. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces interactions ont été élucidés ce qui nous permet aujourd'hui d'envisager la conception de peptides inhibiteurs de ces interactions.

### Étude différentielle des interactomes des facteurs HIF dans les mélanomes par protéomique

Les facteurs inductibles par l'hypoxie HIF-1 et HIF-2 sont fortement impliqués dans l'adaptation des cellules tumorales à leur environnement hypoxique, permettant ainsi leur survie et leur propagation dans l'organisme. Notre objectif est d'inhiber spécifiquement ces facteurs en empêchant leur interaction avec leurs partenaires obligatoires. Pour cela, nous recherchons des protéines partenaires spécifiques de HIF dans un contexte tumoral (mélanome humain). Des lignées cellulaires 501 Mel exprimant de manière stable les protéines HIF étiquetées ont permis la purification de complexes HIF/partenaires protéiques. Les protéines partenaires ont été identifiées par protéomique et leur rôle dans la fonction transactivatrice des protéines HIF est en cours d'évaluation.

## 30. DORMANCE TUMORALE ET CELLULES SOUCHES TUMORALES DANS LE MÉLANOME MALIN

■ POLAKOWSKA R et al.

■ Centre de recherche Jean-Pierre Aubert - Inserm U837 - Université de Lille 2 - CHRU de Lille

La dormance tumorale est un concept né de l'observation clinique, tandis que le concept de cellules souches tumorales procède d'une nouvelle théorie de la cancérogenèse. L'objectif général du projet est de documenter la pertinence du concept de dormance tumorale dans le mélanome et d'explorer les relations entre cellules dormantes et cellules souches tumorales, une question présentant un intérêt majeur tant sur le plan fondamental, que sur celui des applications médicales.

Le projet comporte : (i) la construction d'un modèle de dormance tumorale du mélanome chez la souris ; (ii) la recherche de facteurs de dormance dans ce modèle et chez des patients atteints de mélanome, en particulier chez des survivants à long terme ; (iii) la caractérisation de cellules souches tumorales dans le mélanome, chez la souris utilisée comme modèle de dormance et chez l'homme, avec l'étude de l'expression

comparée des marqueurs de dormance et de cellules souches et l'étude fonctionnelle comparée des cellules dormantes et des cellules souches, notamment sur le plan de leur capacité à échapper à l'immunosurveillance et à résister aux agents anticancéreux. Un point essentiel sera l'étude du passage réversible de l'état quiescent à l'état actif (en cycle) des cellules tumorales.

Ce projet est en cours de réalisation. Le modèle de dormance chez la souris est en cours de construction, tandis que le travail sur les cellules souches tumorales humaines a comporté la création d'une lignée à partir d'un prélèvement tumoral et la caractérisation de cellules souches tumorales dans cette lignée, avec des premiers résultats concernant leur sensibilité/résistance aux anticancéreux et l'identification de voies pouvant contrôler l'activation réversible des cellules souches tumorales quiescentes.

## 31. ÉTUDE DES RÔLES RÉGULATEURS DES GTPASES RHO DANS LES RÉPONSES IMMUNES ANTI-MÉLANOME

■ TILKIN-MARIAME A, FAVRE G, et al. ■ Inserm, Toulouse

Les GTPases Rho régulent un large spectre de fonctions cellulaires dont la réorganisation du cytosquelette d'actine, la mobilité cellulaire, la transcription de gènes et l'apoptose. Leur niveau d'expression est modifié dans certaines tumeurs et en particulier les protéines RhoA et RhoC sont surexprimées et jouent un rôle dans les capacités de migration et d'invasion des mélanomes.

Des travaux précédents de l'équipe ont montré que les GTPases Rho régulent l'expression sur des cellules de mélanomes humaines et murines, de nombreuses molécules impliquées dans les réponses immunes (RI) antitumorales. En particulier, ces protéines Rho régulent l'expression membranaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de

classe I, des molécules de costimulation CD80 et CD86 (Faseb J ; 2005 ; Plos One 2010) ainsi que des protéines de la famille du TNF : CD70 et FasL (Neoplasia 2007). Ces modifications d'expression membranaire agissent sur les RI antimélanome en inhibant l'échappement tumoral ou à l'inverse en induisant une contre-attaque tumorale.

Nous abordons l'étude des voies de signalisation impliquées dans ces régulations et en particulier les rôles des GTPases Rho et des MAPK. De plus, nous étudions *in vitro* et *in vivo* les réponses cellulaires (prolifération, apoptose ou migration) induites par l'expression membranaire de ces molécules sur les mélanomes.

# DIAGNOSTIC DU MÉLANOME (CLINIQUE, PATHOLOGIE, IMAGERIE)

Coordinateurs : L. THOMAS, B. VERGIER, E. HINDIE

## RÉSUMÉ DE LA PARTIE ANATOMOPATHOLOGIQUE ET RECHERCHE MÉLANOME ■ B VERGIER

Les objectifs de cette intervention seront de montrer la problématique anatomopathologique en matière de recherche dans le mélanome, de faire un état des lieux des travaux réalisés par les pathologistes ou portant sur l'anatomie pathologie et de proposer des projets.

- 1. La problématique anatomopathologique en matière de recherche** dans le mélanome porte sur des points extrêmement pratiques concernant les collections biologiques et le matériel à disposition en matière de recherche fondamentale et translationnelle à partir d'échantillons humains. La principale particularité en matière de mélanome est que la plupart des diagnostics de mélanome primitif sont faits par des pathologistes de ville d'où l'importance d'avoir une réflexion préalable sur ce point au niveau national si on veut « développer la recherche translationnelle et clinique française dans le mélanome ». Cette réflexion importante porte sur plusieurs points :
  - Comment créer un réseau privé/public dynamique où les pathologistes libéraux puissent être partie prenante et pas seulement (comme ils disent) pathologistes-postiers. Ce réseau devrait passer par la mise en place de la consultation 2<sup>ème</sup> lecture prônée par la HAS (décembre 2009) et qui est toujours en discussion à la CPAM. En effet, il est indispensable qu'en cas de doute ou difficulté diagnostique les pathologistes puissent adresser les lames à un « expert » pour 2<sup>ème</sup> lecture et ce, de façon « contrôlée » (comme proposé par la HAS). Il est par contre, inimaginable et non souhaitable (du fait de sa fréquence), de mettre en place pour le mélanome une seconde lecture systématique, comme ce qui est fait par l'INCa pour les tumeurs « rares ».
  - Comment favoriser l'utilisation du formol comme fixateur sur tout le territoire ? En effet, il existe actuellement un débat très important qui peut compromettre à long terme la recherche. Les pathologistes du privé sont incités par les médecins inspecteurs du travail et les cliniques avec lesquelles ils travaillent à abandonner le formol, au profit de substituts soit disant moins toxiques, mais qui sont le plus souvent incompatibles avec des techniques moléculaires, ce qui à terme posera des problèmes s'il faut rechercher des anomalies moléculaires sur ces blocs de mélanome primitif en vue de thérapies ciblées. Sachant que ce problème est strictement français (le formol est utilisé dans tous les autres pays).
  - Comment développer des techniques de fixation qui permettent d'étudier non seulement l'ADN, mais aussi l'ARN tout en gardant une morphologie de qualité ? De tels fixateurs (tel que le Rcl2, Finefix, Molecular Fix, etc.) existent et ont fait l'objet d'une évaluation par l'INCa (en cours d'analyse ?). La prochaine étape à franchir est de voir comment de tels fixateurs pourraient être utilisés en collaboration privé/publique de façon pratique et ciblée si on veut étudier l'ARN. En effet, l'ARN n'est utilisable que si les blocs sont gardés au froid et si l'extraction se fait rapidement sur le prélèvement.

- Comment permettre la mise en place de collections biologiques « durables » ? La réglementation permet aux laboratoires privés de jeter au bout de 10 ans les blocs des patients. Or, en matière de mélanome : 10 ans c'est court ! Nous sommes souvent confrontés, lors de travaux de recherche anatomoclinique, à l'impossibilité de récupérer le bloc d'un mélanome primitif de plus de 10 ans. Il serait important de réfléchir à la mise en place de façon ciblée de « blocothèques » à l'image des tumorothèques actuelles. Cette mise en place doit être réfléchie sur des thématiques ciblées, en collaboration avec le privé et dans le respect des aspects juridiques. Tout un programme !
- Comment mettre en place les analyses moléculaires « de routine » qui seront utiles aux thérapies ciblées (analyse Braf, ckit, etc.) ? Dans la plupart des grands centres existent des laboratoires de biologie des tumeurs couplés ou non aux laboratoires de pathologie. Si ces techniques deviennent utiles aux traitements du mélanome, il faudra prévoir une organisation et un financement à l'image de celui qui a été mis en place pour le cancer du côlon.
- Comment « officialiser » un réseau de pathologistes privés/publiques impliqués dans le mélanome au niveau national ? Ce réseau existe bien mais de façon informelle. Les pathologistes du mélanome se connaissent entre eux mais probablement que les cliniciens et chercheurs ont du mal à s'y repérer et à savoir à qui faire appel en cas de besoin d'analyse anatomopathologique couplée à la recherche. L'identification d'un réseau mieux identifié autour de projets concrets serait probablement utile.

En conclusion, si on veut « développer la recherche translationnelle et clinique française dans le mélanome », il est indispensable de valoriser auparavant les collections biologiques en proposant des solutions sur tous ces points « pratiques ».

**2. Projets :** En dehors des projets portés par les différentes études (voir abstracts), nous souhaiterions proposer un projet de type PHRC sur le thème des tumeurs mélaniques ambiguës. Ce projet multicentrique national, porté par les pathologistes en collaboration étroite avec les cliniciens, centré sur une thématique précise, aurait un but de recherche anatomoclinique et translationnelle, mais aussi de réflexion pratique aux différents points abordés dans le chapitre « problématique » :

- fédérer les pathologistes qui s'intéressent aux tumeurs mélaniques au niveau national ;
- réflexion avec le secteur privé : type de fixation, mise en place de fixateur « ARN » (rcl2), mise en place d'une blocothèque...
- suivi anatomopathologique et clinique des dossiers (base de données nationale) ;
- optimisation du matériel en vue d'études moléculaires (réflexion autour du tissu *microarray*, TMA) ;
- utilisation de technique FISH (Bordeaux, Lyon, Rennes à développer), voir de CGH (A de la Fouchardière, Lyon) ;
- collaboration avec des équipes de recherche translationnelle et fondamentale.



## 32. ANGIOGÉNÈSE ET NIVEAU DE CLARK ÉLEVÉ : FACTEURS D'ÉVOLUTION MÉTASTATIQUE DES MÉLANOMES DE FAIBLE ÉPAISSEUR ?

■ JEUDY G<sup>1</sup>, PETRELLA T<sup>2</sup>, CAILLIOD R<sup>3</sup>, COLLET E<sup>1</sup>, DALAC-RAT S<sup>1</sup>, VABRES P<sup>1</sup>

■ <sup>1</sup>Dermatologie ; <sup>2</sup>Anatomie Pathologique ; <sup>3</sup>Informatique médicale, CHU Le Bocage, Dijon

### Introduction

Le facteur pronostique principal des mélanomes cutanés est leur épaisseur mesurée par l'indice de Breslow. Bien que les tumeurs de moins de 1 mm aient un risque de récurrence très faible, une évolution métastatique est observée dans 3 à 8 % des cas. L'objectif de cette étude était d'identifier des critères histologiques associés à la récurrence des mélanomes de faible épaisseur.

### Matériel et méthodes

Étude rétrospective monocentrique cas-témoins des patients ayant eu un mélanome d'épaisseur  $\leq 1$  mm, suivis entre 1990 et 2006. Les cas d'évolution métastatique ont été comparés à des patients non métastatiques à 5 ans, appariés selon l'âge, le sexe et le site anatomique. Les lames histologiques ont été relues par deux dermatopathologistes en notant différents critères (niveau de Clark, ulcération, régression, phase de croissance, nævus préexistant, pigmentation, type cellulaire prédominant, diamètre tumoral, réponse inflammatoire, index mitotique, degré d'angiogénèse). Les comparaisons ont été faites par analyse de régression logistique conditionnelle de type univarié.

### Résultats

Sur 382 patients suivis pour un mélanome d'épaisseur  $\leq 1$  mm, 16 patients (4,4 %) ont présenté une évolution métastatique (suivi moyen : 93 mois, médiane : 87 mois ; extrêmes : 18-191). Le matériel histologique était disponible pour 13 patients et a été comparé à celui de 26 témoins (suivi moyen : 87 mois ; médiane : 72 mois ; extrêmes : 60 à 191). L'indice de Breslow moyen ne différait pas entre les deux groupes. Deux critères étaient significativement asso-

ciés à un risque de métastase à 5 ans en dépit d'une épaisseur  $\leq 1$  mm : un nombre important de néovaisseaux capillaires (comptés en coloration standard sur 10 champs consécutifs à l'objectif X 40) et un niveau d'invasion de Clark élevé ( $> II$ ). Ainsi, 76,9 % des mélanomes métastatiques présentaient une angiogénèse modérée à marquée contre 23,1 % des témoins ; OR = 12,2 (IC95 % : 1,5 à 99,2). De même, 76,9 % des mélanomes métastatiques avaient un niveau de Clark  $> II$  contre 30,7 % des témoins : OR = 8,9 (IC95 % 1,1 à 70,9). L'indice mitotique n'était pas significativement associé à une récurrence : OR = 4,8 (IC95 % : 0,9 à 25,3). Ni l'existence d'un phénomène de régression, ni la phase de croissance verticale (VGP) n'étaient associées à une évolution métastatique. Aucun mélanome n'était ulcéré.

### Discussion

Les mélanomes minces avec un niveau de Clark supérieur à II et une forte angiogénèse semblent représenter un groupe à risque plus élevé d'évolution métastatique. D'autres études ont déjà mis en évidence le niveau de Clark parmi les facteurs associés à la récurrence des mélanomes de faible épaisseur, mais aussi l'existence de signes de régression, d'une phase de croissance verticale ou d'un index mitotique élevé, ce que nous n'avons pas retrouvé. En revanche, l'angiogénèse tumorale a été rarement étudiée, mais est identifiée ici comme un possible facteur de récurrence.

### Conclusion

un risque de métastase pour les mélanomes de faible épaisseur : une forte angiogénèse et un niveau de Clark élevé ( $> II$ ). L'importance relative de ces facteurs pronostiques reste à préciser par des études prospectives d'effectif plus important.

### 33. ÉVALUATION DE FACTEURS PRONOSTIQUES DU MÉLANOME AU SEIN D'UNE COHORTE PROSPECTIVE DES PATIENTS

■ JOUARY T, GUILLOT B, MEIER N, BEDANNE C, VERGIER B, LAMANT L, MERLIO J PH, ROCHAIS PH, SOUFIR N

■ CHU Bordeaux, CHU Montpellier, CHU Toulouse, CHU Limoges, APHP-Paris

L'incidence du mélanome augmente en France malgré les efforts d'information, de prévention et de dépistage. Divers facteurs de risque de mélanome ont été identifiés. Le seul facteur pronostique sur la tumeur primitive est l'épaisseur tumorale (indice de Breslow), en l'absence d'autres facteurs ou marqueurs fiables à ce jour.

