UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2008 N° 108

THESE
pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE
Qualification en dermatologie-vénéréologie
par

Morgane Vourc'h-Jourdain

née le 23/11/1979 à Vannes(56).

Présentée et soutenue publiquement le 18 avril 2008.

Expression des gènes de mélanome et profil clinique évolutif.

Présidente et directrice de thèse : Madame le Professeur Brigitte Dreno.

Sommaire

I. Données actuelles sur les facteurs pronostiques dans le mélanome

A. Facteurs pronostiques cliniques et histopathologiques selon le stade

1. Au stade de mélanome primitif
a. L'épaisseur du mélanome
b. L'ulcération
c. Autres facteurs pronostiques

2. Au stade de localisation ganglionnaire
a. Le nombre de ganglions métastatiques
b .La masse tumorale ganglionnaire
c. L'effraction capsulaire
d. L'ulcération du mélanome primitif

3. Au stade métastatique
a. Le site viscéral *versus* non-viscéral (cutané, ganglionnaire)
b. Autres facteurs

B- Facteurs pronostiques sériques et tissulaires

1. Facteurs sériques
a. Lactate déshydrogénase (LDH)
b. Protéine S100 et Melanoma Inhibiting Activity (MIA)
c. Facteurs angiogéniques

2. Facteurs tissulaires
a. Molécules d'adhésion
b. Cytokines immunomodulatrices

C- Détection de cellules tumorales circulantes

D- Valeur pronostique du ganglion sentinelle

1. Ganglion sentinelle et survie sans récidive
2. Ganglion sentinelle et survie globale
3. Valeur de la RT-PCR au niveau du ganglion sentinelle

II. Les antigènes associés au mélanome

A. Historique de la découverte des antigènes de mélanome

B. Les antigènes de différentiation

1. Tyrosinase
2. Melan-A/MART-1
3. Autres antigènes

C. Les antigènes de tumeurs

1. Les cancers-testis antigènes

a. Mage 1 et 3.
b. Ny-ESO-1

2. NA-17

D. Valeur pronostique de l'expression antigénique au niveau de métastases de mélanome.

III. Etude rétrospective de l'expression des gènes de mélanome et profil clinique. Article soumis au British Journal of Dermatology

IV Limites de l'étude et perspectives

Conclusion

Introduction

L'épidémiologie du mélanome en fait un problème de santé publique. En effet, l'incidence du mélanome a notablement augmenté ces dernières années sans progrès thérapeutiques modifiant significativement la survie des stades avancés. En outre, si la mortalité est occasionnelle pour les stades débutants, il est difficile de prédire lesquels de ces patients sont plus à risque de progression tumorale. Il y a donc une nécessité à approfondir la compréhension des mécanismes de progression tumorale, à développer des facteurs pronostics permettant d'identifier des sous populations à risque afin d'adapter les thérapeutiques.

De nombreux antigènes associés au mélanome ont été identifiés comme induisant une réponse tant cellulaire qu'humorale. Ces antigènes sont donc des cibles pour les thérapeutiques d'immunothérapie spécifique. Cependant leur expression est variable au cours de la progression tumorale[8] et contribue à l'échappement thérapeutique et à la progression tumorale elle-même. Mieux connaître les patterns d'expression antigénique au niveau transcriptionnel comme protéique peut donc permettre d'identifier des caractéristiques phénotypiques associées à la progression tumorale, et donc d'identifier des sous-groupes de patients à risque ou des profils de patients répondeurs aux traitements.

Afin de tenter de préciser ces caractéristiques, nous avons étudié les profils d'expression génique par RT-PCR des cellules tumorales de mélanome provenant de 202 prélèvements (métastases, localisations locorégionales, primitifs). Les gènes étudiés ont été : Melan-A, Mage-3, Mage-1, Tyrosinase, Na-17, Ny-ESO-1.

L'objectif principal de cette étude était d'étudier une éventuelle relation entre les caractéristiques d'expression génique au moment d'une récidive, d'une progression tumorale et la survie ultérieure (globale et sans récidives).

Nous avons ensuite étudié si les différentes expressions géniques étaient corrélées avec les caractéristiques cliniques des patients.

I. Données actuelles sur les facteurs pronostics dans le mélanome

A- Facteurs pronostiques cliniques et histopathologiques selon le stade

Les principaux facteurs actuellement reconnus dans le mélanome sont ceux rapportés par Balch[1] *et al.* en 2001. En effet, les principaux critères pronostiques reconnus sont à l'origine de la sixième classification AJCC du mélanome (American Joint Committee of Cancer). Ainsi, à partir d'une étude prospective multicentrique fondée sur 17600 patients issus de la base de données de l'AJCC, les auteurs ont revu selon le stade primitif, ganglionnaire ou métastatique, les facteurs qui ont une influence pronostique significative.

1. Au stade de mélanome primitif (*ou catégorie T de la classification TNM ; stades I et II AJCC6)*

A ce stade, on retrouve deux principaux facteurs pronostiques : l'épaisseur du mélanome et la présence ou non d'une ulcération.

a. L'épaisseur du mélanome

L'épaisseur de la tumeur est mesurée à l'aide de l'indice de Breslow[2]. Il correspond à la mesure à l'oculaire micrométrique sur une coupe histologique standard de l'épaisseur maximale de la tumeur comprise entre les cellules superficielles de la couche granuleuse épidermique et la base de la tumeur. Dans l'étude de Balch[1] *et al* l'indice de Breslow était significativement corrélé à la mortalité spécifique à 10 ans liée au mélanome

(Figure 1 page 6)

L'importance pronostique de cet indice a préalablement été rapportée de nombreuses fois, notamment par ces mêmes auteurs.[3,4,5,6]

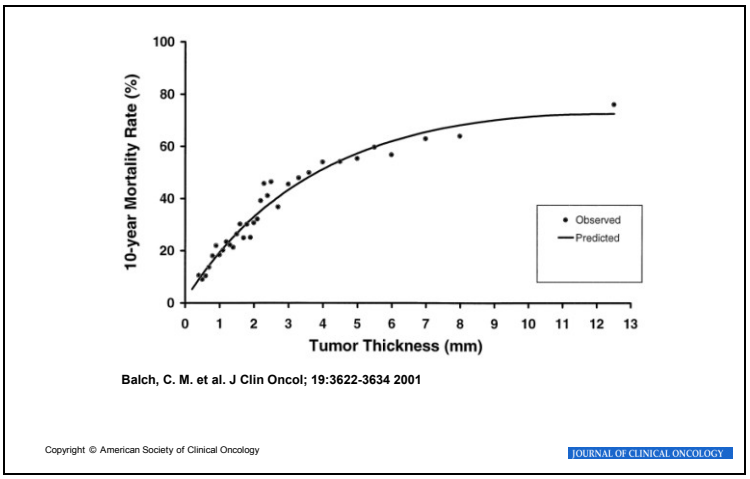


Figure 1 : Courbes de corrélation entre indice de Breslow et taux de mortalité. Extraite du Journal of Clinical Oncology. Note n°1.

En outre, concernant les mélanomes peu épais (<1mm), le niveau d'invasion de Clark[7] (défini selon le niveau le plus profond atteint par le mélanome devient un facteur pronostique important, alors que pour les autres catégories de mélanome il ne reflète pas le pronostic d'une façon aussi précise. Ainsi, dans ce sous-groupe défini de patients, un niveau de Clark plus important est associé à une survie moindre. (Cf. table 1). Ce résultat est également conforme aux publications antérieures[8910111213141516171819202122232425262728]

Table 1: Analyse des catégories d'épaisseur tumorale pour les mélanomes primitifs de stade I et II. Extraite du Journal of Clinical Oncology. Note n°1.

Variable	DF	χ^2 (Wald)	*P*	Risk Ratio	95% CI
Thickness ≤1.00 (n = 5,299)					
Level	1	24.778	< .00001	1.451	1.253-1.680
Ulceration	1	17.239	< .00001	2.073	1.469-2.924
Age	1	12.563	.0004	1.156	1.067-1.253
Site	1	6.940	.0084	1.394	1.089-1.784
Sex	1	5.506	.0189	0.744	0.581-0.952
Thickness 1.01-2.00 mm (n = 3,943)					
Ulceration	1	57.215	< .00001	1.965	1.650-2.341
Site	1	24.085	< .00001	1.567	1.310-1.876

Age	1	11.613	.0007	1.101	1.042-1.164
Level	1	6.656	.0099	1.211	1.047-1.400
Sex	1	2.668	.1024	0.861	0.719-1.030
Thickness 2.01-4.00 mm (n = 2,959)					
Ulceration	1	62.291	< .00001	1.766	1.634-2.034
Age	1	12.529	.0004	1.087	1.038-1.138
Site	1	12.342	.0004	1.306	1.125-1.516
Level	1	4.451	.0349	1.143	1.010-1.294
Sex	1	3.165	.0752	0.872	0.750-1.014
Thickness > 4.00 mm (n = 1,380)					
Ulceration	1	47.246	< .00001	1.932	1.601-2.331
Age	1	8.745	.0031	1.087	1.028-1.148
Level	1	4.065	.0438	1.139	1.004-1.293
Sex	1	2.875	.0951	0.858	0.716-1.027
Site	1	2.547			

b. L'ulcération

L'ulcération est le second facteur pronostique reconnu comme le plus important pour les tumeurs au stade primitif. De plus, il est le critère histopathologique le plus reproductible[29,30]. Ce critère ressort des analyses de Balch *et al.* comme un facteur pronostique indépendant. Toutefois, l'incidence de l'ulcération augmente avec l'épaisseur de la tumeur : dans leur population ; l'ulcération était retrouvée parmi 6% des mélanomes de Breslow< 1mm, versus 63% pour les mélanomes épais de Breslow>4mm. (Cf. Figure 2 page 8)

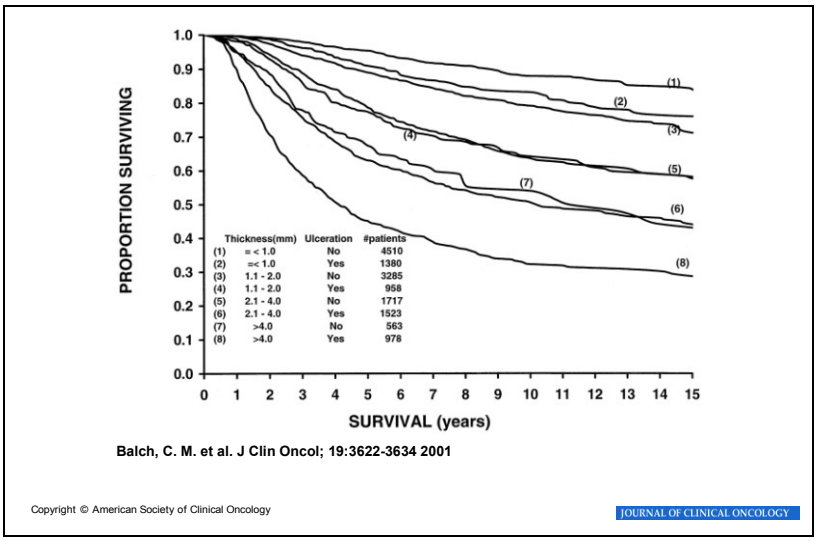


Figure 2: Courbes de survie de 14914 patients avec un mélanome localisé, stratifiés selon l'épaisseur du mélanome et la présence ou non d'une ulcération. La corrélation des différents sous-groupes utilisés pour la classification TNM avec la survie spécifique est significative. ($P <$ .0001). Extraite du Journal of Clinical Oncology. Note n°1.

Dans la catégorie des mélanomes fins (Breslow<1mm), le rôle pronostique de l'ulcération devient moins important que le niveau de Clark. D'un point de vue physiopathologique, l'ulcération a été associée à l'invasion du mélanome au travers de l'épiderme, à un index mitotique[31] supérieur, et donc à une plus grande capacité à métastaser.

c. Autres facteurs pronostiques

D'autres facteurs pronostiques sont reconnus à ce stade, mais avec un impact moindre: l'âge, le sexe et la localisation anatomique du mélanome.

L'âge du patient est un facteur pronostique indépendant, possiblement par le biais d'une diminution des défenses immunitaires liées à l'âge. Même si les sujets âgés présentent des mélanomes plus épais, et plus souvent ulcérés, leur âge représente un facteur pronostique péjoratif indépendant dans les analyses multivariées[32,15 ,33,34,.35]
Dans ces études, les patients étaient particulièrement associés à un taux de survie moindre lorsque leur âge était supérieur à 60 ans.

Le sexe du patient est également un facteur pronostique : les femmes étant associées à un meilleur taux de survie. Ceci est un facteur pronostique moindre dans l'étude de Balch *et al.*, toutefois, certains auteurs l'ont rapporté comme un facteur apparaissant comme indépendant en analyse multivariée[36].

Le site du mélanome pourrait également être un facteur pronostique. En effet, les mélanomes du tronc, de la tête et du cou auraient un moins bon pronostic que ceux des membre[18].

Le type histologique du mélanome serait également dans certains cas un facteur pronostique. En effet, indépendamment des autres facteurs pronostics et notamment du Breslow, les mélanomes acro-lentigineux sont associés à un pronostic plus sombre, et à l'inverse, les mélanomes des Dubreuilh sont associés à un meilleur pronostic[18].

2. Au stade de localisation ganglionnaire (*ou catégorie N de la classification TNM ; stade III AJCC6)*

Dans la nouvelle classification AJCC, ce stade correspond aux localisations ganglionnaires locorégionales micro ou macroscopiques et aux métastases en transit.

A ce stade, on retrouve 3 facteurs pronostiques principaux : le nombre de ganglions métastatiques, la masse tumorale et la présence ou non d'une ulcération au niveau du primitif.

a. Le nombre de ganglions métastatiques

Le nombre de ganglions envahis, indépendamment de la masse tumorale, est le critère le plus important à ce stade selon Balch *et al.* Ceci est conforme aux précédentes publications, avec une corrélation inverse entre survie décroissante et nombre de ganglions envahis croissant[37 383940414243444546].