Nous proposons l'évaluation des facteurs pronostiques du mélanome au sein de la cohorte prospective des patients recrutés dans l'aire géographique du cancéropole du Grand Sud-Ouest. À chaque patient admis pour un mélanome dans un service du cancéropole, il sera proposé l'entrée dans une base de données. Les données recueillies seront : âge, sexe, situation professionnelle, niveau socioéconomique, phototype, comportement solaire, antécédents de brûlures solaires, nombre de nævus atypiques ou non, caractéristiques histologiques du mélanome, analyse génétique constitutionnelle des gènes de prédisposition au mélanome (CDKN2A, CDK4, MC1R).

L'analyse comprendra :

- la description des caractéristiques individuelles des patients énumérées : âge, sexe, situation professionnelle, niveau socio-économique, phototype cutané, comportement solaire, antécédents de brûlures solaires, nombre de nævus atypiques ou non, caractéristiques histologiques du mélanome, analyse génétique constitutionnelle des gènes de prédisposition au mélanome (CDKN2A, CDK4, MC1R) ;
- la recherche de facteurs pronostiques indépendants de l'indice de Breslow parmi les variables suivantes : mutations ou polymorphismes des gènes analysés et caractéristiques histologiques autres que l'indice de Breslow. Les critères de jugement utilisés seront la survie sans récurrence et la survie globale.

L'identification des facteurs pronostiques autres que l'indice de Breslow pourrait permettre la construction de groupes de patients de pronostics différents afin de proposer un suivi et/ou un traitement adapté.

## 34. INTÉRÊT DE LA FISH DANS LE DIAGNOSTIC ET LE PRONOSTIC DES TUMEURS MÉLANIQUES AMBIGUËS : ÉTUDE EUROPÉENNE SUR 113 PATIENTS

■ VERGIER B<sup>1</sup>, PROCHAZKOVA-CARLOTTI M<sup>1</sup>, DE LA FOUCHARDIÈRE A<sup>2</sup>, CERRONIL<sup>3</sup>, MASSI D<sup>4</sup>, BAILLY C<sup>2</sup>, WESSELMANN U<sup>5</sup>, KARLSELADZE A<sup>6</sup>, AVRIL MF<sup>7</sup>, JOUARY T<sup>8</sup>, MERLIO J Ph<sup>1</sup>.

■ <sup>1</sup>Service de pathologie CHU Bordeaux, France ; <sup>2</sup>Centre Léon Bérard (CCLCC), Lyon, France ; <sup>3</sup>Department of Dermatology, Graz, Autriche ; <sup>4</sup>Department of Human Pathology and Oncology, University of Florence, Italie ; <sup>5</sup>Department of Dermatology, Allergology and Dermatosurgery, Wuppertal, Allemagne ; <sup>6</sup>Department of Dermatology, Moscou, Russie ; <sup>7</sup>Service de Dermatologie, Hôpital Tarnier, Paris; <sup>8</sup>Service de Dermatologie Cancérologique Hôpital Saint-André, Bordeaux

Le diagnostic histopathologique des tumeurs mélaniques ambiguës est souvent difficile en dermatopathologie. Nous avons démontré que l'analyse FISH destinée à la détection du nombre de copies des gènes RREB1 (6p25), MYB (6q23) et CCND1 (11q13) et du centromère du chromosome 6 par FISH (Abbott) avait une spécificité de 95 % et une sensibilité de 80 %<sup>(1)</sup>. Le but de cette nouvelle étude est de tester cette technique sur des tumeurs mélaniques ambiguës en comparant des patients sans évolution (recul minimum de 5 ans) et des patients avec métastases régionales (stade 3) et/ou à distance (stade 4).

### Matériel et méthodes

Six centres européens ont inclus 113 tumeurs mélaniques ambiguës. La technique de FISH a été réalisée sur blocs en formol selon le protocole fourni en présélectionnant sur lame HES les zones d'intérêt. Toutes les tumeurs ont été relues par 3 experts (indépendamment). Le degré d'ambiguïté et le diagnostic (A+ : malin ou A- : bénin) étaient précisés. Une tumeur était considérée comme maligne si au moins 2 experts disaient A+, bénigne si les 3 experts disaient A- et sinon discordante (A+A-A-). Une étude statistique avec méthode de Kaplan Meier a été réalisée.

### Résultats

18/113 cas ont été exclus. Dans 5/95 cas, la FISH était non interprétable. Sur les 90 patients restants, 69 (76,6 %) n'ont pas fait d'évolution (suivi moyen 7,2 ans), 21 (23,4 %) ont présenté des métastases régionales (stade 3 : 12 cas) et/ou à distance (9 cas). Après relecture, 55 cas étaient considérés comme malins, 35 bénins et 9 discordants ; 50/99 cas étaient des tumeurs de Spitz. La FISH était positive dans 23/90 cas et négative dans 67/90 cas. La FISH comparée à l'évolution des patients avait une sensibilité de 42,9 %, une spécificité de 79,7 % et une valeur prédictive négative de 82 %. La courbe de survie (Kaplan Meier) montrait une tendance à un plus mauvais pronostic en

cas de positivité de la FISH ( $p = 0,07$ ). Comparée au diagnostic des experts, la sensibilité de la FISH était de 34,5 % et sa spécificité 90,6 %. La sensibilité et spécificité de ce diagnostic par rapport à l'évolution était de 95,2 % et 51,7 %. En combinant la FISH et le diagnostic, on observait une nette amélioration de la spécificité (75,6 % au lieu de 51,7 % pour le diagnostic expert seul), ainsi qu'une amélioration de la sensibilité (90 % au lieu de 42,9 % pour la FISH seule). L'étude multivariée (Cox regression model) montrait que seul le diagnostic expert avait une valeur statistiquement significative par rapport à l'évolution métastatique des patients ( $p = 0,0064$ ).

### Discussion

Dans l'aide au diagnostic mélanome/nævus nos résultats initiaux utilisant cette technique de FISH sont identiques à ceux rapportés dans la littérature (2,3). Cette nouvelle étude portant sur 95 tumeurs mélaniques ambiguës montre l'amélioration de la performance diagnostique par rapport à l'évolution des patients si on combine la FISH avec le diagnostic histopathologique. L'inclusion de plus nombreux patients permettrait probablement de confirmer la tendance à un moins bon pronostic en cas de positivité de la FISH.

### Conclusion

Notre étude européenne confirme l'intérêt d'utiliser cette technique de FISH en association avec le diagnostic histopathologique pour les tumeurs mélaniques ambiguës.

<sup>(1)</sup> FISH Analysis of 23 Melanomas, 21 Nevi and 38 Ambiguous Melanocytic Tumors Using a Four Colour Probe Set (LSI RREB/LSI MYB/LSI CCND1/CEP6). B. Vergier *et al.*, Vienne, Poster 7<sup>o</sup> Congrès International Mélanomes (mai 2009).

<sup>(2)</sup> Diagnosis of cutaneous melanocytic tumors by four-color probe fluorescence *in situ* hybridization. A.L. Morey and al. Pathology. 2009;41(4):383-7.

<sup>(3)</sup> Fluorescence *in situ* hybridization as a tool for micro-tagging in malignant melanoma. Gerami P and al. Modern Pathol 2009, May 15.

Cette étude européenne est soumise à Modern Pathology.

Actuellement en France, 3 centres ont mis au point cette technique FISH : Lyon (A de la Fouchardière), Rennes (MA Belaud-Rotureau) et Bordeaux (B Vergier et JP Merlio). Nous proposons sur Bordeaux d'aider à la mise en place

de cette technique pour les centres qui voudraient l'appliquer en prenant en stage de 2 jours un binôme pathologiste + technicien/ingénieur.

Enfin, ce travail sur les tumeurs mélaniques ambiguës est une thématique qui intéresse beaucoup les pathologistes, car elle nous pose des problèmes diagnostiques fréquents et souvent nous avons du mal à avoir le suivi de ces patients. Aussi nous aimerions avec le Dr A de la Fouchardière (Lyon) monter un PHRC national ciblé sur ce thème.

# DIAGNOSTIC DU MÉLANOME (CLINIQUE, PATHOLOGIE, IMAGERIE)

Coordinateurs : L. THOMAS, B. VERGIER, E. HINDIE

## RÉSUMÉ DE LA PARTIE IMAGERIE ET RECHERCHE MÉLANOME

■ E HINDIÉ et V LAPRAS

La partie dédiée à l'imagerie a permis de brosser un panorama rapide des méthodes et de présenter en quelques diapos les travaux d'équipes ayant soumis un résumé à cette première Journée. Ces résumés sont reproduits ci-après.

La technique du « ganglion sentinelle » est maintenant largement implantée. L'information sur le statut ganglionnaire a une forte valeur pronostique. Une stadification précise est aussi requise avant d'inclure les patients dans des essais cliniques. Dans la nouvelle (7<sup>ème</sup>) édition de la stadification AJCC, la procédure du ganglion sentinelle est recommandée pour les patients avec lésion d'épaisseur supérieure à 1 mm sans ganglion cliniquement décelable, et sélectivement en cas de mélanome de moindre épaisseur (0,76-1 mm avec ulcération ou indice mitotique  $\geq 1 / \text{mm}^2$ ). Elle nécessite une lymphoscintigraphie préopératoire de bonne qualité avec images dynamiques et statiques. Une acquisition complémentaire tomoscintigraphique « SPECT-TDM » à l'aide d'une machine hybride (gamma caméra/scanner) est d'un apport précieux pour la localisation anatomique du ganglion sentinelle dans certaines situations avec difficulté de lecture sur les images plannaires (notamment les mélanomes du tronc et tête/cou).

L'échographie a un rôle important dans l'évaluation de l'aire de drainage dans le bilan initial et le suivi. Plus sensible et plus spécifique que la palpation, elle peut être complétée par une cytoponction. Dans le domaine de l'échographie, Machet et collaborateurs (Tours) ont fait part de leurs travaux sur la mesure de l'épaisseur tumorale à l'aide d'une sonde haute fréquence. Selon ces auteurs, une mesure précise de l'épaisseur de la lésion primitive pourrait permettre une exérèse avec des marges d'emblée adaptées. L'évaluation préopératoire par échographie peut aussi éviter la chirurgie du ganglion sentinelle en cas de positivité. Les mesures par échographie de la néovascularisation de la lésion primitive a aussi une valeur pronostique (Lassau 2006).

Devant une récurrence locorégionale ou distante, il est important de sélectionner les patients pouvant bénéficier de méthodes de traitement invasif de ceux qui ne tireront aucun bénéfice d'un traitement chirurgical. À côté de l'imagerie conventionnelle (TDM thoraco-abdomino-pelvienne ; IRM du cerveau), l'utilité de la TEP au 18FDG dans le bilan d'opérabilité est bien reconnue. La généralisation des machines TEP-TDM a renforcé le rôle de l'examen au 18FDG. L'adjonction des informations anatomiques permet une meilleure caractérisation des foyers de fixation et d'augmenter la sensibilité, notamment par la détection de petites lésions au niveau pulmonaire. Les performances peuvent être encore renforcées par l'utilisation de produit de contraste pour la partie TDM de l'examen. Mais certaines limites persistent, liées entre autres à l'acquisition des images en mode respiration libre.

Les performances des différents moyens d'imagerie ont augmenté de manière importante

ces dernières années. Ceci est valable pour la TEP-TDM, mais aussi pour l'imagerie morphologique avec les scanners multi-coupes et l'IRM corps entier. Jovet et collaborateurs (Lyon) ont fait part de données préliminaires de l'apport de l'IRM corps entier avec séquences de diffusion dans le bilan d'extension de patients atteints de mélanome stade IV.

L'utilisation de l'imagerie en coupe dans le suivi cause des soucis de rentabilité diagnostique (coût/bénéfice), du pourcentage important de faux-positif, et du problème de la dosimétrie (pour la TDM et la TEP-TDM), notamment pour les patients jeunes. Des études sont encore nécessaires pour bien définir les groupes à risque élevé de récurrence sous forme de métastase à distance dans les 5 premières années de suivi. En plus des paramètres classiques d'épaisseur tumorale et d'ulcération, d'autres paramètres comme la croissance rapide, l'index mitotique et l'invasion vasculaire au sein de la lésion primitive pourraient améliorer la sélection. De même, pour les patients avec ganglion sentinelle positif, la taille et le nombre de métastases, l'ulcération du primitif, etc., sont des paramètres qu'il faudra sans doute prendre en compte pour bien définir des groupes pour lesquels une surveillance lourde est justifiée. Beaucoup de travail reste aussi à faire en imagerie morphologique et fonctionnelle dans le domaine de l'évaluation de la réponse aux traitements des patients métastatiques.

D'autres traceurs sont en développement. Cachin et collaborateurs (Clermont-Ferrand) ont fait part de leurs travaux dans l'imagerie du mélanome à l'aide d'une iodobenzamide marquée à l'iode-123 (BZA2). L'affinité de cette classe de molécule pour la mélanine est bien connue et la localisation intracellulaire spécifique avait été étudiée par microscopie ionique (Chéhadé 2005). Un essai clinique de phase 3 compare l'imagerie 123I-BZA2 à la TEP au 18F-FDG. Cette équipe évalue aussi les possibilités de traitement du mélanome disséminé par radiothérapie interne vectorisée. Une quinoxaline marquée par iode-131 [<sup>131</sup>I]ICF01012 est en fin de validation préclinique.

## 35. DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX TRACEURS DU MÉLANOME

■ CACHIN F *et al.* ■ CLCC Jean Perrin, UMR 990 Inserm/Université d'Auvergne

Face au très mauvais pronostic du mélanome disséminé, il existe un besoin réel de stratégies spécifiques tant pour l'imagerie que la thérapeutique.

L'UMR 990 Inserm/Université d'Auvergne/ CLCC Jean Perrin a mis en évidence et développe depuis plusieurs années des traceurs iodés, benzamides ou dérivés, avec une affinité spécifique pour le mélanome du fait d'une liaison au pigment mélanine. Ces molécules sont ainsi des vecteurs potentiels pour délivrer aux lésions tumorales, un radio-isotope ou un agent de chimiothérapie. Nos travaux vont de la conception aux étapes de validation préclinique voire aux essais cliniques pour différentes applications :

- imagerie TEMP après marquage par  $^{123}\text{I}$ : une molécule, BZA2 a été sélectionnée pour un essai clinique de phase 3 comparativement à l'imagerie TEP/ $^{18}\text{F}$ FDG dans le cadre d'un PHRC réalisé sur 10 centres, dont nous sommes le promoteur ;
- radiothérapie interne vectorisée après marquage par  $^{131}\text{I}$ :

une quinoxaline, [ $^{131}\text{I}$ ]ICF01012, est en fin de validation préclinique avec un effet antitumoral significatif sur modèles murins et humains, tant en termes de pousse que de dissémination et d'agressivité. Ce composé devrait être transféré rapidement en clinique pour un 1<sup>er</sup> essai en imagerie afin de définir la dosimétrie chez l'homme ;

- une démarche bimodale, imagerie TEP et radiothérapie avec des vecteurs à la fois iodés et fluorés pouvant donc être marqués par  $^{131}\text{I}$  ou  $^{18}\text{F}$  (voire  $^{123}\text{I}$  ou  $^{124}\text{I}$ ) : le concept est déjà validé avec une première molécule ;
- chimiothérapie vectorisée : la pharmacomodulation d'un inhibiteur de résistance par conjugaison d'un vecteur a déjà conduit à des résultats positifs en terme de vectorisation et de maintien de l'activité. La vectorisation de cytotoxiques est à l'étude.