Les auteurs trouvaient une graduation dans le nombre de ganglions envahis, avec une meilleure survie pour les patients ayant 1 ganglion envahi vs 2 à 3, et une meilleure survie pour les patients ayant 2 à 3 ganglions envahis vs ≥4 ganglions envahis. (Cf. figure 3 pages 10)

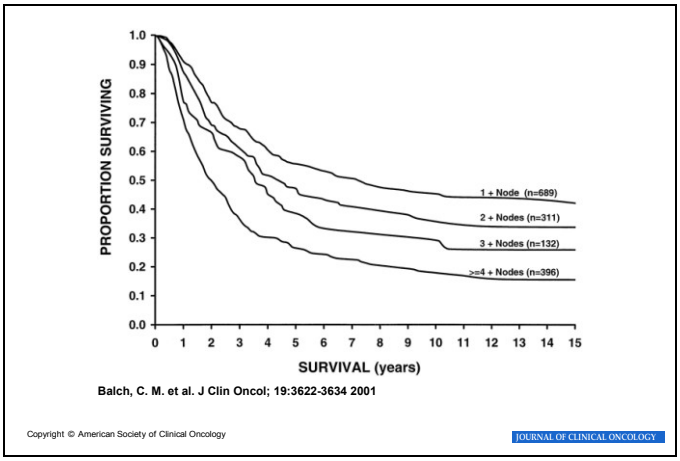


Figure 3 : Courbes de survie de 1528 mélanomes avec métastase ganglionnaire groupés par nombre de métastases ganglionnaires. La corrélation avec la survie est significative. ($P < .0001$). Extraite du Journal of Clinical Oncology. Note n°1.

b. La masse tumorale ganglionnaire

La masse tumorale ganglionnaire peut être répartie en deux catégories :

-microscopique : il s'agit de métastases non retrouvées à l'examen clinique, isolées par la technique du ganglion sentinelle ou par une adénectomie, et confirmées histologiquement.

-macroscopique : il s'agit de localisations ganglionnaires repérées à l'examen clinique, et confirmées histologiquement.

L'étude de Balch *et al.* retrouvaient une survie moindre pour les patients présentant des adénopathies palpables. (Cf. figure 4)

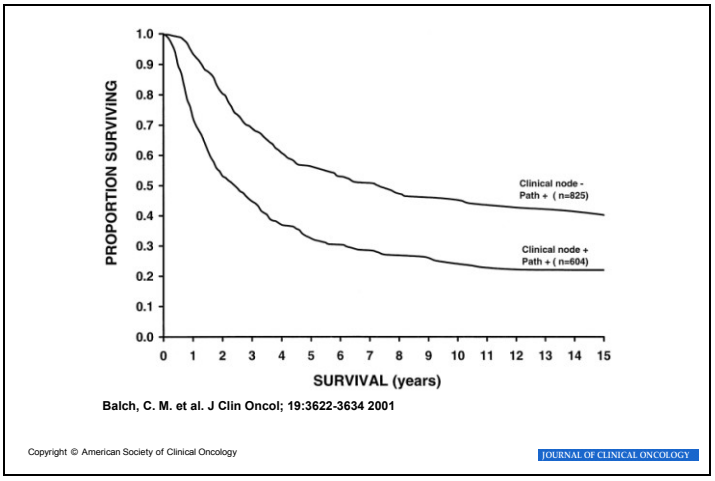


Figure 4: Courbes de survie de 1429 patients avec métastase ganglionnaire groupés selon le diagnostic clinique ou non des métastases. La différence de survie entre les groupes est significative. ($P < .0001$). Extraite du Journal of Clinical Oncology. Note n°1.

c. L'effraction capsulaire

Singletary[47] *et al.* ont étudié en 1988 les facteurs pronostiques de 714 patients opérés de localisations régionales ganglionnaires. Le dépassement capsulaire apparaissait comme un facteur prédictif négatif de la SSR. Ces résultats furent confirmés par Calabro et al en 1989[48] dans une étude plus vaste concernant 1001 patients : une récurrence tumorale plus importante était retrouvée chez les patients avec mélanome de stade III ganglionnaire présentant un dépassement capsulaire (28% vs 14% sans invasion extra-nodale), de même, la survie à 5ans et à 10 ans était inférieure en cas d'extension extra-nodale. Par la suite de nombreuses études confirmaient le caractère pronostic négatif de l'extension tumorale extra-capsulaire dans les localisations ganglionnaires. Le dépassement capsulaire apparaît dans ces études comme un facteur pronostic négatif indépendant (en analyse multivariée) de la SSR[49,50,51,52,53,54,55,56.]
Certaines études rapportent également le caractère pronostic négatif du dépassement capsulaire sur la SG[56,51,55.]

d. L'ulcération du mélanome primitif

Comme nous l'avions vu précédemment, la présence d'une ulcération sur la tumeur primitive est un facteur pronostique de la survie des patients au stade III. En effet, l'ulcération demeure un facteur de mauvais pronostic, même après avoir ajusté selon les deux autres critères (nombre de ganglions et masse tumorale).

Malgré ces facteurs pronostiques, le stade III est un groupe à haut risque métastatique, mais surtout extrêmement hétérogène. En effet, l'évolution de ce groupe en termes de survenue de métastases comme de survie est très diverse. Il reste donc des lacunes dans la compréhension des différences entre les différents « comportements tumoraux » afin de permettre d'identifier des sous-groupes à plus haut risque, et d'adapter la thérapeutique.

3. Au stade métastatique (*ou catégorie M de la classification TNM ; stade IV AJCC6)*

a. Le site viscéral vs non-viscéral

Le seul facteur pronostique significatif pour ces patients dans l'étude de Balch *et al.* est la localisation des métastases. En effet, comme dans les publications précédentes, il existe une différence de survie entre les métastases non-viscérales (cutanées, sous-cutanées, ganglionnaires) et les métastases viscérales avec une survie moindre pour ces dernières. De plus, au sein des métastases viscérales, les localisations pulmonaires sont associées à un meilleur pronostic, en particulier lorsque unique, ce qui avait déjà été rapporté[575859].

b. Autres facteurs

Le nombre de métastases : Si il n'a pas été identifié comme un facteur pronostique par Balch *et al.*, du fait de données imprécises, cet élément a été considéré comme un facteur pronostique indépendant par plusieurs travaux antérieurs[60 61].

Le performans status a également été rapporté comme influençant la survie des patients au stade métastatique[626364].

B- Facteurs pronostiques sériques et tissulaires

1. Facteurs sériques

a. Lactate déshydrogénase (LDH)

Le taux de LDH (Lactate Déshydrogénase) semble influencer la survie des patients au stade métastatique. Il est rapporté comme un facteur pronostique indépendant par plusieurs auteurs. Un taux normal[65] de LDH est un facteur pronostique positif, alors qu'un taux élevé de LDH est associé à une progression tumorale[666755]

b. Protéine S100 et Melanoma Inhibiting Activity (MIA)

La protéine S100 est une protéine isolée au niveau du système nerveux central, qui présente deux sous-unités : PS100 A1 et PS100B. Cette protéine possède des fonctions régulatrices diverses telles que la communication intercellulaire, la prolifération et la structure cellulaire, le métabolisme énergétique ou encore la transduction intracellulaire du signal. La protéine S100B est également retrouvée au niveau des mélanomes et de leurs métastases.

Le MIA est une protéine sécrétée par le mélanome[68] et de façon moindre par des cellules non tumorales : les mélanocytes et les chondrocytes. MIA a un rôle de régulation de la croissance tumorale.