Enfin, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est abordée, notamment les protéines impliquées dans la dissémination.

## 36. IRM CORPS ENTIER AVEC SÉQUENCE DE DIFFUSION VERSUS PETSCAN, TDM 4 ÉTAGES ET ÉCHOGRAPHIE GANGLIONNAIRE DANS LE BILAN D'EXTENSION DU MÉLANOME STADE IV

■ JOUVET JC<sup>1</sup>, THOMSON V<sup>1</sup>, JOURNE C<sup>1</sup>, LAPRAS V<sup>2</sup>, DURUPT F<sup>3</sup>, THOMAS L<sup>3</sup>, BERTHEZENE Y<sup>1</sup>

■ <sup>1</sup>Service de Radiologie, Hôpital de la Croix Rousse, Lyon ; <sup>2</sup>Service de Radiologie, Centre Hospitalier Lyon Sud, Lyon ; <sup>3</sup>Service de Dermatologie, Centre Hospitalier Lyon Sud, Lyon

L'irradiation liée à l'imagerie médicale, en particulier au scanner et au PET-Scan, est reconnue comme un facteur de risque de cancérogénèse. Les populations suivies régulièrement pour des mélanomes bénéficient de bilan d'imagerie irradiant à une fréquence très élevée, scanner cérébral et thoraco-abdomino-pelvien tous les 3 mois pour une durée d'au moins 3 ans.

Le but de l'étude est de comparer l'efficacité de l'IRM corps entier, examen non irradiant, par rapport à celle des techniques de référence que sont le scanner cérébral et

thoraco-abdomino-pelvien, le PET-Scan et l'échographie ganglionnaire dans le bilan d'extension initial ou de suivi de patients atteints de mélanome stade IV (M+) suivis dans le service de dermatologie du Pr Thomas (Centre Hospitalier Lyon Sud, Lyon). Elle compare la sensibilité de l'IRM corps entier par rapport à l'ensemble PET-Scan + TDM 4 étages + échographie ganglionnaire pour la détection de localisations secondaires classées par grands sites métastatiques (crâne, cou, thorax, abdomen-pelvis, os et ganglions). Le critère de jugement principal est le nombre et la localisation des lésions secondaires mises en évidence.

## 37. CARACTÉRISATION PAR IMAGERIE ULTRASONORE HAUTE RÉOLUTION DES TUMEURS CUTANÉES (DONT MÉLANOME)

■ MACHET L *et al.* ■ CHU Tours et Inserm U930

La mesure de l'épaisseur tumorale est un élément important dans la prise en charge (choix des marges chirurgicales) et dans le pronostic. Nous utilisons pour des travaux de recherche clinique l'appareil mis au point et breveté par l'équipe (F. Patat, L. Vaillant). Deux ingénieurs travaillent à la mise au point de sondes de fréquences plus élevées (50 MHz). Une sonde 3D a été mise au point.

Mesurer avec précision l'épaisseur pourrait permettre plus facilement de ne pas fixer l'ensemble de la lésion pour l'étude histologique et disposer de matériel frais pour des études d'expression génique.

Machet L, Ossant F, Bleuzen A, Gregoire JM, Machet MC, Vaillant L. L'échographie cutanée haute résolution : utilité pour le diagnostic, le traitement et la surveillance des maladies dermatologiques. *J Radiol* 2006;87:1946-61.

Machet L, Belot V, Naouri M, Boka M, Mourtada Y, Perrinaud A, Girardeau B, Laure B, Machet MC, Vaillant L. Preoperative measurement of thickness of cutaneous melanoma using high-resolution 20 mhz ultrasound imaging: feasibility and pitfalls to predict surgical margins. A prospective study of 31 cases and a systematic review of the literature. *Ultrasound Med Biol* 2009;35:1411-20.

Mahtab Samimi, Adeline Perrinaud, Michael Naouri, Annabel Maruani, Elodie Perrodeau, Loïc Vaillant, Laurent Machet High resolution ultrasonography helps the differential diagnosis between blue nævi and cutaneous metastases of melanoma. *Br J Dermatology*, soumis.

## 38. ÉVALUATION D'UNE PLATEFORME D'IMAGERIE MULTIMODALE CUTANÉE POUR LE DIAGNOSTIC ET LE PRONOSTIC *IN VIVO* DES LÉSIONS PIGMENTÉES

■ MEYER N<sup>1</sup>, LOURARI S<sup>1</sup>, LAGARDE JM<sup>2</sup>, KRIEF B<sup>3</sup>, BATATIA H<sup>4</sup>, PAUL C<sup>1</sup>

■ <sup>1</sup>Université Paul Sabatier, Toulouse III et service de Dermatologie, CHU de Toulouse ; <sup>2</sup>Institut de recherche Pierre Fabre, Toulouse ; <sup>3</sup>Magellium, Toulouse ; <sup>4</sup>IRIT, Toulouse

L'incidence du mélanome a été multipliée par 2 en 20 ans, et l'on estimait qu'en l'an 2000 en France, 7 500 nouveaux cas avaient été diagnostiqués (2,6 % des cancers incidents). La progression de l'incidence des mélanomes en France est la plus importante observée parmi les cancers. Son dépistage et sa prévention sont des objectifs prioritaires de santé publique.

Le pronostic du mélanome est dicté par le degré d'envahissement de ces structures sous-épidermiques, et évalué au cours de l'examen anatomopathologique par les indices de Breslow et de Clark. L'indice de Breslow est défini comme l'épaisseur tumorale la plus importante mesurée (en millièmes de millimètres) à partir de la couche granuleuse de l'épiderme. Le diagnostic de certitude du mélanome n'est actuellement pas réalisable *in vivo* et requiert un examen anatomopathologique de la lésion dans sa totalité. Une évaluation des diagnostics anatomopathologiques portés sur les exérèses à visée diagnostique de lésions cutanées cliniquement suspectes retrouvait une majorité de lésions bénignes (56,7 %) dont 46 % de nævus.

La problématique de la prise en charge des lésions pigmentaires en pratique clinique courante réside dans plusieurs points : le diagnostic *in vivo* n'est pas possible avec certitude, entraînant une forte proportion d'exérèses à visée diagnostique. D'autre part, l'évaluation *in vivo* des principaux facteurs pronostiques du mélanome n'est pas possible, imposant un examen anatomopathologique de la totalité de la lésion.

La dermatoscopie permet d'améliorer la performance diagnostique, et de réduire le recours aux exérèses à visée diagnostique, sans toutefois les remplacer. L'examen des lésions cutanées pigmentées atypiques, mais non suspectes en dermatoscopie avec comparaison séquentielle de celles-ci, est un moyen de dépistage précoce des mélanomes. Cependant, ces appareillages restent sommaires : le degré de définition des images est faible, le champ d'acquisition est restreint et les données recueillies ne sont pas calibrées.

La microscopie confocale *in vivo* a fait l'objet d'évaluations dans le cadre du diagnostic *in vivo* du mélanome et semble apporter de substantiels gains en matière de spécificité. La validation de cette technique d'imagerie comme



critère diagnostic, serait un progrès dans la prise en charge des sujets à risque de mélanome. De plus, plusieurs techniques (échographie cutanée 3D haute fréquence et tomographie en optique cohérente) pourraient permettre d'évaluer l'épaisseur de la lésion avant exérèse.

Nous présentons un projet évaluant l'apport diagnostique

et pronostique (sensibilité, spécificité, reproductibilité, corrélation avec les examens anatomopathologiques et les mesures anatomopathologiques d'épaisseur) d'une plateforme d'imagerie multimodale cutanée (vidéomicroscopie haute définition en colorimétrie calibrée, microscopie confocale, échographie haute fréquence 3D, tomographie en optique cohérente) dans un contexte de lésion pigmentée.

## 39. DÉVELOPPEMENT D'UN OUTIL MULTISPECTRAL EN DERMATOLOGIE

■ JOLIVOT R<sup>1</sup>, MITHRA J<sup>1</sup>, MARZANI F<sup>1</sup>, VABRES P<sup>1, 2</sup>

■ <sup>1</sup>Le2i, UMR CNRS 5158, Université de Bourgogne ; <sup>2</sup>Dermatologie, CHU de Dijon

L'analyse des propriétés optiques de la peau humaine normale et pathologique est une des voies de recherche qui pourrait permettre d'améliorer le diagnostic des tumeurs pigmentaires. L'équipe M2D+ du laboratoire Le2i a développé de longue date des prototypes de caméras multispectrales permettant l'acquisition et le traitement des données. Nous avons donc conçu un prototype de caméra multispectrale appliqué à l'utilisation dermatologique nommé ASCLEPIOS.

Le système ASCLEPIOS est adapté aux contraintes cliniques : ergonomie adaptée, temps d'acquisition très court. Il est doté d'une caméra d'acquisition associée à un jeu de filtres interférentiels et d'un ordinateur permettant son pilotage, ainsi que l'exécution d'algorithmes d'analyse de ces données. La première étape consiste à acquérir une séquence de 10 images spectrales d'une largeur de 40 nm (allant de 400 nm à 800 nm) d'une surface de peau lors de l'examen dermatologique. Ensuite, ces données sont traitées par un logiciel qui permet de générer un cube hyperspectral. Sa particularité est de fournir un spectre de réflectance pour chaque zone bidimensionnelle de peau élémentaire acquise précédemment. Le spectre de réflectance varie selon la réfraction et la diffusion optiques des diverses interfaces (air-épiderme, épiderme-derme) et la concentration des différents chromophores de la peau, essentiellement la mélanine et l'oxyhémoglobine. L'intérêt

d'un tel spectre est de délivrer une information reproductible, indépendante des conditions d'acquisition (éclairage ambiant, etc.), contrairement aux images fournies par des appareils photographiques couleur.

En pratique médicale, l'analyse spectrale permet la caractérisation objective et quantifiable des troubles de la pigmentation et de la vascularisation cutanées. L'information acquise à chaque visite étant indépendante de l'éclairage, elle permet le suivi évolutif d'un patient dans les meilleures conditions de reproductibilité. Sur le versant de l'analyse d'images, nous mettons en place des méthodes de traitement des signaux permettant l'extraction de caractéristiques 2D à des fins d'aide au diagnostic. Nous avons parallèlement développé une méthode permettant la quantification des chromophores de la peau (mélanine et hémoglobine). Elle est basée sur le principe de la séparation de source « en aveugle » qui utilise une analyse en composantes indépendantes. L'algorithme développé s'applique sur le cube hyperspectral précédemment reconstruit. Des tests préliminaires ont montré qu'il permet de différencier des zones de peau (tache café-au-lait/peau saine) par la quantification du contenu en de mélanine. Par conséquent, le prototype ASCLEPIOS combiné à la méthode de séparation de source pourrait permettre un suivi non-invasif de différents troubles de la pigmentation de façon objective et quantifiable.



# RECHERCHE TRANSLATIONNELLE DANS LE MÉLANOME EN FRANCE

Coordinateurs : M.-F. AVRIL et C. CHEVREAU

## Définition de la recherche translationnelle :

- Support biologique à l'activité clinique
- Recherche qui pose des questions cliniques ou cognitives avec des modèles humains

## Questions posées par les projets de recherche présentés :

- Modèles expérimentaux issus de patients pour répondre aux questions cliniques
  - Modèles animaux de xénogreffes de tumeurs de la choroïde : évaluation préclinique profil de réponse des chimiothérapies
  - Culture organotypique de peau : rôle des cellules du microenvironnement/rôle de Rho-GTPases
- Recherche de nouveaux biomarqueurs par des techniques de Moyen/Haut débit
  - Prédiction de la récurrence
    - Sérum
    - Profils protéiques par la technique SELDI-TOF-MS
    - Protéines rétrovirales endogènes (HERV) par technique originale (ApoH technologie)
  - Pronostic et suivi
    - Marqueurs plasmatiques
    - Marqueurs protéiques
  - Auto-immunité spontanée et pronostic/auto-anticorps
  - Susceptibilité et prédiction de l'évolutivité
    - Marqueurs génétiques : gènes de prédisposition/gène/phénotype/environnement
    - Single nucleotide polymorphism (SNP)
    - Marqueurs par génomique différentielle
    - Expression
- Recherche de nouveaux biomarqueurs par des techniques sur paraffine
  - Étude de la valeur pronostique de marqueurs
    - Angiogénèse et invasion
    - Inflammation et immunité innée et adaptative
    - Gènes de prédisposition au mélanome
- Nouvelles cibles
- Situations cliniques particulières
  - Grossesse-Enfants
- Thérapeutique
  - Nouvelles thérapeutiques
  - Essais cliniques

## 40. LA GROSSESSE FAVORISE L'ÉVOLUTION MÉTASTATIQUE DU MÉLANOME EN FAVORISANT LA LYMPHANGIOGÈNE DÉPENDANT DU VEGF-A

■ KHOSROTEHRANI K, NGUYEN HUU S, PRIGNON A, AVRIL MF, BOITIER F, OSTER M, MORTIER L, RICHARD MA, MAUBEC E, KEROB D, SOUTEYRAND P, HANNA EL BALAA, MOGUELET PH, GUÉGAN S, ARACTINGI S

■ Laboratoire des cellules souches fœtales, Inserm UMRS 938, Université Pierre et Marie Curie, site Saint-Antoine, 27 rue de Chaligny, Paris

### Contexte

Le mélanome est une des principales tumeurs malignes du sujet jeune et représente au moins 8 % des cancers associés à la grossesse. Durant la grossesse, un petit nombre de cellules fœtales pénètrent dans la circulation sanguine maternelle. Ces cellules sont capables de migrer dans les différents organes maternels et de s'y différencier pour participer à la réparation en cas de dommages tissulaires. D'autre part, la grossesse est responsable d'un certain nombre de modifications immunes et vasculaires, capables d'influencer le développement tumoral. Or, l'impact de la gestation sur le mélanome est sujet à controverses.

### OBJECTIFS

Afin de préciser les relations entre mélanome et grossesse, nous avons analysé ces tumeurs chez l'homme et chez la souris. Le but était de déterminer l'influence de la gestation en termes d'évolution tumorale chez la femme, ainsi que dans un modèle murin de mélanome métastatique (B16).

### Résultats

Des cellules fœtales ont pu être détectées dans 63 % des mélanomes primitifs humains et dans seulement 12 % des naevi associés à la grossesse ( $p = 0,034$ ), et dans 57 % des mélanomes B16 de souris gestantes mais jamais en peau normale ( $p = 0,000022$ ). Plus de 50 % de ces cellules fœtales exprimaient les marqueurs endothéliaux CD34,

CD31 et le facteur von Willebrand. De plus, plus de 30 % des cellules fœtales chez la souris exprimaient le marqueur lymphatique Lyve-1.

Dans le modèle murin B16, la croissance tumorale, le nombre de métastases et la mortalité étaient augmentées chez les souris gestantes. Ces modifications étaient associées à une augmentation de la lymphangiogenèse intratumorale au cours de la gestation. Les tumeurs provenant de souris gestantes exprimaient des niveaux accrus de VEGFa et PlGF, tant au niveau de l'ARN messager que de la protéine, tandis que les niveaux de VEGFc étaient comparables à ceux des souris contrôle non gestantes, indiquant que ces molécules sont impliquées dans la lymphangiogenèse. L'analyse de mélanomes primitifs chez des femmes enceintes comparés à des femmes contrôles appariées non enceintes a montré une augmentation similaire de la lymphangiogenèse grâce à l'analyse morphométrique.

### Conclusion

Nous avons pu montrer que les mélanomes associés à la gestation contenaient fréquemment des cellules fœtales de phénotype endothélial. De plus, la gestation est responsable d'une lymphangiogenèse augmentée dans le mélanome *via* une surexpression de VEGFa, tant chez l'homme que chez la souris. Ceci conduit à une évolution métastatique accentuée dans notre modèle murin.

## 41. IMPLICATION DES CELLULES NATURAL KILLER DANS LA RÉPONSE IMMUNE ANTITUMORALE

■ CAIGNARD A *et al.* ■ Inserm U1016, Hôpital Cochin CHRU Lille ; Inserm U837

L'immunothérapie reste une option thérapeutique valable pour les tumeurs qui résistent aux traitements classiques par chimiothérapie et radiothérapies. L'importance de l'infiltrat de cellules immunes comme facteur pronostique a été décrite dans les années 1990. Les mélanomes sont des tumeurs immunogènes et les rares régressions tumorales bien documentées s'accompagnent d'un abondant infiltrat soulignant que le système immunitaire peut contrôler la progression tumorale.

Le choix d'étudier les cellules Natural Killer (NK) dans le mélanome métastatique tient compte des données récentes qui soulignent leur importance dans la réponse immune antitumorales. Les cellules NK (5 à 15 % des cellules lymphoïdes circulantes) sont des effecteurs cytotoxiques antitumoraux puissants, également présentes dans les organes et les tissus enflammés. Les cellules NK sécrètent des cytokines (IFN $\gamma$ ) et régulent l'amplitude et le maintien de la réponse immune T spécifique. L'activation des NK est régulée par un équilibre de signaux délivrés par des récepteurs

activateurs et inhibiteurs. Les signaux activateurs reconnaissent des molécules du stress induits sur les cellules tumorales. Les molécules du CMH-I dont l'expression est fréquemment altérée par les cellules tumorales se lient aux récepteurs inhibiteurs pour bloquer les fonctions NK.

Nos résultats récents indiquent que les patients atteints de mélanome métastatiques de stade IV (n=35) ont des NK circulantes qui présentent un phénotype activé. Ces cellules NK immunosélectionnées lysent de façon efficace les cellules de mélanomes primaires. Les cellules primaires de mélanome expriment les principaux ligands des récepteurs activateurs NK. Nos résultats indiquent que la chimiothérapie module le statut d'activation des cellules NK circulantes. Les mécanismes qui concourent à l'activation des NK *in vivo* sont en cours d'étude.

Ces données apportent des arguments pour le développement de thérapies utilisant les cellules NK pour les patients atteints de mélanome.

## 42. SMALL-MOLECULE DRUGS MIMICKING DNA DAMAGE: A NEW STRATEGY FOR SENSITIZING TUMORS TO RADIOTHERAPY

■ DUTREIX A *et al.* ■ Institut Curie/CNRS

The ability of cancer cells to recognize DNA damage and initiate repair is an important mechanism in therapeutic resistance. High expression of repair pathways has been observed in Melanoma that is known to frequently present intrinsic radio- and chemo-resistance. Inhibition of DNA repair for a short period during treatment has the potential to make cancer cells more vulnerable to the damaging effects of therapy, therefore increasing the response to treatment.

We developed a novel strategy for inhibiting DNA repair. We designed small DNA molecules that mimic DNA double-strand breaks (called Dbait) and act by disorganizing damage signaling and DNA repair. We analyzed the effects of Dbait in cultured cells and on xenografted human melanoma, and performed preliminary studies of their mechanism(s) of action. We demonstrated that Dbait is recognized by the DNA-PK repair complex and activates its

kinase activity. Dbait triggers a "false signal" of DNA damage in the cell that prevents the location of DNA repair enzymes on chromosomes at damage induced after treatment and thereby inhibits their repair.

Dbait sensitizes melanoma tumors to radiotherapy. Clinical trial combining radiotherapy and Dbait on skin local metastasis are programmed for the end of 2010.

In a recent study we demonstrated that Dbait inhibits the location of XRRC1 at damage and we started assays to test its ability to sensitize melanoma to alkylating-agent treatment (DTIC) in collaboration with the group of C. Lebbe.

We have developed two models for monitoring metastasis and we plan to compare different protocols associating Dbait to conventional treatment in view to reduce the occurrence of distal metastasis.

M. Quanz, D. Chassoux, N. Berthault, C. Agrario, J.S. Sun and M. Dutreix  
Hyperactivation of DNA-PK by double-strand break mimicking molecules disorganizes DNA damage response, PLoS One 4 (2009) e6298.  
M. Quanz, N. Berthault, C. Roulin, M. Roy, A. Herbette, C. Agrario,

C. Alberti, V. Josserand, J.L. Coll, X. Sastre-Garau, J.M. Cosset, L. Larue, J.S. Sun and M. Dutreix  
Small-molecule drugs mimicking DNA damage: a new strategy for sensitizing tumors to radiotherapy, Clin Cancer Res 15 (2009) 1308-1316.

## 43. RÔLES DES RAYONNEMENTS UV DANS LA SURVENUE DES CANCERS DE LA PEAU

■ GALIBERT MD *et al.*

■ CNRS-UMR 6061 Institut de génétique et développement de Rennes (IGDR)/Université de Rennes 1/CHU

Nos travaux sont centrés sur la voie de signalisation UV-dépendante p38 et la facteur de transcription USF-1 de la même famille que le facteur Mitf dont le rôle majeur dans la différenciation et prolifération des mélanocytes est établi. USF-1 pour sa part médiation la réponse pigmentaire UV-induite (Galibert, EMBO J 2001 ; Corre, JBC 2004, 2009) ainsi que la reconnaissance des dommages de l'ADN (Baron *et al.*, soumis ; Corre *et al.*, soumis). À ce titre USF 1

participe au maintien de l'intégrité du génome en réponse aux rayonnements UV. Ces processus sont actuellement abordés et approfondis à l'aide de souris KO USF-1

Notre expertise de la réponse UV et du facteur USF-1 nous conduit à interagir en nationale avec l'équipe du Pr L. MISERY (Univ Brest) ; R. BALLOTTI (Univ Nice) ; L. LARUE (Institut Curie) ; A TAIEB (Bordeaux)

## 44. IDENTIFICATIONS DE MARQUEUR DU MÉLANOME

■ GALIBERT MD *et al.*

■ CNRS-UMR 6061 Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR)/Université de Rennes 1/CHU

Nous développons des approches génomiques afin d'identifier des gènes différentiellement exprimés dans un contexte tumoral (RGP, VGP, MM) et étudions leur fonction dans le développement tumoral. Dans ce contexte

nous collaborons avec l'équipe de Catherine André, Génétique du Chien CNRS UMR6061, le réseau Inserm Bior-Derm (Pr B. DRENO) et les cliniciens du CHU-CRLCC de Rennes.

## 45. MARQUEURS PLASMATIQUES DANS LE MÉLANOME MALIN : TYROSINASE, PS100, MIA, LDH, INTÉRÊT DANS LE PRONOSTIC ET LE SUIVI

■ GARNIER JP *et al.* ■ Biochimie Saint-Louis APHP, Paris 5 – UA 2498, et Inserm U176

Cohorte suivie à l'hôpital Saint-Louis depuis plusieurs années, 898 patients, 2178 consultations, 1744 dosages de Tyrosinase (rapport L-DOPA/Tyrosine par HPLC), MIA, PS100, LDH.

### Description de la population

Survie moyenne à 10 ans 56 % tous stades confondus, localisation initiale : jambes 32 %, thorax-abdomen 29 %, tête-cou 17 %, pied 11 %, bras 9 %, main 2 %. Localisation des métastases : ganglion 41 %, peau 20 %, poumon 17 %, foie 8 %, cerveau 7 %, abdomen 4 %, os 3 %

### Médiane de survie et stade

60 mois au stade III, 19 mois au stade IV

### Marqueurs et stade AJCC

LDH et MIA : pas de différence significative entre les stades, S100 stades II-IV : Diff Sign  $p < 0.05$ , Tyrosinase I-IV, III-IV : DS  $p < 0,001$

### Médiane de survie en fonction de la Tyrosinase

$< 20$  (Normale  $< 16$ )  $>$  à 10 ans, et Tyrosinase  $> 20$  : 4 ans,  $> 50$  : 4 mois

### Courbes ROC

Meilleure aire sous la courbe Tyrosinase 0,63 > PS100 0,60  
> DH 0,58 > MIA 0,56

### Sensibilité stades III et IV Tyrosinase

73 %, Spécificité 71 %

### Les proprotéines convertases et le mélanome malin

La famille des proprotéines convertases (furines, PC5b, PC7 en particulier) a de nombreux substrats parmi lesquels EGF, VEGF. Elles semblent favoriser la dissémination et l'invasivité des cellules du mélanome.

Leur expression avancerait avec le stade AJCC du mélanome : expression au stade IV > III > II > I.

Evaluation of the serum L-Dopa / L-Tyrosine ratio as a Melanoma marker. STOITCHKOV K., LETELLIÉ S., GARNIER J.P., BOUSQUET B., TZANKOV N., MOREL P., GHANEM G. LE BRICON T. Melan. Research, 2003, 13, 6, 587 - 593. IF 1.0

Measurement of plasma L-DOPA and Tyrosine by High Performance Liquid Chromatography as a tumor marker in melanoma. T. LE BRICON, S. LETELLIÉ, K. STOITCHKOV, J.-P. GARNIER. Chromatographic methods in clinical chemistry and toxicology, 2006, 56-66.

Clinical value of combined determination of plasma L-DOPA/Tyrosine ratio, S100B, MIA and LDH in melanoma. J.-P. GARNIER, S. LETELLIÉ, B. CASSINAT, C. LEBBÉ, D. KEROB, M. BACCARD, P. MOREL, N. BASSET-SEGUIN, L. DUBERTRET, B. BOUSQUET, K. STOITCHKOV, T. LE BRICON. Europ. J. Cancer, 2007, 43,4,816-821.

## 46. RELATIONSHIP BETWEEN DOSE, EXPOSURE, AND ANTITUMORAL ACTIVITY OF SORAFENIB IN MELANOMA

■ PÉCUCHE N, AVRIL M, KEROB D, BILLEMONT B, BLANCHET B, HERAIT P, GORIN I, VIGUIER M, LEBBÉ C, GOLDWASSER F

■ Hôpital Cochin, AP-HP et Université Paris Descartes

Background: Interpatient variability in sorafenib (SOR) bioavailability and too-early treatment discontinuation might account for poor efficacy results of SOR in melanoma. A cohort of poor prognosis patients (pts) received dose-escalated SOR. Methods: In absence of limiting toxicity, dose was escalated every 2 weeks. Plasma SOR measurement is routinely made in our institution allowing retrospective pharmacokinetics analysis. A total of 163 plasma samples were assessed by HPLC with UV detection method and analyzed using nonlinear mixed-effects modeling.

Results: 28 pts/24 evaluable for response. Median (M) age 57 (31-80), PS $\geq$  2: 28 %. Primary: cutaneous (75 %), choroid (11 %), other (14 %). 89 % AJCC stage IV M1c, >2 sites: 71 %; lung, liver and brain mets in 57 %, 61 %, and 32 % of pts. LDH>N: 54 %; Previous chemotherapy: 93 %; M higher tolerable dose of SOR: 800 mg BID (range: 200-4000 mg), M treatment duration: 2.6 months (0.4-

11.8). Overall response rate was 21 %: 1 (4 %) complete and 4 (17 %) partial responses, 11 (46 %) stable, and 8 (33 %) progressive disease. M TTP: 3 months. M overall survival: 9.4 months (50 % censored at the time of analysis). 2 groups are of interest: 1) SOR responders (5 pts): M PFS was 6 months (3-8) and M survival was 11.3 months (9.6-18.7). 2) 11 pts with initial overall PD but at least one responding site and consequently receiving increasing dose of SOR: M PFS: 6 months (0.7-8), M survival: 9.6 months (2.6-15.3). M survival in pts with brain mets: 5.4 (2.6-15.4) months. Relation between dose and AUC was infra-proportional. There was a trend for higher rate of disease progression in pts with SOR AUC below the mean AUC of the population: 45.5 % versus 27.3 %. Conclusions: Dose-individualization with PK-monitoring might prevent under-exposure to fixed-dose SOR, benefit to pts with dissociated response, and account for these PFS and OS results.

Dose BID	Median AUC mg/L.h	Pts	Samples	Dose BID	Median AUC mg/L.h	Pts	Samples
200	29,5	1	1	2,400	75	3	11
400	48,4	4	4	2,800	138,9	2	3
800	57,6	25	74	3,200	97,9	1	3
1,200	85,6	13	26	4,000	49	1	1
1,600	73,3	13	27	4,400	70,1	1	4
2,000	105,0	6	6	5,200	52,3	1	3

## 47. MASITINIB, ORAL TYROSINE KINASE INHIBITOR, IN THE TREATMENT OF ADVANCED MELANOMA: PRECLINICAL PROOF-OF-CONCEPT AND PHASE 1/2/3 STUDY DESIGNS

■ HERMINE O<sup>1,2</sup>, THAMM D<sup>3</sup>, HUMBERT M<sup>2</sup>, LETARD S<sup>4</sup>, MOUSSY A<sup>2</sup>, DUBREUIL P<sup>4</sup>

■ <sup>1</sup>CNRS UMR 8147, Assistance publique hôpitaux de Paris et Service d'hématologie adulte, centre de référence sur la mastocytose, Hôpital Necker, Université Paris V, Paris, France ; <sup>2</sup>AB Science, Paris, France ; <sup>3</sup>The Animal Cancer Center, Colorado State University, Fort Collins, USA ; <sup>4</sup>Inserm U891, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Signalisation, Hématopoïèse et Mécanismes de l'Oncogénèse, Centre de Référence des Mastocytoses, Marseille, France; Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France; Université de la Méditerranée, Marseille, France

### Abstract

The continuing poor prognosis and lack of effective treatments for non-resectable or metastatic stage 3/4 melanoma highlight an unmet medical need in human and veterinary medicine. It is crucial therefore, to identify alternative or complementary treatment strategies that improve the clinical management and prognosis of patients afflicted with this cancer. Masitinib is an oral tyrosine kinase inhibitor (TKI) that *in vitro* has greater activity and selectivity against c-Kit than imatinib. It is particularly efficient in controlling the proliferation, differentiation and degranulation of mast cells; cells that are involved in several mechanisms that facilitate tumour growth. Masitinib also potently targets PDGFR, Lyn and to a lesser extent the FAK pathway, without inhibiting kinases of known toxicities. Respectively, these kinases are associated with: modulating tumoural interstitial pressure and thus, chemotherapy uptake; regulation of cell signalling, adhesion, migration, apoptosis, cell cycle progression and resistance to conventional therapies; and the transduction pathway leading to mast cell IgE induced degranulation. Moreover, *in vivo* and *in vitro* studies have shown that masitinib can enhance the antiproliferative effects of chemotherapeutic agents to various human and canine cancer cell lines.