L'intérêt du dosage sérique de ces protéines dans le suivi des mélanomes a fait l'objet de nombreuses études[5969].[70717268,69,70,72.] La sensibilité du dosage de PS100 varie de 29 à 91% selon les études, et sa spécificité de 86 à 100%. La sensibilité du dosage de MIA varie de 22 à 100%, et sa spécificité varie de 57 à 97%. Si la comparaison de ces études est difficile du fait de différences méthodologiques, elles s'accordent majoritairement sur le fait que PS100B et MIA sont des marqueurs sériques qui peuvent avoir un intérêt dans le suivi évolutif, comme facteur prédictif[73 74 75]de progression tumorale en cas d'élévation. Certains auteurs rapportent une régression[7677] de ces marqueurs en parallèle de la réponse thérapeutique, et une corrélation avec le pronostic évolutif, les patients avec un taux plus élevé ayant une survie moindre. Ces études concernent souvent des effectifs modestes rendant l'interprétation des résultats nécessairement prudente. Concernant l'application pratique du dosage sérique de la protéine S100, 3 travaux[747879]recommandent un dosage tous les 3 mois, permettant de poser l'indication, en cas de taux supérieur à la valeur seuil, d'un bilan d'extension. On rappelle toutefois que sa sensibilité varie de 29 à 91% selon les études, ce qui ne permet pas l'utilisation isolée de ce dosage pour le dépistage des récidives.

c. Facteurs angiogéniques

L'angiogénèse est un facteur ayant une importance pronostique potentielle pour les cancers solides, facilitant la croissance tumorale et la propagation métastatique. L'étude du taux sérique des facteurs angiogéniques a ainsi été réalisée dans le mélanome afin de déterminer une éventuelle relation avec le pronostic évolutif. Les principaux facteurs étudiés sont le VEGF

(Vascular Endothelial Growth Factor) et ses récepteurs (Rc 1 et 2), l'angiogénine, le bFGF (Fibroblast Growth Factor b). Les différentes études[80,81,82,83,84,79] retrouvent des taux sériques supérieurs de VEGF, VEGF Rc 1 et 2, angiogénine, bFGF chez les patients ayant un mélanome versus patients sains. Pelletier[85] *et al*. rapportaient une élévation significative lors des récidives avec une sensibilité de 57% et une spécificité de 78%. Les données sont plus controversées concernant la corrélation entre taux sérique des facteurs angiogéniques et survie. Certains auteurs retrouvent une survie significativement moindre[84,82] en cas de facteurs angiogéniques élevés, d'autres[80,83] ne mettent pas en évidence de relation significative.

2. Facteurs tissulaires

a. Molécules d'adhésion

La progression tumorale du mélanome fait intervenir des interactions cellulaires et des interactions cellule/matrice extra-cellulaire, notamment par le biais de molécules d'adhésion. Plusieurs travaux se sont donc intéressés à la relation éventuelle entre le niveau d'expression de ces différentes molécules d'adhésion et le pronostic évolutif du mélanome. Les molécules les plus étudiées sont ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1), LFA-1 et LFA-3 (Lymphocyte Function Associated Antigen 1 et 3). Les auteurs[86,87] retrouvaient un taux sérique plus élevé d'ICAM-1 et de LFA-1 dans les mélanomes comparativement aux sujets sains, et au sein des mélanomes, leur expression était plus importante au stade métastatique.

b. Cytokines immunomodulatrices

De nombreux mécanismes peuvent contribuer à expliquer les phénomènes d'échappement tumoral, parmi eux les variations d'expression des différentes catégories de cytokines semblent jouer un rôle. Ainsi, un taux sérique élevé de cytokines immunosuppressives (TGFß, IL10) est associé dans plusieurs travaux[88,89] à un pronostic plus sombre, à une survie moindre, et inversement, un taux faible a été associé[90] à une survie globale supérieure.

C- Détection de cellules tumorales circulantes

La recherche de cellules de mélanome circulantes s'est développée dans les années 1990 avec les techniques de RT-PCR sériques[91]. Par la suite de nombreuses études ont suggéré que la détection de cellules circulantes par le biais de la RT-PCR d'un antigène (notamment tyrosinase particulièrement étudiée par cette méthode) pouvait avoir une signification pronostique. Néanmoins, cet impact pronostique reste sujet à controverse. Ainsi, on trouve de nombreux articles en faveur d'une signification pronostique de la positivité d'une RT-PCR sérique, mais également de nombreux articles concluant à l'absence de significativité d'une telle positivité. (Cf. Table 2) Les publications rapportant un impact pronostique de la RT-PCR associe une positivité de celle-ci, notamment de tyrosinase (le plus fréquent) à une survie moindre (SG : survie globale ou SSR : survie sans récidive).

Table 2 : Publications concernant le rôle pronostique des RT-PCR sanguines dans le mélanome.

Publications considérant la positivité de la RT-PCR comme un facteur pronostic			**Publications considérant la positivité de la RT-PCR comme sans impact pronostique**
	SG	**SSR**	
Mellado[92] et al. Clin Cancer Res 1999	X	X	Brownbridge[93] GG et al. Br J Dermatol 2001
Ghossein[94] R.A. et al. Clin Cancer Res 1998	X	X	Ranieri[95] JM. et al. Plast Reconstr Surg. 2005
Kunter[96] U.et al. J Natl Cancer Inst 1996	X	X	Scoggins[97] C.R et al. J Clin Oncol 2006
Voit[98] C. et al. J Clin Oncol 2005	X	X	Schmidt[99] H. et al. J Invest Dermatol. 2006
Glumac[100] N. et al. Neoplasma 2006	X		Domingo-Domenech[101] J. et al. Oncology 2005
Schmidt[102] H. Melanoma Res 2005	X		Palmieri[103] G. et al. J Clin Oncol 2003
Carillo[104] E. et al. Dis Markers 2006	X	X	Garbe[105] C. et al. Cancer 2003
Proebstle[106] T.M.et al. Br J Cancer 2000	X	X	Hanekom[107] GS. et al. Melanoma Res. 1999
Osella-abate[108] S. et al. Br J Cancer 2003		X	Reinhold[109] U. et al. J Invest Dermatol. 1997

Wascher[110] R.A. et al. J Clin Oncol 2003		X	Blaheta[111] HJ et al. Br J Dermatol 2001
Curry[112] B.J. et al. J Clin Oncol 1999		X	
Mellado[113] B. et al. J Clin Oncol 1996		X	
Hoon[114] *et al.* Cancer Res. 2000		X	
Hoon[115] *et al* J Clin Oncol 1995 : association à la progression (survie non étudiée)			

Afin de déterminer si la RT-PCR sanguine peut être considérée comme un facteur pronostique à part entière, 3 métaanalyses ont été réalisées. En 2001, Tsao *et al.*[116] ont revu 25 études (25 inclues sur 127 ; soit 1799 patients) de 1966 à 1999. Ils concluent à l'absence de données sur le devenir des patients de stade I, II et III qui avaient une RT-PCR positive et retrouvent une faible prévalence de RT-PCR positive au sein des stades IV. A partir de ces données, l'application de la RT-PCR semble difficile. En 2004, Quaglino[117] *et al.* réalisent une nouvelle métaanalyse (861 patients de stade I à IV, à partir de 7 études). Ils concluent à l'intérêt potentiel de la détection de tyrosinase par RT-PCR, notamment pour la SSR des patients de stade III.