Specific melanomas have been shown to bear c-Kit aberrations (either mutation or amplification), strongly suggesting that a c-Kit inhibitor such as masitinib could be of therapeutic benefit to this subpopulation. Moreover, there is evidence that this targeted therapy can exert an anticancer action that extends beyond its inherent TKI profile, i.e. through the reduction of tumour progression

and/or improved drug delivery and/or the inhibition of mast cell migration and activation.

We investigated masitinib's potential to sensitize canine melanoma cell lines to chemotherapies using *in vitro* proliferation assays. Masitinib sensitized doxorubicin-sensitive (CML-6M and CML-10C2) cells, as well as resistant (17CM98) melanoma cells to doxorubicin ( $\geq 6$ -fold reduction in IC50 at 5 to 10  $\mu$ M masitinib). These data establish proof-of-concept that masitinib can sensitize canine melanoma tumour cell lines to doxorubicin; as well as cisplatin and gemcitabine to a lower extent in CML-6M. Further confirmation of masitinib's therapeutic potential for this cancer is observed in veterinarian case studies, including a dog with histologically proven metastatic melanoma that was unresponsive to chemotherapy but showed a complete response after introduction of masitinib.

Based upon these studies (as well as successful clinical trials for masitinib treatment of canine MCT, human GIST and advance pancreatic cancer in combination with gemcitabine) two human clinical trials of masitinib treatment for non-resectable or metastatic stage 3/4 melanoma will be initiated in 2010. The first is a prospective, multicentre, open-label, uncontrolled, phase 1/2 study to evaluate masitinib in combination with dacarbazine in the treatment of patients not carrying a mutation in the juxta membrane domain of c-Kit. The second is a multicentre, randomised, open-label, active-controlled, two-parallel groups, phase 3 study to compare masitinib to dacarbazine in the treatment of patients carrying a mutation in the juxta membrane domain of c-Kit.



## 48. IDENTIFICATION OF MELANOMA ANTIGENS AND EPITOPES NATURALLY RECOGNIZED BY TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTES (TIL)

■ LABARRIÈRE N *et al.* ■ Inserm U892, Nantes

For several years, our group has been involved in the identification of melanoma antigens and epitopes naturally recognized by tumor infiltrating lymphocytes (TIL), and in the improvement of passive immunotherapy of melanoma.

Even if the immunogenicity of some TAA has been documented, only for a small number of them has clinical efficiency been documented. Indeed, the clinical efficiency of a given TAA can be assessed either by the analysis of vaccination trials or by the retrospective analysis of the antigens recognized by TIL populations infused to patients in adoptive cell transfer (ACT) trials.

The results of adoptive transfers of TIL populations performed by our group strongly suggest the therapeutic efficiency of such TIL, and indirectly the immunogenicity of some antigens recognized by those TIL populations. We previously demonstrated that the adjuvant infusion of TIL containing CD8 T cells reactive against the autologous melanoma cell line was associated with a prolonged relapse-free survival of treated patients. With the aim to identify

clinically relevant antigens, we decided to extensively characterize TIL populations that had been infused in an adjuvant setting to melanoma patients who experienced a prolonged relapse-free survival.

This retrospective analysis of antigen specificities recognized by such TIL populations led us to identify a new antigen, MELOE-1, which appears to be an attractive target for future immunotherapy protocols. Indeed, there is a strong correlation between the adjuvant infusion of TIL containing MELOE-1 specific T cells and a prolonged relapse-free of treated patients. Furthermore, this antigen is overexpressed by all melanoma cell lines tested, and underexpressed in other tumor cell types or healthy tissues, the mRNA encoding this antigen contains multiple short ORFs, one coding for MELOE-1 antigen, and another one coding for MELOE-2 antigen, also recognized by melanoma specific TILs, and finally we identified CD4 epitopes derived from this antigen. In conclusion, this antigen could be a useful target for the development of vaccine and/or adoptive cell transfer protocols in melanoma.

## 49. MISE AU POINT DE THÉRAPIES CIBLÉES DU MÉLANOME PAR GÉNOTYPAGE, ANALYSE DU SIGNALOSOME, ET MESURE DE LA CHIMIOSENSIBILITÉ

■ LACOUR J Ph *et al.* ■ Inserm – CHU Nice

Un projet de recherche translationnelle a été initié il y a près d'un an, par le Dr Ph BAHADORAN, afin de caractériser des anomalies génétiques, les dérèglements dans les voies de signalisation et la sensibilité aux molécules dans des échantillons de mélanome humains. Nous avons analysé le statut mutationnel de BRAF, NRAS et CKIT (séquençage de 9 exons) à partir d'échantillons de mélanomes frais ou en paraffine. Nous avons également analysé les altérations des voies de signalisation par immunohistochimie avec des anticorps phospho-spécifiques (pERK, p-AKT et p-CKIT). Les tumeurs fraîches sont dissociées et nous mesurons la sensibilité des cellules de mélanomes aux molécules utilisées en chimiothérapie du mélanome (dacarbazine, muphoran, cisplatine) ou à des inhibiteurs

pharmacologiques (sorafenib, imatinib, lapatinib). Ce projet esquisse les contours des méthodes qui devraient être développées pour proposer une thérapie ciblée et personnalisée aux patients atteints de mélanome. Jusqu'à présent, nous avons analysé plus de 50 échantillons de mélanomes, dont 10 mélanomes acraux et 4 mélanomes muqueux. Dans ces échantillons, nous avons trouvé 3 mutations CKIT (23 %), 35 % de mutation dans la voie ERK (B-RAF V600, B-RAF G469S et N-RAS G12A). L'analyse immunohistochimique a démontré l'activation de la voie ERK dans la majorité des mélanomes mutés sur B-RAF et N-RAS. L'activation de la voie ERK a été détectée également dans des mélanomes sans mutation dans ces gènes. Enfin, la sensibilité aux molécules a été étudiée dans

10 échantillons. Une corrélation claire a été observée entre le statut d'activation d'ERK et les effets des inhibiteurs de cette voie. Dans les mois qui viennent, nous développerons l'analyse des mutations dans ERBB4, FGFR2, MMP8 et des voies de signalisation associées. Ce banc d'essai permettra une sélection des patients pouvant être inclus dans les essais cliniques de thérapies ciblées. Ce banc d'essai permettra aussi une évaluation préclinique des projets de recherche fondamentaux qui ont pour but de développer des traitements innovants du mélanome soit (i) en induisant une re-différenciation des cellules tumorales plu-

tôt que de les détruire, en utilisant des agonistes de DP1 (récepteur des prostaglandines) sur la différenciation des cellules de mélanomes et de déterminer l'association thérapeutique optimale avec les dérivés de l'acide rétinoïque avant de réaliser des tests chez l'Homme (projet développé par le Dr Th PASSERON), soit (ii) en ciblant le métabolisme exacerbé dans ces cellules grâce à des molécules telle que la Metformine utilisées dans des désordres métaboliques comme le diabète de type 2 (projet développé par deux chercheurs Inserm, Stéphane ROCCHI et Robert BALLOTTI).

## 50. ESSAI THÉRAPEUTIQUE DE PHASE II OUVERT, NON CONTRÔLÉ, NATIONAL MULTICENTRIQUE, DE TRAITEMENT PAR NILOTINIB EN PREMIÈRE OU SECONDE LIGNE DES MÉLANOMES PRIMITIFS OU STADE III INOPÉRABLES OU STADE IV MUTÉS C-KIT

■ **LEBBÉ C, BAGOT M, BASSET SEGUIN N, VIGUIER M, CHEVREAU C, MOURAH S, DUMAZ N, JANIN A, VÉROLA O**

■ **Hôpital Saint-Louis APHP, Université Paris Diderot, Institut Claudius Régaud**

Le mélanome métastatique est une affection de pronostic redoutable (médiane de survie 6,2 mois) pour laquelle aucun traitement médical efficace n'est disponible. La chimiothérapie de référence, le dédicène, permet d'obtenir des taux de réponse de 7,5 % de courte durée.

Un sous-groupe de mélanome est caractérisé par une grande fréquence de mutation et amplification de c-KIT (15 % comparé à moins de 1 % pour l'ensemble des mélanomes). Ce sous-groupe est représenté par les mélanomes acraux, muqueux ou mélanomes de Dubreuilh. Des réponses anecdotiques rapides et spectaculaires sous imatinib ont été rapportées dans la littérature dans deux mélanomes mutés sur c-KIT.

Des données préliminaires d'un essai de phase II évaluant imatinib, présentées à l'ASCO 2009 (Carvajal, *et al.*, 2009) montrent que 8 sur 15 patients évaluables, porteurs de mutations cKIT, sont répondeurs selon les critères RECIST (ORR 53 %). Les réponses sont souvent durables avec une survie médiane sans progression de 16 semaines. Les patients avec des mutations c-Kit mutations au niveau de la p-loop (exons 17 et 18), de même que les patients avec amplifications de c-KIT, étaient non-répondeurs.

Nous souhaitons évaluer, dans le cadre d'un essai multicentrique national, l'intérêt thérapeutique du nilotinib dans cette

indication. En effet, nilotinib est un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant c-KIT et un spectre d'autres kinases telles que PDGFR et les récepteurs EPHRIN. L'activité de nilotinib sur c-KIT est *in vitro* comparable à celle d'imatinib. Nilotinib est active sur les mutations de c-KIT K642E and L576P, les plus fréquemment rencontrées au cours du mélanome, et ce à des concentrations atteintes en clinique chez les patients. Pour des raisons pharmacologiques, nous pensons que l'activité clinique de nilotinib sera supérieure à celle d'imatinib. En effet, les avantages de nilotinib par rapport à imatinib sont l'excellente tolérabilité et l'absence de syndrome de rétention limitant la réduction de dose. De plus, nilotinib est internalisé essentiellement de façon passive dans le compartiment intracellulaire contrairement à l'imatinib qui nécessite de transporteurs notamment OCT-1.

Par ailleurs, nilotinib inhibe les domaines à activité kinase des récepteurs Ephrin : EphB1, EphB2 et EphB4 (avec des  $CI_{50} < nM$ ) (Melnick 2006). Cette action est potentiellement intéressante dans le mélanome où le rôle des EphB4 dans la migration des cellules tumorales a été montré (Yang 2006).

Enfin, l'inhibition de PDGFR alpha et beta pourrait inhiber l'action paracrine des fibroblastes du stroma tumoral sur les cellules de mélanome (Anderberg 2009).

Objectif principal de l'essai :

- déterminer le taux de réponse à 6 mois de traitement par nilotinib 800 mg/j chez les patients ayant un mélanome muté sur c-KIT ou ayant une amplification de c-KIT (en l'absence de mutation de B-Raf ou N-Ras).

Objectifs secondaires :

- taux de réponse à 3 mois (RC+RP) ;
- taux de contrôle de la maladie à 6 mois (RP+RC+patients stables) ;
- tolérance NCI CTCAE Version 3.0 ;
- études translationnelles voir ci-dessous réalisées à partir de biopsies tumorales faites avant traitement à 1 mois, 3 mois et 6 mois ;
- bibliothèque (sérothèque, RNA et DNA thèque) réalisée avant traitement, 1, 3 et 6 mois de traitement.

Cet essai implique :

- un screening centralisé sur Saint-Louis des mutations (S Mourah) de mutations des gènes c-KIT, NRAS et BRAF et recherche d'amplification du gène c-KIT dans toutes les formes localement avancées (inopérables) ou métastatiques (stade III inopérables, stade IV) de mélanomes des muqueuses, acrolentigineux ou les mélanomes de Dubreuilh ;

- une étude pharmacodynamique (N Dumaz, S Mourah, A Janin) : analyse multiparamétrique par immunohistochimie, puces protéiques en phase reverse et éventuellement western blot (si la quantité de matériel le permet) de la surexpression de c-KIT, son activation, l'activation des voies PI3K, MAPK et des facteurs de transcription de la famille STAT dans les biopsies prélevées avant et au cours du traitement par le Nilotinib.

Mesure de l'induction de mort par apoptose (TUNEL), nécrose (HES), et sénescence (galactosidase).

Caractérisation des effets du traitement sur d'autres voies potentiellement ciblés par nilotinib : système PDGF/PDGFR et Ephrin. Des analyses multiparamétriques et quantitatives seront effectuées sur les principaux biomarqueurs médiateurs de ces processus tumoraux :

- système PDGF/PDGFRs Pathway : les PDGFs (A et B) leurs récepteurs PDGFR-alpha et -beta), K167, p21, p27, Bcl2, STAT1, STAT3, c-Jun et c-Fos ;
- les récepteurs Ephrin et partenaires: Eph-A4, Eph-B1, Eph-B2 et Eph-B4, Ephexin (NGEF), RAC-1, SDF1, CXCR4 et RhoA.

## 51. ÉTABLISSEMENT DE NOUVEAUX MODÈLES DE MÉLANOME : XÉNOGREFFES À PARTIR DE TUMEURS MICRODISSEQUÉES

■ **LEBBÉ C, BAGOT M, BASSET SEGUIN N, VIGUIER M, MOURAH S, DUMAZ N, JANIN A, VÉROLA O, VARNA M**

■ **Hôpital Saint-Louis APHP, Université Paris Diderot**

Le pronostic du mélanome avec métastases à distance (stade IV) reste inchangé depuis 30 ans, avec une survie globale de 6 à 20 % à 5 ans. Afin d'améliorer le pronostic de cette maladie, de nouvelles thérapies méritent d'être évaluées en utilisant des modèles adaptés. Les xénogreffes obtenues après implantation de fragments tumoraux prélevés chez l'homme à des souris immunodéprimées ont démontré une excellente valeur prédictive de l'efficacité des agents pharmacologiques anti-tumoraux. Nous avons déjà établi 7 modèles de xénogreffes à partir de tumeurs primitives ou métastases de mélanome humain micro-dissequées, chez la souris nude. Ces modèles sont stables et reproductibles en ce qui concerne le délai de prise de greffe et les éventuelles localisations métastatiques.