En 2006, Mocellin[118] *et al* .réalisent une métaanalyse d'envergure plus importante, concernant 5433 patients. Les auteurs concluent à une corrélation de la détection des cellules circulantes (détection de différents antigènes MART-1, tyrosinase, gp 100) avec le stade d'une part, et avec la survie globale d'autre part. Toutefois, le niveau de positivité des stades I et II de l'ordre de 30 et 40% laisse présager de l'existence de faux-positifs. Certains auteurs ont proposé la définition d'un seuil de taux de positivité permettant de définir des populations à faible et à haut risque de récidive. Par ailleurs, seulement 47% des stades IV ont une RT-PCR positive, ce qui suggère que la sensibilité de la méthode est perfectible. Enfin, les auteurs décrivent une grande hétérogénéité dans les études considérées : selon le stade des mélanomes, le moment du prélèvement sanguin (avant, pendant, après le traitement), la méthode de détection (PCR vs cytométrique), les méthodes de prélèvement (sang total ou gradient de séparation), les objectifs principaux des études (corrélation avec le stade ou avec la survie), les analyses statistiques (univariée ou multivariée) ou encore la différence de traitement entre les patients. Tous ces points modèrent considérablement les conclusions de la métaanalyse et appellent à la réalisation

de séries prospectives homogènes avec une détection de multiples antigènes par RT-PCR afin d'améliorer la sensibilité de al technique (comme cela avait été démontré par Hoon *et al*).

Ainsi, dans une récente publication, Scoggins *et al.* ont présenté les résultats d'une étude multicentrique prospective s'intéressant notamment aux données de RT-PCR sanguine confrontées aux données de survie globale et sans récidive. Ils concluent à l'absence de différence pronostique entre les patients ayant une RT-PCR positive pour un antigène et les patients n'ayant aucune RT-PCR positive. En revanche, l'expression de plus d'un antigène était associée à une SSR plus courte, la SG n'était pas différente. Cependant seulement 2% des patients avaient une RT-PCR positive pour plus d'un antigène. Ils emble donc encore que la sensibilité de la méthode ne soit pas suffisante.

En conclusion, la RT-PCR des antigènes de mélanome dans le sang semble pouvoir avoir un intérêt pronostique, à condition de s'intéresser à plusieurs antigènes. Cependant, le manque de sensibilité de la méthode, et le manque de données de la littérature du fait d'une grande hétérogénéité des études ne permettent pas de pouvoir actuellement considérer cette méthode comme associée à un facteur pronostique utilisable en routine, et encore moins un outil d'adaptation thérapeutique.

D- Valeur pronostique du ganglion sentinelle

1. Ganglion sentinelle et survie sans récidive

8 études se sont intéressées à la valeur pronostique du ganglion sentinelle. Concernant la survis sans récidive, toutes les études concluent à un impact de la pratique du ganglion sentinelle sur la survie sans récidive (SSR). En effet, (Cf. table 3 page 19), la SSR dans ces études est supérieure en cas de ganglion sentinelle négatif.

Cependant, ces études comparent des données de survie parmi des patients chez qui la technique du ganglion sentinelle a été réalisée chez tous, et elles comparent toutes les données de survie en fonction du statut du ganglion sentinelle. Cependant, existe t'il une différence dans les données de survie entre des patients chez qui la technique a été réalisée *versus* des patients qui ne l'ont pas eu. Dans l'étude MSLT-1 (Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial 1) menée par Morton[119] et al., une population de 1973 patients présentant un mélanome de stade I est randomisée en deux groupes (Cf. Figure 5) : dans un groupe, excision large puis phase observationnelle (« watch and wait approach »), dans l'autre, excision large + biopsie du ganglion sentinelle. Les données de survie sans récidive à 5ans montraient une différence significative ($p<0.0065$) avec une survie plus élevée chez les patients ayant eu la technique du ganglion sentinelle (78.5% à 5ans Versus 73 %).

Il semblerait donc que la technique du ganglion sentinelle ait un intérêt comme facteur pronostique de survie sans récidive, ce qui avait été la conclusion du groupe de recommandations pour la pratique clinique (SOR 2005 pour la prise en charge des patients adultes atteints d'un mélanome cutané).

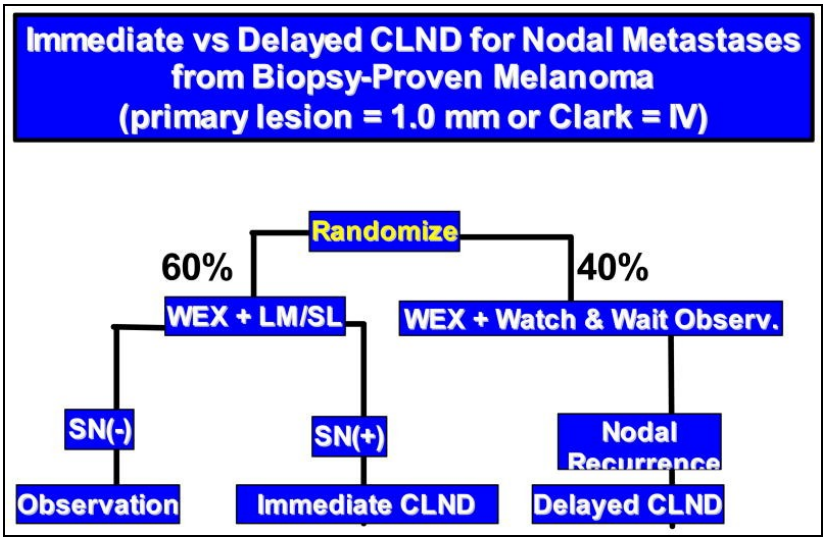


Figure 5: Organigramme de l'étude MSLT-1.
Les patients avec un mélanome histologiquement prouvé étaient randomisés soit pour excision large seule, soit excision large et GS selon un ratio 6 :4. (LM/SLN, lymphatic mapping/selective lymphadenectomy; SLN, sentinel node; CLND, completion lymph node dissection).

Table 3: Publications concernant la valeur pronostique du ganglion sentinelle.