Les orientations actuelles de notre travail :

- effectuer une caractérisation génotypique et phénotypique des modèles établis : mutations BRAF, NRAS, cKIT, cGH array, expression de marqueurs de l'angiogenèse, lymphangiogenèse, invasion, cycle cellulaire, mécanismes de mort spontanée ;
- développer de nouveaux modèles par implantation chez des souris dépourvues d'immunité NK (souris NOG), afin d'obtenir une bonne représentativité de l'hétérogénéité clinique de la maladie et des différents types histogénétiques ;
- utiliser ces modèles pour des essais précliniques.

## 52. INFLUENCE DE LA RÉACTION STROMALE DANS LES ÉVÉNEMENTS CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT ET LA PROGRESSION DU MÉLANOME

■ MAQUART, BERNARD P, GRANGE F, ANTONICELLI F

■ Unité CNRS MEDyC UMR-6237

Previous studies have linked the anti-tumoral effects of the IP-10/CXCL10 chemokine to its immuno-modulatory and angiostatic properties. Conversely, a pivotal role of CXCR3, the IP-10 receptor, was demonstrated in melanoma progression and metastasis to lymph nodes. Herein, we investigated the systemic IP-10-mediated anti-tumoral response in an in-vivo mouse model, and its clinical relevance.

C57BL/6 mice model bearing B16F1 melanoma treated intraperitoneally with an adenovirus vector expressing IP-10 displayed a 35 % inhibition of tumor growth compared to control. In this setting, ELISA and 30-plex cytokine-specific analyses showed that peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with melanoma in remission expressed higher levels of IP-10 than in progression and healthy donors. Also, significant increase of IFN- $\gamma$  level was observed in PBMC from patient in remission compared to healthy donors. Stimulation of the human melanoma cells SK-Mel28, with rIP-10 did not affect cell viability as determined by anti- (Bcl2, Bclxl) and pro-apoptotic (Bax, Bclxs) gene expression and cell microscopy. Howe-

ver, rIP-10 reduced cell proliferation and melanoma invasive property using Matrigel<sup>®</sup>-coated Transwell<sup>®</sup>. Accordingly, only PBMC from patients in remission reduced SK-Mel28 invasiveness.

Our findings show a direct beneficial effect of circulating IP-10 for controlling melanoma progression, and the potential relevance of this blood marker as a prognostic parameter.

Dans le prolongement de cette étude, deux projets sont en cours d'élaboration

- 1) étude du rôle de l'IP10 (CXCL10) et de son récepteur (CXCR3) dans la progression du mélanome de stade III et IV, à partir de prélèvements itératifs (sériques + PBMC) dans une cohorte de malades suivis au CHU de Reims ;
- 2) étude rétrospective multicentrique par immunohistochimie de l'expression de l'IP10 (CXCL10) et de son récepteur (CXCR3) dans les ganglions sentinelles positifs et négatifs de patients suivis pour un mélanome de stade IB à III dans les CHU de Reims, Paris-Bichat, Paris Cochin.

## 53. LES IMIQUALINES : UNE NOUVELLE SÉRIE CHIMIQUE ACTIVE SUR LE MÉLANOME

■ DELEUZE-MASQUÉFA C, GATTACCECA F, MOARBESS G, KHIER S, MARGOUT D, PINGUET F, BRESSOLLE F, BONNET PA

■ Faculté de Pharmacie de Montpellier

Les imiqualines constituent une nouvelle série chimique de dérivés imidazoquinoxalines, protégée par un brevet d'invention international. Par leur structure hétérocyclique, ils s'apparentent à l'imiquimod, premier médicament de type immunomodulateur décrit comme efficace sur le mélanome humain. Les molécules leader ont montré une activité cytotoxique *in vitro* et une efficacité antitumorale *in vivo* supérieures aux molécules de référence (fotémustine et imiquimod). Les paramètres pharmacocinétiques

et les toxicités aiguë et semi-chronique ont été évalués chez le rat. Des études préliminaires sur le mécanisme d'action des imiqualines ont été réalisées.

### Synthèse chimique :

- ces composés sont synthétisés par le laboratoire de chimie organique (Équipe Pharmacochimie et Biomolécules, EA4215) à la Faculté de Pharmacie de Montpellier. Une stratégie de synthèse innovante (7 étapes de

synthèse, rendement moyen de 60 %), permettant une modulation importante, a conduit à l'obtention d'une trentaine de dérivés imidazoquinoxalines<sup>1,2</sup>.

#### Activité antitumorale :

- l'activité des imiquilines dans le mélanome est évaluée en collaboration avec le Centre de lutte contre le cancer de Montpellier ;
- *activité in vitro* : Les molécules synthétisées ont été testées sur différentes lignées cellulaires tumorales d'origine humaine. Sur trois lignées de mélanome (A375, M4Be, et RPMI7591), 2 molécules (EAPB0203, EAPB0503) présentent une activité cytotoxique (test du MTT) largement supérieure à celles de l'imiquimod et de la fotémustine, utilisés comme références (activités cytotoxiques de 45 à 850 fois supérieures sur A375)<sup>1,2</sup> ;
- *activité in vivo* : Des souris nude SWISS xénogreffées par la lignée M4Be ont été traitées par voie intrapéritonéale à la dose de 20 mg/kg, 2 fois par semaine pendant 3 semaines. EAPB0203 a entraîné un retard significatif de la croissance tumorale par rapport au véhicule seul et à la fotémustine, sans signe de toxicité<sup>1</sup>.

#### Pharmacocinétique et toxicité :

- les études ont été réalisées par le laboratoire de Pharmacocinétique clinique (Équipe Pharmacochimie et Biomolécules, EA4215) à la Faculté de Pharmacie de Montpellier ;
- les paramètres ADME ont été évalués chez le rat pour EAPB0203 et EAPB0503. Le schéma métabolique a été déterminé *in vitro* et *in vivo*. La dose létale 50 a été déterminée, par voie intraveineuse, chez le rat pour EAPB0203 (15mg/kg) et pour EAPB0503 (8mg/kg). Aucune toxicité n'a été observée (examens clinique et hématologique normaux) après une administration intraveineuse par jour sur 5 jours de EAPB0203 (3mg/kg) ou de EAPB0503 (5mg/Kg)<sup>3,4</sup>.

#### Mécanisme d'action :

- l'étude du mécanisme d'action des molécules leader est en cours grâce à différentes collaborations. Par analogie avec l'imiquimod, une activité pro-apoptotique et une stimulation du système immunitaire sont ciblées en première intention. Les résultats préliminaires semblent confirmer ce double mécanisme<sup>5,6</sup> ;
- les composés EAPB0203 et EAPB0503 montrent une activité prometteuse dans le mélanome. L'activité *in vivo* devra être étudiée sur des modèles plus proches de la pathologie humaine (animaux non immunodéprimés, métastases cérébrales, etc.). L'étude du mécanisme d'action est une priorité et doit être approfondie grâce à l'établissement de nouvelles collaborations.

1. Moarbess G., Deleuze-Masquéfa C., Bonnard V., Paniagua S., Vidal J-R., Bressolle F., Pinguet F., Bonnet P-A. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 6601-10.
2. Deleuze-Masquefa C., Moarbess G., Khier S., David N., Gayraud-Paniagua S., Bressolle F., Pinguet F., Bonnet P-A. *European J. Med. Chem.* 2009, 44, 3406-3411.
3. Khier S., Moarbess G., Deleuze-Masquefa C., Margout D., Solassol I., Pinguet F., Bonnet P-A., Bressolle F. *J. Sep. Sci.* 2009; 32:1363-1373.
4. Khier S., Deleuze-Masquéfa C., Moarbess G., Gattacceca F., Margout D., Solassol I., Cooper J.F., Pinguet F., Bonnet P-A., Bressolle F. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010, 39(1-3), 23-9.
5. Moarbess G., El-Hajj H., Kfoury Y., El-Sabban M.E., Lepelletier Y., Hermine O., Deleuze-Masquéfa C., Bonnet P.A., Bazarbachi A. *Blood*, 2008, 111(7) : 3770-7.
6. Morjaria S., Deleuze-Masquefa C., Lafont V., Gayraud S., Bompard J., Bonnet P.A., Dornand J. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2006, 19(3), 525-38.

## 54. ÉTUDE CLINICOBIOLOGIQUE DES MÉLANOMES DE L'ENFANT

■ MATEUS C, KAMSU KOM N, FRAITAG S, BARNHILL R, TOMASIC G, LAZAR V, VIELH P, LACROIX L, ROBERT C

■ Service de dermatologie, Institut Gustave Roussy

### Introduction

Le mélanome est une affection rare chez l'enfant mais dont l'incidence est en augmentation. L'histoire naturelle et la biologie du mélanome de l'enfant sont différentes de celles de l'adulte. Nous avons réalisé une étude rétrospective épidémiologique, clinique et évolutive portant sur tous les cas de mélanome survenant chez 68 patients âgés de 0 à 18 ans vus dans notre hôpital entre 1969 et 2008 ayant présenté des récurrences témoignant de l'exactitude du diagnostic.

Parmi ces patients, 56 ont présenté une évolution métastatique, locorégionale (22) ou à distance (34) dont 5 avec localisation méningée. Une procédure du ganglion sentinelle a été réalisée chez 24 patients et 15 étaient positifs. Vingt-neuf patients sont décédés de leur maladie. Les principales caractéristiques de cette cohorte de patients sont : la fréquence des cas survenus sur nævus congénital (20%), la prédominance masculine avant 5 ans, qui s'inverse ensuite dans les tranches d'âge plus élevées, et la fréquence des formes histologiques nodulaires et spizoïdes.

## Objectifs

Alors que les caractéristiques moléculaires des différents types de mélanomes sont maintenant beaucoup mieux connues chez l'adulte, les connaissances dans ce domaine sont très pauvres chez l'enfant. Notre objectif est donc la caractérisation moléculaire des mélanomes de l'enfant. Ce projet a bien entendu une dimension cognitive, mais son but ultime est l'identification de cibles moléculaires potentielles permettant de proposer des traitements adaptés à ces formes rares de mélanomes.

## Matériel et méthodes

Étude rétrospective et prospective des caractéristiques clinico-moléculaires des mélanomes de l'enfant portant sur les cas de l'étude rétrospective sus-citée ainsi que sur de nouveaux cas vus dans le service ou dans d'autres services de dermatologie ou de cancérologie (appel à collaboration). Un effectif total de 100 patients analysables sur le plan moléculaire (ADN, ARN et immunohistochimie) est prévu.

Les données cliniques et évolutives seront portées dans un tableau. Les prélèvements tumoraux seront relus par un panel d'anatomopathologistes experts et une étude immunohistochimique sera réalisée portant sur les protéines intervenant dans les voies de prolifération cellulaires : MAP kinases, PI3kinases, dans l'angiogénèse, les processus d'invasion : intégrines, protéases, CD117, MITF, etc.

L'ADN tumoral sera extrait et un panel de mutations sera

recherché par séquençage direct (92 exons, dont les mutations connues : sur *KIT*, *BRAF*, *NRAS*, *AKT*...).

Sur les échantillons tumoraux en congélation, seront réalisées des études de CGH, de profil d'expression des gènes, et un *kinome array* (en cours de validation).

Les contrôles pour ces études seront des nævus pigmentaires (banque IGR).

Ces études biologiques seront effectuées sur la plateforme de recherche translationnelle de l'IGR (département de Biopath et plateforme génomique) et dans l'unité Inserm U 981.

## Faisabilité

Ce projet ambitieux se heurte à un obstacle qui paraît surmontable par le biais d'une collaboration au moins nationale.

Effectivement, les analyses des ARN ne se font pas encore en routine sur les prélèvements fixés. Or, les mélanomes primitifs sont très rarement congelés. Nous disposerons donc essentiellement de prélèvements métastatiques congelés. La rareté du mélanome de l'enfant, et *a fortiori*, des formes métastatiques nécessitent donc d'étendre les inclusions le plus largement possible.

## Bibliographie

Julie R, Bryan. E, David. C, Seng. JS, Charles. MB. Journal Of Clinical oncology, 2007, 25(11):1363-8.  
Julie R. Lange, Charles M. B. Pediatrics 2005; 115 :802-3.

# 55. RECHERCHE DE NOUVEAUX MARQUEURS SÉRIQUES ET DE POTENTIELLES CIBLES THÉRAPEUTIQUES DU MÉLANOME MALIN

■ MOLES JP *et al.* ■ UMR5247, Université de Montpellier 1

Les paramètres sérologiques les plus utilisés pour la détection précoce d'une récurrence locale ou métastatique dans le suivi des patients atteints de mélanome sont la protéine S100-béta, et les lactates déshydrogénases. Ces marqueurs ne sont toutefois pas optimaux.

Notre première approche a consisté en une caractérisation du profil protéique de sérum de patient atteint de MM, par la technique de SELDI-TOF-MS. L'analyse en hiérarchisation/clustering de ces données a permis d'identifier les sérums de mélanomes vs les sérums contrôles avec une grande précision (sensibilité 96,7 % ; spécificité 100 %),

et d'identifier les sérums de mélanomes non métastatique (Stade I/II).

Une approche similaire est actuellement en cours pour comparer les profils protéiques de plusieurs lignées de mélanomes humains dont le pouvoir métastatique est croissant. Ce projet étudie de rares lignées puisqu'elles ont la particularité d'être issues d'un même patient. Le sécrétome de ces lignées sera particulièrement approfondi.

Enfin, parmi les nouveaux marqueurs possibles, les protéines rétrovirales endogènes (HERV) de la famille K sont

particulièrement intéressantes, car d'une part elles participent à la transformation des mélanocytes, mais elles sont également sécrétées et diffusent vers la circulation

sanguine. Nous avons développé une technique originale de détection de plusieurs de ces protéines dans le sérum (collaboration avec un industriel).

## 56. MÉLANOME MÉTASTATIQUE : L'APPARITION SPONTANÉE D'AUTO-ANTICORPS EST UN FACTEUR DE BON PRONOSTIC

■ MORTIER L *et al.* ■ CHRU Lille ; Inserm U837

Le mélanome est une tumeur immunogène fréquemment associée à certaines manifestations auto-immunes telles que les régressions spontanées, les réactions vitiligo-like ou les rétinopathies. La survenue de ces manifestations semble être associée à un meilleur pronostic.

Le but de notre étude prospective était d'évaluer l'association entre auto-immunité spontanée et la survie dans le mélanome métastatique. De 2007 à 2008, 103 patients ont été inclus et un dosage des anticorps antithyroïdiens et antinucléaires a été réalisé tous les 6 mois. La présence d'auto-anticorps au-dessus du seuil de détection pour au moins un dosage était considérée comme un stigmate biologique d'auto-immunité.

Les analyses univariées et multivariées ont permis de mettre en évidence une survie significativement augmentée en présence d'un stigmate biologique d'auto-immunité ( $p = 0,045$ ), ainsi qu'en l'absence de mélanome primitif connu ( $p = 0,044$ ). Cette étude prospective et comparative est à notre connaissance la première rapportant la fréquence d'apparition spontanée d'auto-anticorps au cours du mélanome au stade IV.

Nos résultats suggèrent que l'auto-immunité spontanée, *via* la rupture du Soi, est un facteur de bon pronostic en termes de survie pour les patients atteints de mélanome métastatique de stade IV.