Publication	SSR			SG		
	GS +	GS-		GS +	GS-	
Cecchi [120] et al. JEADV 2007	SSR à 5 ans : 18,2%	SSR à 5ans: 78,9%	p: 0,0121	SG à 5 ans : 36.4%	SG à 5 ans: 89.5%	p: 0.0272
Jansen [121] L. et al. Br J Surg 2000	SSR plus courte si GS+ Pas de chiffre. P:0,0001			SG à 3 ans: 67%	SG à 3 ans: 93%	p<0.001
Vuylsteke [122] RJ.et al. J Clin Oncol 2003	SSR à 5 ans: 50%	SSR à 5 ans: 88%	p<0,001	SG à 5 ans : 67%	SG à 5 ans : 92%	p<0.0001
Liszkay [123] et al. Pathol Oncol Res 2003	SSR plus courte si GS+, Pas de chiffre. P:0,0001			SG + courte sans chiffres si GS+ . P:0.0007		
Fincher [124] TR. et al. Am J Surg 2003	SSR à 55mois: 47,7%	SSR à 53 mois: 87,7%	p<0,01	SG à 55mois: 53%	SG à 55mois: 92.2%	p<0,01
Doting [125] MH. et al. Eur J Surg Oncol 2003	SSR à 3 ans: 66%	SSR à 3 ans: 83%	p<0,05	SG à 3 ans: 73%	SG à 3 ans: 92%	p<0.05
Essner [126] R et al. Ann Surg Oncol 2002	SSR à 5 ans: 47%	SSR à 5 ans:34%	p:0,012	SG à 5 ans : 50%	SG à 5 ans : 60%	p:0.159
Statius Müller [127] MG et al. Cancer 2001	SSR à 5 ans : 49%	SSR à 5 ans : 91%	p<0,00001	Non évalué		
Blumenthal [128] R. et al. Swiss Surg 2002	Non évalué			SG à 32 mois: 82%	SG à 32mois: 90%	non significatif (valeur de p non donnée)

SSR : survie sans récidive ; SG : survie globale.
GS + : ganglion sentinelle positif ; GS- : ganglion sentinelle négatif.

2. Ganglion sentinelle et survie globale

Concernant la survie globale, les données de la littérature sont plus contradictoires. En effet, dix études ont évalué l'impact pronostique du ganglion sentinelle vis-à-vis de la survie globale, 6 retrouvent une différence significative concernant la survie globale en fonction du statut du ganglion sentinelle. (Cf. Table 3 ci-dessus). Dans ces publications, les auteurs rapportent une survie globale plus élevée parmi les sujets dont le ganglion sentinelle était négatif par rapport à ceux dont le ganglion sentinelle était positif. En revanche, dans l'étude de Morton *et al.*, MSLT-1, comparant des patients avec la technique du ganglion sentinelle versus des patients ayant une phase observationnelle après l'exérèse initiale (Cf. Figure 5 page 18), il n'apparaissait pas de différence significative dans les données de survie globale entre les deux groupes. Les données actuelles de la littérature ne permettent donc pas de considérer la technique du ganglion sentinelle comme un facteur pronostique de la survie globale.

3. Valeur de la RT-PCR au niveau du ganglion sentinelle

Les techniques d'évaluation de l'expression antigénique dans ce travail font appel à la réalisation de RT-PCR au sein de métastases de mélanome. Qu'en est-il des données de RT-PCR appliquées à la technique du ganglion sentinelle (GS) ? Existe t'il une valeur pronostique du résultat de ces RT-PCR ?

On retrouve de nombreuses études (Cf. Table 4 page 22-23) s'étant attachées à définir l'intérêt de la pratique d'une RT-PCR au niveau du GS par rapport à l'analyse histologique et immunohistochimique. De plus, un grand nombre de ces études a évalué l'impact du résultat des RT-PCR sur le taux de récidive, sur les données de survie (globale et sans récidive). D'une façon assez concordante, les études rapportent une sensibilité supérieure de la RT-PCR par rapport à l'examen histopathologique et immunohistochimique standard. En effet, les taux de positivité varient de 20 à 76% pour la RT-PCR versus 11 à 40 % pour les techniques standard (Cf table ci-dessous). Deux études rapportent des faux-négatifs (1 à 5 %). Le taux de faux-

positifs est de l'ordre de 5%, il est associé à la présence de naevi intra-capsulaires qui sont éliminés après confrontation histologique.
Sur le plan pronostique, de nombreuses études décrivent la positivité de la RT-PCR comme un facteur pronostique péjoratif. En effet, 7 des études ci-dessous rapportent une corrélation entre la SSR et la positivité de la RT-PCR. De plus, les auteurs décrivent un taux de récurrences plus important chez les patients présentant des GS histologiquement négatifs mais positifs à la RT-PCR par rapport aux patients chez qui les ganglions sont négatifs par les deux méthodes. Ils décrivent ainsi la RT-PCR comme un moyen d'identifier un groupe de patients plus à risque de récidives. Enfin, deux études ont décrit une baisse de la SSR si le nombre de marqueurs positifs en RT-PCR augmentait.

Mocellin[129] *et al.* ont réalisé une métaanalyse (22 études, 4019 patients) concernant la place de la RT-PCR au niveau du GS d'un point de vue pronostique. Ils concluent à une corrélation entre positivité de la RT-PCR et l'augmentation du taux de récurrence, ainsi qu'à une corrélation entre positivité de la RT-PCR et survie globale et sans récidive. Cependant, les auteurs signalent une grande hétérogénéité dans les études publiées pouvant amener à surestimer les résultats dans le cadre de la métaanalyse. Ils incitent donc à la prudence dans l'interprétation de ces conclusions, et à la poursuite des investigations dans ce domaine.
Toutefois, dans une étude prospective multicentrique (sunbelt melanoma trial), Scoggings[130] *et al.* ont réalisé une RT-PCR sur 3505 GS, et ont corrélé ces résultats avec les données de survie globale, sans récidive et le taux de récurrence. Les auteurs ne retrouvent aucune différence significative en termes de survie entre les patients présentant une RT-PCR positive au niveau du GS et ceux chez qui la RT-PCR est négative. De même, les auteurs ne retrouvent pas de modification de la survie lorsque la RT-PCR est positive, en fonction du nombre de marqueurs exprimés. De plus, le taux de récurrence constaté lorsque la RT-PCR est positive est de 10% versus 11% lorsqu'elle est négative. Enfin, en analyse multivariée, la RT-PCR au niveau du ganglion sentinelle n'apparaît pas comme un facteur pronostic.

La place pronostique de la RT-PCR au niveau du GS doit donc demeurer du domaine de l'investigation, l'état actuel des données ne permet pas son implication dans la conduite thérapeutique.

Table 4 : Publications concernant la valeur pronostique de la RT-PCR au niveau du ganglion sentinelle.

Publication	Ganglion sentinelle		Sonde RT-PCR	Taux de récidive	Survie
	Anapath / IH	RT-PCR			
Takeuchi H et al. J Clin Oncol 2004	53/215 +	53/53+	Melan A/MART-1 MAGE 3	Non précisé	positivité ≥ 1 marqueur par RT-PCR = facteur pronostic indépendant de SG; p:0.0002
		48/162 (30%) + pour au moins 1marqueur			
Palmieri G et al. J Clin Oncol 2001	61/75 + histo seule	30/61 ≥1marqueur + 12/61 + pour les 2 marqueurs	Tyrosinase Melan A/MART-1	Non précisé	Corrélation entre la positivité des 2 marqueurs et la SSR et la SG.(SSR, P < .0001; SG, P = .0047)
		10/14 +			
Ribuffo D et al. Annals of surgical oncology 2003	15/134 +	15/134+ groupe 1	Tyrosinase Melan A/MART-1	Non précisé	Corrélation avec la SSR: allongement de la SSR du groupe 1 au Groupe 3.
	119/134 -	70/134 + groupe 2			
		49/134 - groupe 3			
Kuo CT et al. J Clin Oncol 2003	37/77 +	35/37 + 2/37 - = faux négatif 5%	Tyrosinase Melan A/MART-1 TRP-1 et TRP-2	Non précisé	SSR diminuant progressivement pour les patients histo- et RT-PCR + en fonction du nombre de marqueurs positifs. (p<0.009)
	40/77-	22/40+			
Bostick PJ et al. J Clin Oncol 1999	17/ 72 +	16/17 + pour au moins 2 marqueurs	MAGE3 Tyrosinase Melan A/MART-1	5/16 (31%) récidive	Non précisé
		1/17 -		Pas de récidive	
	55/72+	20/55 + ≥ 2 marqueurs		3/20 (15%) récidive	
		35/55 ≤ 1 marqueur + 2/35 + : naevi capsulaires = faux+		Pas de récidive	
Blaheta HJ et al. J Invest Dermatology 2000	15/116+	15+	Tyrosinase	10/15 récurrences p:0.01	RT-PCR: facteur prédictif de la SSR .p: 0.001
	101/116 -	36/101 +		9/36 récurrences p:0.01	
		65/101-		4/65 récurrences p:0.01	