## 57. ÉTUDE CLINIQUE DE PHASE II D'IMMUNOTHÉRAPIE À BASE DE CELLULES DENDRITIQUES AUTOLOGUES INJECTÉES AU SEIN DE MÉTASTASES CUTANÉES PRÉALABLEMENT TRAITÉES PAR DE L'IMIQUIMOD TOPIQUE EN ASSOCIATION À DU CYCLOPHOSPHAMIDE CHEZ DES MALADES ATTEINTS D'UN MÉLANOME CUTANÉ MÉTASTATIQUE

■ MORTIER L *et al.* ■ CHRU Lille ; Inserm U837

Depuis une quinzaine d'années, l'analyse des essais cliniques de vaccination antitumorale démontre la capacité de ce type d'approche d'induire une réaction antitumorale spécifique sans toxicité importante pour le malade. Cependant, celle-ci n'est, dans la plupart des cas, pas assez efficace pour éradiquer la tumeur. Ces résultats amènent à reconsidérer ces approches vaccinales afin d'optimiser les protocoles. Nous avons identifié deux freins essentiels à la vaccinothérapie que nous souhaitons lever grâce à ce protocole. Il s'agit de (i) l'existence d'une population de lymphocytes T régulateurs, inhibiteurs naturels de la réponse immunitaire ; (ii) l'efficacité relative de l'activation des Cellules Dendritiques (DC) *in vivo* probablement trop éloignée des conditions physiologiques

pour au moins deux raisons. Premièrement, la maturation *in vitro* largement utilisée jusqu'à maintenant ne semble pas adaptée à produire des cellules dendritiques capable d'activer *in vivo* le système immunitaire efficacement. Deuxièmement, le chargement *in vitro* des DC par des peptides antigéniques tumoraux est d'une efficacité limitée probablement due à la perte des antigènes spécifiques à la surface des cellules tumorales. Nous souhaitons donc supprimer simultanément ces deux obstacles afin d'accroître l'efficacité de la réponse antitumorale. Pour se faire, nous combinerons :

- une chimiothérapie par cyclophosphamide selon un schéma métronomique destinée à inhiber la réponse T régulatrice ;

- une approche originale d'activation *in vivo* de DC auto-logues. Dans ce but, les DC seront injectées au sein de métastases cutanées après application topique d'imiquimod. Les DC de type plasmacytoïde seront obtenues à partir de monocytes périphériques différenciés 5 jours en présence d'IL-3 et d'IFN-beta. Dans ces conditions *in vivo*, les DC devraient se charger en antigènes tumoraux, puis migrer dans les ganglions de drainage afin d'activer à distance efficacement une réaction anti-tumorale systémique.

L'objectif principal de cet essai de phase II est de déterminer si cette immunisation entraîne une réponse clinique chez des malades atteints de mélanome métastatique. La réponse clinique est définie comme l'absence de maladie évolutive (PFS). Les malades répondeurs sont donc les malades qui présenteront une réponse complète, une réponse partielle ou une maladie stable. Les critères RECIST seront utilisés pour définir le type de réponse.

Les objectifs secondaires seront des objectifs de recherche translationnelle :

- d'évaluer au niveau sanguin et tumoral la réponse immunitaire anti-tumorale (réponse cytotoxique et réponse des T régulateurs) ;
- d'évaluer par imagerie fonctionnelle la réponse anti-tumorale (tomographie par émission de positons) ;
- d'évaluer, en partenariat avec le laboratoire détenteur de la molécule, la signature génomique des tumeurs avant vaccination afin d'essayer de mettre en évidence une signature prédictive de la réponse clinique et/ou biologique.

L'autorisation du CPP de Lille a été obtenue le 14 janvier 2010.

L'autorisation de l'Afssaps a été obtenue le 16 février 2010.

Le premier malade a été inclus le 18/03/2010.

## 58. ESSAI MULTIPARAMÉTRIQUE DE QUANTIFICATION D'EXPRESSION GÉNIQUE UTILISANT DES ÉCHANTILLONS DE MÉLANOMES ARCHIVÉS EN PARAFFINE

■ MOURAH S, LEBBÉ C, MOINS-TEISSERENC H, PORCHER R, JANIN A

■ Hôpital Saint-Louis AHP, Université Paris Diderot

L'indice de Breslow, l'ulcération, l'atteinte du ganglion sentinelle sont les meilleurs facteurs de survie du mélanome. Il serait très utile de pouvoir évaluer l'intérêt pronostique de biomarqueurs impliqués dans la lymphangiogenèse, l'angiogenèse et l'invasion afin de pouvoir définir de nouveaux marqueurs pronostiques et définir de nouvelles cibles thérapeutiques dans le mélanome. Nous avons récemment montré sur une petite cohorte de patients (n = 90) une association entre l'existence d'une micrométastase ganglionnaire et l'expression dans le ganglion de la forme soluble du VEGF (VEGF121) et d'un marqueur d'invasion, PAI-1. Dans le but d'étendre ces résultats à un panel plus large de biomarqueurs et un échantillon important de tumeurs, nous voulons mettre au point un procédé fiable et reproductible de quantification de ces biomarqueurs à partir de tissus archivés en paraffine.

Pour 30 patients pris en charge dans notre centre de 2000 à 2005 pour un mélanome, nous disposons de prélèvements tumoraux fixés selon le même protocole (AFA) et

conservés en paraffine, mais aussi de prélèvements congelés (même tumeur). Des cDNA ont été obtenus pour ces 30 paires de prélèvements, après extraction et quantification des ARN et analyse des ARN par électrophorèse micro-capillaire. Les amorces et sondes pour la PCR quantitative ont été déterminées à l'aide d'un logiciel ; la taille des amplicons étant inférieure ou égale à 200 bases. La quantification a été réalisée en utilisant la technologie TaqMan® sur un instrument LightCycler. Afin de normaliser les différences liées à la variabilité de la qualité et la quantité, nous avons utilisé un panel de 6 gènes de référence, sélectionnés parmi 15 gènes candidats ayant les plus faibles niveaux de variabilité d'expression selon la méthodologie décrite par Cronin *et al.*, (2004). Les analyses de corrélation ont été effectuées en utilisant le coefficient de Pearson.

L'expression de 25 gènes impliqués dans l'angiogenèse et l'invasion a été étudiée sur nos 30 paires d'échantillons. La qualité de l'ARN de tous les échantillons était correcte. La médiane, moyenne et extrême des CT (seuil de détec-



tion d'amplification permettant la quantification) étaient pour tous les patients et gènes respectivement de 32 et 31.

La comparaison des données de qRT-PCR provenant de différents échantillons nécessite une correction du fait de l'hétérogénéité en termes de qualité et de quantité des ARN extraits. Cette hétérogénéité peut être en rapport avec des différences dans le délai de fixation des tissus après chirurgie, la quantité de tissu et le type de fixation. La variabilité dépend ensuite de l'efficacité de la transcription reverse et de la PCR elle-même. Cette variabilité a été corrigée en normalisant avec notre panel de 6 gènes de référence. Le coefficient de corrélation de Pearson ajusté entre échantillons congelés et conservés en paraffine était pour les 25 gènes testés de 0,8 pour 70% des patients, et entre 0,4 et 0,6 pour 30% des patients.

Cette analyse multiparamétrique d'un panel de 25 gènes impliqués dans l'angiogenèse et l'invasion est très encourageante, car elle montre une bonne corrélation entre les mesures obtenues en congélation et paraffine. Le coefficient de corrélation peut encore être amélioré en augmentant le nombre de marqueurs étudiés. Nous étendons actuellement cette stratégie à des biomarqueurs impliqués dans le contrôle de l'inflammation et de l'immunité innée et adaptative pour lesquels nous disposons des amorces validées pour l'exploration de profils transcriptionnels.

Nous souhaitons ensuite étudier la valeur pronostique de ces marqueurs dans le cadre de larges cohortes, par exemple la mélancohorte.

## 59. IMMUNOTHÉRAPIE PAR GENIUSVAC-MEL4 : UNE NOUVELLE STRATÉGIE D'IMMUNOTHÉRAPIE POUR LE TRAITEMENT DES MÉLANOMES

■ PLUMAS J, ASPORD C, CHARLES J, RICHARD MJ, CHAPEROT L, LECCIA MT

■ **Équipe EFS-UJF-Inserm U823, Immunobiologie et Immunothérapie des cancers, Institut Albert Bonniot, CHU Michallon, Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, Établissement français du sang, Grenoble**

Dans le mélanome, l'arsenal thérapeutique à un stade avancé de la maladie reste limité et inefficace. Le mélanome reste cependant une pathologie tumorale immunogène dont le développement peut être contrôlé par le système immunitaire. Les approches thérapeutiques d'immunothérapies développées à l'heure actuelle sont réalisées en situation autologue, limitant leur développement à grande échelle et impliquant une variabilité individuelle. Il y a un réel besoin de développer des stratégies innovantes basées sur des thérapies cellulaires standardisables et utilisables pour plusieurs patients.

Dans le cadre d'une étude préclinique réalisée *in vitro* en utilisant des cellules de malades atteints de mélanomes et *in vivo* dans un modèle de souris humanisées, nous avons apporté la preuve de concept de l'efficacité d'une nouvelle stratégie d'immunothérapie dénommée GeniusVac pour stimuler des lymphocytes spécifiques et hautement cytotoxiques vis-à-vis de lignées de mélanomes et des cellules tumorales autologues. GeniusVac est basé sur l'utilisation d'une lignée d'un nouveau type cellulaire, une cellule dendritique plasmocytoïde (PDC), chargé avec des peptides tumoraux dans un contexte semi-allogénique.

L'utilisation d'une lignée allogénique de PDC en immunothérapie cellulaire active dans le mélanome est une approche

innovante et originale par rapport aux études antérieures de vaccinations utilisant des cellules dendritiques myéloïdes autologues (MDC). Le produit de thérapie cellulaire utilisé sera constitué de PDC irradiées pulsées avec 4 peptides et cryopréservées (GeniusVac-Mel4). Ce vaccin peut être utilisé pour tous les patients sous réserve de leur statut HLA-A\*0201. Nous avons montré *in vitro* que cette stratégie donne des résultats supérieurs aux autres stratégies cellulaires existantes. Par ailleurs, les essais de tumorigénicité chez la souris immunodéficiente (NOD/Scid/bêta2m<sup>-/-</sup>) ont montré l'innocuité de GeniusVac. L'analyse de la viabilité après irradiation montre que les cellules meurent rapidement par apoptose appuyant l'absence de risque tumorigène.

Nous nous proposons de mettre en place une étude ouverte de phase I/II multicentrique (Grenoble et Nantes) de thérapie cellulaire basée sur l'injection sous-cutanée de GeniusVac-Mel4, lignée GeniusVac pulsée avec 4 peptides de mélanome. L'utilisation de ce type de produit étant nouvelle, nous proposons dans cet essai de type « preuve de concept » d'évaluer en objectifs principaux la tolérance et la réponse immunologique pour 3 doses de produit fini. L'évolution de la maladie appréciée sur le plan clinique et iconographique constituera un objectif secondaire.

## 60. LES MICROARNs PLASMATIQUES/SÉRIQUES, NOUVEAUX BIOMARQUEURS DANS LE MÉLANOME ?

■ PRADINES A *et al.* ■ Institut Claudius Regaud-Inserm U563

Les microRNAs (miRNAs) sont de petits ARNs non codants qui régulent post-transcriptionnellement l'expression d'une variété de gènes. Ils jouent un rôle majeur dans différents processus biologiques cellulaires et apparaissent de plus en plus comme des acteurs cruciaux de l'oncogenèse. Les profils d'expression des miRNAs dans les tumeurs de différentes origines ont permis d'identifier des signatures associées avec le diagnostic, le pronostic et l'efficacité thérapeutique. Depuis 2008, date de mise en évidence des miARNs circulants, un nombre croissant de publications montrent leurs potentialités comme biomarqueurs sériques en oncologie.

L'incidence du mélanome augmente de plus en plus dans

les pays occidentaux. Le pronostic du mélanome métastatique est sévère, et l'efficacité des thérapeutiques est faible. Au stade localisé, les facteurs pronostiques du risque d'extension métastatique ne reposent encore aujourd'hui que sur des caractéristiques anatomopathologiques.

À l'Institut Claudius Regaud, notre objectif est tout d'abord de déterminer par *microarray* un profil de miARNs spécifiques de patients atteints de mélanome métastatique, puis de développer le dosage par RT-qPCR des principaux miARNs circulants d'intérêt chez une large cohorte de patients porteurs de mélanomes de tous grades, afin de définir à terme leur rôle pronostique.

## 61. PLASMA PROTEASOME LEVEL IS A RELIABLE MARKER FOR NODAL AND DISTANT METASTASES IN MELANOMA

■ STOEBNER PE *et al.*

■ CHU Nîmes, Service de Dermatologie, UMR CNRS 5247 (Institut des biomolécules Max Mousseron) Montpellier

Proteasomes are the main non-lysosomal proteolytic structures which regulate crucial cellular processes. Circulating proteasome (proteasome-c) levels can be measured using an ELISA test and can be considered as a tumor marker in several types of malignancy. We measured proteasome-c levels in 101 melanoma and 72 controls. Melanoma patients were sub-classified in stage I/II (n = 44), stage III (n = 33) and stage IV (n = 24) according to the AJCC staging system for cutaneous melanoma. In order to determine the proteasome-c subunit composition we performed a proteomic analysis of immunopurified proteasome-c in stage IV melanoma (n = 3). Proteasome-c levels were

significantly higher in patients with stage IV and stage III with lymph node metastasis (n = 14) ( $8864 \pm 1272$  ng/mL and  $5007 \pm 428$  respectively) compared to controls ( $2534 \pm 187$  ng/mL;  $p < 0,001$ ) to stage I/II ( $2804 \pm 159$  ng/mL;  $p < 0,001$ ) and to stage III after curative regional lymph node resection ( $2812 \pm 277$  ng/mL;  $p < 0,001$ ). With a cut-off of 4300 ng/mL, diagnostic specificity for regional or distant metastatic evolution was 97 % with a sensitivity of 68 %. Proteomic analysis showed that all 20S proteasome and immunoproteasome subunits were present in the plasma. Proteasome-c is a reliable marker for metastatic dissemination in melanoma patients.