Cook MG et al. J Pathol 2003	155/1158 +	55 évalués par RT-PCR: 13+ tyrosinase; 21+ MART-1	Tyrosinase Melan A/MART-1	non précisé	non précisé
	1003/1158 -	10/1003 tyr+ MART-1+			
		Faux-positifs: 7%			
Rimoldi D et al. Melanoma Res 2003	16 /71 +	16/71+	Tyrosinase Melan A/MART-1		
	55/71-	25/55 + 8/25 : naevi intra-capsulaires =faux positifs		Récurrence RT-PCR + histo-:12%	
		30/55 -			
Ulrich J et al. Eur J Cancer 2004	34/322+ (10.6%)	34/322+	Tyrosinase	44% récidive	Analyse multivariée: type histo = facteur pronostic indépendant. Statut RT-PCR+: identification d'un groupe à haut risque de récidive.
	288/322 -	29/288+ Tyr		Histo- RT-PCR+: 28% récidive	
		259/288 -		Double-: 8% récidive	
Shivers CS et al. JAMA 1998	23/114 +	23/114 +	Tyrosinase	**Taux de récidive à 37 mois**. 14/23 : 61% récidive	Analyse multivariée: statut histo et RT-PCR du GS = facteurs pronostics indépendants de SSR.
	91/114 -	47/91 +		6/47: 13% récidive	
		44/91 -		1/44: 2% récidive	
Romanini A et al. Ann Oncol 2005	23/124 +	23/124+	Tyrosinase Melan A/MART-1	**Taux de récidive à 30 mois.** 60%	DC: 7/23 : 30%
	101/124 -	16/101 +		0,31	DC: 2/16 12.5%
		85/101 -		9.4%	DC:0
					RT-PCR : + sensible, facteur prédictif de récidive.

II. Les antigènes de tumeur associés au mélanome

A- Historique de la découverte des antigènes de tumeur du mélanome

C'est à partir des différents travaux étudiant la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (LTC) sur des lignées cellulaires de mélanome qu'ont été identifiés les différentes protéines antigéniques du mélanome. Ces travaux, principalement réalisés dans les 10-15 dernières années ont permis de classer ces différents antigènes en différentes catégories :

- Les antigènes de différentiation : Melan-A/MART-1, tyrosinase, gp100, gp75.
- Les antigènes de tumeurs, cancer-testis antigènes : MAGE, GAGE, BAGE, NY-ESO1.
- Les antigènes mutés : CDK4[131], β-catenin[132].
- Les antigènes d'amplification : HER2/neu[133] and p53[134].

Van den Bruggen *et al*[146]. ont décrit MAGE-1 en 1991, en observant la reconnaissance d'un cosmide (tranfecté par l'ADN de lignées cellulaires exprimant MAGE-1) par les LTC.
De même, si *Kwon*[144] et Bouchard[136] ont initialement décrit le gène de tyrosinase en 1987 et 1989 en étudiant la pigmentation sur des modèles murins, Brichard[135] *et al.* ont découvert en 1993 son immunogénicité en isolant la réponse de LTC vis-à-vis de l'antigène dans un contexte HLA-A2. Similairement, Coulie[141] *et al.* ont décrit en 1994 un second gène codant pour un antigène reconnu par des LTC HLA-A2 : Melan-A.
Par la suite, en analysant l'expression du gène MAGE-1, d'autres gènes furent isolés car s'hybridant également avec la sonde MAGE-1. Les gènes de MAGE-2 et 3 furent ainsi décrits par Gaugler[149] en 1993. De la même façon, d'autres gènes de la même famille furent ensuite décrits : BAGE (Boël[151] 1995), GAGE (Van den Eynde[150] 1995).
En 1996, Guilloux[154] *et al* décrivent l'antigène NA-17 en étudiant la réactivité des LTC sur des cellules de mélanome HLA-A2.
Enfin, en 1998, à partir du SEREX (serological screening of cDNA expression libraries), Jäger[153] et al. décrivent un nouvel antigène de la famille «cancer-testis »(car exprimé dans

des tissus tumoraux, et en tissu sain au niveau testiculaire) induisant une forte réponse humorale et cellulaire : NY-ESO-1.

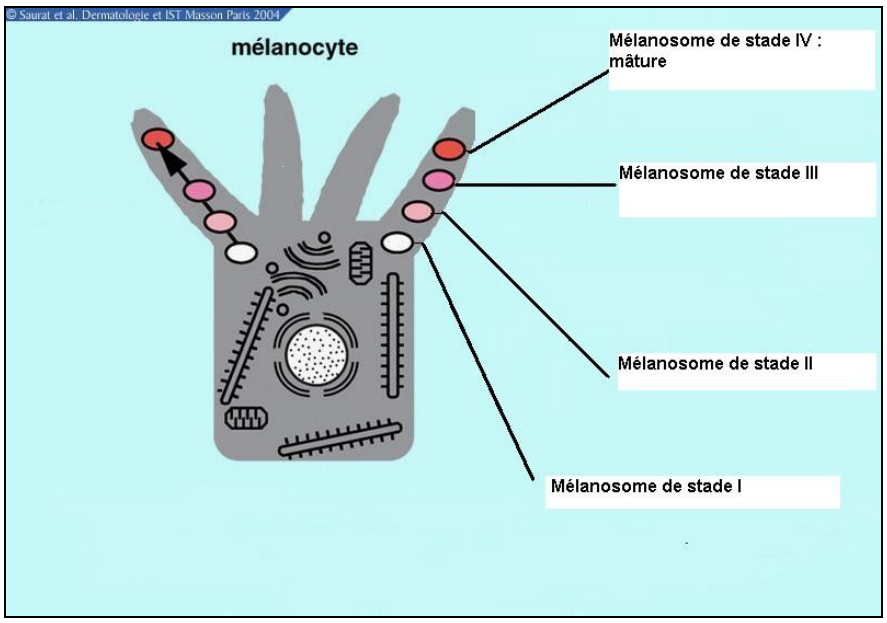
Nous ne détaillerons que les antigènes utilisés dans l'étude exposée ci-après : Melan-A/MART-1, tyrosinase, Mage (1 et 3), NY-ESO1 et NA17.