## 62. ÉLECTROCHIMIOTHÉRAPIE, ÉLECTROGÉNOTHÉRAPIE ET ÉLECTROIMMUNOGÉNOTHÉRAPIE DES MÉLANOMES : DE LA RECHERCHE À LA CLINIQUE

■ TEISSIE J<sup>1\*</sup>, ROLS MP<sup>1</sup>, GOLZIO M<sup>1</sup>, COUDERC B<sup>2</sup>, TAMZALI Y<sup>3</sup>

■ <sup>\*1</sup> CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse et Université de Toulouse, UPS, IPBS, Toulouse ; <sup>2</sup>EA3035, Institut Claudius Regaud, Université Toulouse III, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Toulouse ; <sup>3</sup>Clinique Equine, École Nationale Vétérinaire, Toulouse

L'accès d'agents pharmacologiques (agents antimétaboliques, acides nucléiques) dans les cellules tumorales est sous le contrôle du passage transmembranaire. Ce transfert est un obstacle majeur pour de nombreuses approches. Il a été établi dans les années 70 que la membrane d'une cellule devenait perméable à des molécules hydrophiles suite à l'application d'impulsions électriques externes (Neumann et Rosenheck, 1972). Il a ainsi été constaté que la cytotoxicité d'agents antimétaboliques était fortement amplifiée sur des cultures cellulaires (Orlowski *et al.*, 1988), mais aussi sur des tumeurs chez l'animal (Belehradek, 1991). Des essais en clinique humaine ont été réalisés avec succès (Mir *et al.*, 1991 ; Rols *et al.*, 2000). L'aboutissement de cette approche est la mise en place d'un protocole clinique de routine : l'électrochimiothérapie (ECT) (Sersa et Miklavcic, 2008 ; EJC special issue, 2006) suite aux programmes européens Cliniporator et Esope. L'élimination de mélanomes est obtenue en routine. Des protocoles de références sont aujourd'hui disponibles. L'antimétabolique (bléomycine, cis platine) est injecté en IV ou IT selon des procédures standardisées. Des électrodes sont mises en contact ou implantées dans la tumeur. Un train d'impulsions strictement calibrées est délivré (le patient étant sous anesthésie générale ou locale). Les réponses objectives atteignent 80 % et les réponses complètes 70 %. Une amplification de l'efficacité est obtenue par la répétition du traitement. Plus de 60 sites hospitaliers sont équipés en Europe où ce protocole est approuvé (Byrne *et al.*, 2005 ; Quaglino *et al.*, 2008). Ce type de traitement a été déve-

loppé avec succès sur une grande échelle (plus de 100 animaux traités) à Toulouse des sarcoïdes équinés (Rols *et al.*, 2002 ; Cemazar *et al.*, 2008).

De plus, cette approche bioélectrochimique a établi sa capacité à permettre le transfert et l'expression d'acides nucléiques (plasmides, siARN) sur des cellules (Neumann *et al.*, 1982 ; Golzio *et al.*, 2002, Golzio *et al.*, 2007)) mais aussi dans des tumeurs murines (Rols *et al.*, 1998, Golzio *et al.*, 2007). Il devient ainsi possible d'avoir un protocole efficace soit de « silencing » d'expression, soit d'expression d'un plasmide pour une protéine vis-à-vis de laquelle l'organisme va déclencher une réponse immunitaire (Pedron *et al.*, 2007). On parle alors d'électrognénothérapie ou EGT. Les travaux sur la mise au point de l'ECT contre les mélanomes avaient mis en évidence que l'inflammation temporaire locale associée au traitement illustre une réponse immunitaire contre la tumeur (Mir *et al.*, 1992). Celle-ci était faible, mais pouvait être amplifiée suite à l'injection de cytokines (IL 12) ou à l'expression de plasmides codant pour ces cytokines (Lucas *et al.*, 2002). Une telle approche s'est avérée efficace sur le traitement en clinique équine (prix de l'innovation Midi-Pyrénées). De plus, un groupe américain vient de valider l'efficacité d'un traitement similaire en clinique humaine (Daub *et al.*, 2008).

Nous souhaiterions voir cette approche couplant ECT et EGT se mettre en place pour l'éradication des mélanomes cutanés et des foyers secondaires métastatiques dans un protocole clinique.



## SYNTHÈSE

### C. LEBBÉ ET B. DRÉNO

Cette première réunion du GMFMel, comportant plus de 160 inscrits avec la soumission de 65 résumés, a atteint ses objectifs de multidisciplinarité et d'amélioration de la lisibilité de la recherche clinique et fondamentale sur le mélanome en France.

La recherche en matière d'épidémiologie du mélanome en France a permis d'individualiser le concept de mélanome à croissance rapide repris ensuite par de nombreuses équipes internationales, et dont la caractérisation moléculaire est en cours. D'autres groupes français sont impliqués dans l'identification des facteurs de risques hormonaux et environnementaux (mesure de l'exposition aux UV, comportement vis-à-vis des UV, rôle de l'exposition aux UV et du statut vitaminique D dans le développement et la progression du mélanome) et l'analyse des facteurs d'inégalité face à la mortalité par mélanome en France. En l'absence de registre national, il convient de renforcer l'aide aux registres régionaux déjà en place, d'utiliser sur le plan national les données enregistrées durant les réunions de concertation pluridisciplinaires, d'encourager la collaboration avec les médecins libéraux et les médecins de santé publique, et de tirer profit du potentiel d'institutions comme l'ANRS pour travailler sur le mélanome affectant des populations particulières (patients infectés par le HIV, patients transplantés d'organe, etc.). Il faut aussi favoriser le regroupement des biothèques annotées pour une participation efficace aux études européennes.

La recherche clinique sur le diagnostic précoce est active en France.

Les pathologistes conduisent actuellement une étude européenne afin de progresser dans le diagnostic des tumeurs mélanocytaires ambigües. Ils soulignent, par ailleurs, les particularités des collections biologiques en matière de mélanome avec la nécessité de créer un réseau de pathologie privée/publique dynamique, la mise en place de collections durables et non limitées à 10 ans, la nécessité de développer des techniques de fixation qui permettent d'étudier l'ARN tout en gardant une morphologie de qualité. Les dermatologues sont très impliqués dans l'évaluation de nouvelles techniques d'imagerie cutanée qui, à côté de la classique dermoscopie, permettront peut être d'éviter des excès inutiles pour des tumeurs mélanocytaires difficiles. La microscopie confocale *in vivo* semble très performante notamment dans le diagnostic différentiel des lésions pigmentées du visage. D'autres techniques telles que l'impédancemétrie micro-invasive, l'EGIR™ (Epidermal Genetic Information Retrieval), l'analyse cutanée multispectrale méritent d'être évaluées. Il restera à définir l'impact de ces outils en termes de santé publique et les populations à cibler par des technologies coûteuses. Il serait parallèlement très utile de développer le télédiagnostic notamment dans des régions où l'accès au dermatologue est difficile.

Les stratégies en termes de bilan lésionnel, diagnostic de la maladie résiduelle, modalités de surveillance ont également été discutées. Certaines équipes sont impliquées dans l'évaluation de l'intérêt de l'échographie haute fréquence pour tenter de mesurer l'épaisseur

du mélanome primitif, éventuellement couplée au doppler, pour apprécier l'angiogenèse tumorale. D'autres équipes analysent l'intérêt de l'IRM corps entier, moins irradiante que la TDM, pour le suivi des patients à haut risque de récurrence. L'évaluation de l'échographie avec injection de produit de contraste à visée diagnostique et prédictive de l'efficacité de certaines thérapies ciblées fait actuellement l'objet d'un STIC non limité au mélanome. L'intérêt des scintigraphies utilisant des traceurs ayant une forte affinité avec la mélanine (ex 123I BZA) est en cours d'évaluation.

Au niveau génétique, la recherche en France a permis de contribuer à définir des mutations rares conférant un risque élevé de mélanome, des variants génétiques rares conférant un risque modéré, des variants fréquents conférant un risque faible/modéré. Les perspectives de cette recherche comportent notamment l'étude fine des *loci* caractérisés : identification des variants causaux, le développement d'études génétiques combinées de mélanome et d'autres cancers (déterminants communs). Il faut aussi tenter d'élucider le rôle fonctionnel des variants génétiques identifiés (passerelle avec la recherche fondamentale), combiner les études d'association génétiques et les études d'expression des gènes et cGH et évaluer l'intérêt du test génétique des mutations/variants génétiques identifiés sur la prise en charge et la surveillance ciblée.

Les programmes de recherche fondamentale sont développés par au moins 19 équipes sur le territoire et peuvent se regrouper en trois axes : 1) Signaux intrinsèques des cellules tumorales, 2) Relation Cellule-Environnement et 3) Plasticité et dormance. La diversité des programmes développés rend la recherche fondamentale française sur le mélanome remarquablement exhaustive. De plus, par l'existence des réseaux mélanomes, les chercheurs interagissent et développent des programmes collaboratifs. Il est à noter que les meilleurs modèles murins développés actuellement sont issus en particulier de la recherche française qui bénéficie également d'autres modèles animaux (porc, chien).

L'amélioration des connaissances, une meilleure compréhension de la spécificité du mélanome, le développement de projets intégratifs avec une collaboration plus efficace avec les pathologistes et les cliniciens permettront de renforcer la qualité de ces projets. La recherche translationnelle est également très active sur le territoire avec 23, soit un tiers, des résumés soumis.

Elle est très impliquée dans l'immunothérapie adaptative avec l'objectif aujourd'hui de créer une immunothérapie adaptative « ciblée » sur des antigènes spécifiques de mélanome. Cette recherche translationnelle se veut répondre à deux objectifs : identifier les antigènes de mélanome les « plus immunogènes » et développer des expansions de lymphocytes T spécifiques *via* des tétramères sécurisés, recherche qui est en cours.

Elle tente par ailleurs :

- de définir et valider de nouveaux biomarqueurs diagnostiques, pronostiques ou prédictifs de réponse en gardant à l'esprit la nécessité de développer des tests multiparamétriques validés avec des critères rigoureux (critères REMARK) ;
- de valider au niveau préclinique de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans le but d'optimiser cette recherche, il faut mutualiser les modèles caractérisés *in vitro* et *in vivo* : souris génétiquement modifiées, xénotreffes à partir de tumeurs microdisséquées, porc, chien. Il convient également de favoriser l'accès à des bibliothèques annotées et aux nouvelles technologies et études « omiques » à haut débit avec le développement de méthodologies statistiques et bioinformatiques adaptées.

Ceci doit conduire à mettre en place des essais thérapeutiques précoces. Cette stratégie est parfaitement illustrée par le développement par une équipe française des DBAIT qui leurrent les systèmes de réparation cellulaire de l'ADN et permettent une synergie d'action avec la radiothérapie ou certaines chimiothérapies. Un essai de phase doit débiter prochainement.

La mise en place de ces essais précoces nécessite une collaboration avec des méthodologistes experts dans les essais précoces, l'identification de plateformes permettant d'effectuer le génotypage des tumeurs, des études pharmacogénétiques un immunomonitoring et des études pharmacodynamiques fiables. Plusieurs essais de phase II précoces évaluent déjà l'intérêt d'inhibiteurs de BRAF, cKIT dans des populations ciblées.

En conclusion, il existe d'ores et déjà des forces en présence, nombreuses et diverses, témoignant d'une recherche clinique et fondamentale active en France dans le domaine du mélanome. Nous devons très vite améliorer notre structuration en proposant des projets transversaux fédératifs à l'échelon national et en maintenant des réunions scientifiques de qualité, afin d'être des acteurs reconnus des avancées moléculaires et thérapeutiques attendues à court terme dans cette pathologie.

## LISTE DES RÉSUMÉS (ORDRE ALPHABÉTIQUE DU PREMIER AUTEUR)

- **ALCAIDE-LORIDAN C** – recherche fondamentale (abstract 13)
- **ANDRÉ C** – génétique (abstract 7)
- **ANDRIEU N** – recherche fondamentale (abstract 14)
- **ARACTINGI S** – recherche translationnelle (abstract 40)
- **AUPHAN-ANEZIN N** – recherche fondamentale (abstract 15)
- **AVRIL MF** – génétique (abstract 8)
- **BALOTTI R** – recherche fondamentale (abstract 16)
- **BONIOL M** – épidémiologie (abstracts 1 & 2)
- **BOURNEUF E** – génétique (abstract 9)
- **CACHIN F** – diagnostic : imagerie (abstract 35)
- **CAIGNARD A** – recherche translationnelle (abstract 41)
- **DAVIDSON T** – recherche fondamentale (abstract 17)
- **DEGOUL F** – recherche fondamentale (abstract 18)
- **DEMENAIS F** – génétique (abstract 10)
- **DUMAZ N** – recherche fondamentale (abstract 19)
- **DUTREIX A** – recherche translationnelle (abstract 42)
- **EGIDY G** – recherche fondamentale (abstract 20)
- **EYCHÈNE A** – recherche fondamentale (abstract 21)
- **FRADE R** – recherche fondamentale (abstract 22 & 23)
- **GALIBERT MD** – recherche translationnelle (abstract 43 & 44)
- **GARNIER JP** – recherche translationnelle (abstract 45)
- **GOLDWASSER F** – recherche translationnelle (abstract 46)
- **GRANGE F** – épidémiologie (abstract 3)
- **GROB JJ** – épidémiologie (abstract 4)
- **HERMINE O** – recherche translationnelle (abstract 47)
- **JAVELAUD D** – recherche fondamentale (abstract 24)
- **JEUDY G** – diagnostic : pathologie (abstract 32)
- **JOLIVOT R** – diagnostic : imagerie (abstract 38)
- **JOUARY T** – diagnostic : pathologie (abstract 33)
- **JOUVET JC** – diagnostic : imagerie (abstract 36)
- **KVASKOFF M** – épidémiologie (abstract 5)
- **LABARRIERE N** – recherche translationnelle (abstract 48)
- **LACOUR JP** – recherche translationnelle (abstract 49)
- **LARUE L** – recherche fondamentale (abstract 25)
- **LEBBÉ C** – recherche translationnelle (abstract 50 & 51)
- **LESUEUR F** – recherche fondamentale (abstract 11)
- **MACHET L** – diagnostic : imagerie (abstract 37)
- **MAHÉ E** – épidémiologie (abstract 6)
- **MAQUART** – recherche translationnelle (abstract 52)
- **MARCHETTI P** – recherche fondamentale (abstract 27)
- **MASQUÉFFA C** – recherche translationnelle (abstract 53)
- **MATEUS C** – recherche translationnelle (abstract 54)
- **MEYER N** – diagnostic : imagerie (abstract 38)
- **MOLES JR** – recherche translationnelle (abstract 55)
- **MONTBOISSE JC** – recherche fondamentale (abstract 28)
- **MORTIER L** – recherche translationnelle (abstract 56 & 57)
- **MOURAH S** – recherche fondamentale (abstract 26)
- **MOURAH S** – recherche translationnelle (abstract 58)
- **NIETO L** – recherche fondamentale (abstract 29)
- **PLUMAS J** – recherche translationnelle (abstract 59)
- **POLAKOWSKA R** – recherche fondamentale (abstract 30)
- **PRADINES A** – recherche translationnelle (abstract 60)
- **SOUFIR N** – génétique (abstract 12)
- **STOEBNER PE** – recherche translationnelle (abstract 61)
- **TEISSIE J** – recherche translationnelle (abstract 62)
- **TILKIN-MARIAME A** – recherche fondamentale (abstract 31)
- **VERGIER B** – diagnostic : pathologie (abstract 34)









Pour plus d'informations  
[www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)

Institut National du Cancer  
52, avenue André Morizet  
92100 Boulogne-Billancourt  
France

Tel. +33 (1) 41 10 50 00  
Fax +33 (1) 41 10 50 20  
[contact@institutcancer.fr](mailto:contact@institutcancer.fr)

Ref. : COLMELA10