B- Les antigènes de différentiation

1. Tyrosinase

Brichard[135] *et al.* ont mis en évidence le caractère antigénique du peptide exprimé par le gène de tyrosinase préalablement séquencé[136,137]. La cible des lymphocytes est une protéine cytoplasmique transmembranaire. Elle se situe sur la membrane interne des mélanosomes de stade I et II (Cf. figure 6). De ce fait, tyrosinase est un antigène de différentiation, présent uniquement au niveau des mélanocytes et des cellules de mélanome[138], tout comme Melan-A, gp100 et gp 75. Tyrosinase partage de grandes similarités avec gp100[139] et gp75[140] : ce sont toutes trois des protéines de la membrane interne des mélanosomes immatures.

Figure 6 :



Tyrosinase intervient dans les deux premières étapes de la voie métaboliques des mélanines. Elle catalyse la conversion de la L-Tyrosine en DOPA (DihydrOxyPhénylAlanine) puis en dopaquinone.

2. Melan-A/MART-1

Coulie[141] *et al.* clonèrent le gène de Melan-A codant un antigène reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques. Indépendamment, en s'intéressant à la cible des lymphocytes infiltrant la tumeur, Kawakami[142] *et al.* clonèrent le même gène intitulé MART-1 ou Melanoma Antigen Recognized by T cells 1. De même que pour tyrosinase, il s'agit d'une protéine présente uniquement au niveau des mélanocytes et des cellules de mélanome. Melan-A est une protéine cytoplasmique, en revanche, cette protéine est plus petite que tyrosinase/gp100et75 et n'est pas transmembranaire.

3. Autres antigènes

Gp100[143] et gp75[140] sont également présents dans les mélanocytes et les cellules de mélanome, ils appartiennent donc à cette classe des antigènes de différentiation. Ils partagent de grandes analogies structurelles[144] avec tyrosinase et sont comme elle des protéines transmembranaires situées au niveau des mélanosomes immatures.

Les antigènes de différentiation sont décrits dans ces premières publications comme étant exprimés à des niveaux particulièrement élevés : de l'ordre de 80[145] à 100%[135,136] sur les prélèvements étudiés. De plus, le fait que ces antigènes soient exprimés dans un contexte HLA A2, soit environ 49% des patients, semble d'emblée intéressant en termes d'immunothérapie.

C- Les antigènes de tumeurs

1. Les cancers-testis antigènes

a. Mage 1 et 3.

A partir de la même méthode que pour les antigènes précédents, en recherchant la cible des lymphocytes, l'antigène Mage1 (Melanoma Antigen GEne 1) fut isolé initialement par Van der Bruggen *et al*[146]. Il s'agit d'un antigène exprimé sur 40% des spécimens de mélanome étudiés, mais également sur 30% des cancers pulmonaires et 20% des cancers mammaires[147].Dans les tissus normaux, Mage-1 est exprimé au niveau testiculaire. L'antigène est un nonapeptide[148] présenté par une molécule de CMH de classe1 HLA-A1. A la différence des antigènes précédents, Mage-1 n'est présent qu'au niveau des cellules de mélanome, et non pas au niveau des mélanocytes, ce qui en fait un antigène de tumeur et non de différentiation.
Mage-3 a été isolé par Gaugler[149] *et al.* en 1994. Les auteurs décrivent alors une expression plus élevée sur les fragments de mélanome étudiés : de l'ordre de 69% vs 40% pour Mage1.
De même que Mage-1, il est exprimé dans plusieurs autres tumeurs : cancers du poumon à petites cellules et non à petites cellules, dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. En revanche, sa présence dans les cancers mammaires est moins fréquente (12%) que Mage-1.
La famille des antigènes MAGE comprend au moins 12 antigènes différents qui ont en commun d'être exprimés dans différents types de cancers et dans les tissus normaux au niveau uniquement testiculaire. Ces caractéristiques sont également partagées par deux autres familles d'antigènes : GAGE[150] et BAGE[151]. Le fait que ces « cancer-testis » (CT) antigènes ne soient pas exprimés dans les tissus adultes normaux autres que testiculaires, et uniquement au niveau des fœtus de moins de 20 semaines a fait émettre l'hypothèse que les antigènes MAGE, BAGE et GAGE puissent jouer un rôle au niveau du développement embryonnaire précoce, d'où leur autre appellation d'antigènes « embryonnaires ».

b. Ny-ESO-1

Ny-ESO-1 appartient également à cette famille antigénique.NY-ESO-1, isolé à partir d'une analyse SEREX (Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries) d'un cancer oesophagien[152]. Selon les auteurs, est retrouvé dans 20 à 30% des mélanomes, des cancers pulmonaires, mammaires, ovariens et vésicaux, rarement au niveau des cancers colo-rectaux et rénaux comme les autres CT antigènes. Il est exprimé dans un contexte HLA-A2[153].

2. NA-17

L'antigène NA-17 a été mis en évidence par Guilloux[154] *et al.* en 1996. Il est codé par un intron du gène codant pour la N-acetylglucosaminyltransferase, enzyme située dans l'appareil de Golgi. Il s'agit d'un antigène présenté dans un contexte HLA-A2 et décrit comme étant exprimé par 50% des spécimens de mélanomes HLA-A2 étudiés. Cet antigène n'est pas exprimé de façon significative par les mélanocytes, il constitue un antigène de tumeur spécifique.

D- Valeur pronostique de l'expression des antigènes de tumeur au niveau de métastases de mélanome.

La littérature fournit très peu de données sur ce sujet. En effet, l'expression antigénique a pu être étudiée dans quelques travaux, mais l'analyse de cette expression dans une perspective de signification pronostique n'a que très rarement été réalisée.

De Vries *et al*. ont étudié par immunohistochimie l'expression d'antigènes de différentiation (MART-1, tyrosinase, gp100) au sein de 86 localisations métastatiques et 44 primitifs sans trouver de modification du pattern d'expression, concluant à une probable faible influence de la modification antigénique avec la progression tumorale.

Barrow *et al*. ont étudié par immunohistochimie l'expression de melanA, tyrosinase, mage1et4, gp100, Ny-ESO-1 sur586 prélèvements tumoraux (174 ganglions, 71 localisations sous-cutanées, 90 métastases « à distance », 251 primitifs). Ils retrouvaient une expression significativement moindre de mage1et 4 au niveau des tumeurs primitives ; ces antigènes semblaient acquis dans les stades avancés (51-44%des métastases *versus* 9-20% pour les primitifs). En revanche, Ny-ESO-1 ne partageait pas cette répartition, et était exprimé de la même façon entre primitifs et métastases. Les auteurs concluaient à une possible signification pronostique de l'expression de mage1 et 4.

Goydos *et al*. ont étudié l'expression de Ny-ESO-1 par RT-PCR parmi 52 prélèvements (10 métastases, 22 localisations locorégionales et 2 primitifs). Ils décrivaient une expression plus importante ($p<0.02$) de Ny-ESO-1 parmi les prélèvements métastatiques : expression parmi 46.8% des métastases et 10% des primitifs. De même, Velazquez *et al*. décrivent une expression (au niveau protéique) privilégiée de Ny-ESO-1 au niveau des stades avancés. Ainsi, en étudiant l'expression de Ny-ESO-1 par immunohistochimie sur 124 prélèvements (61 primitifs et 63 métastases), ils retrouvaient une expression sur 32% des métastases et sur 10% des primitifs, résultats analogues à ceux de Goydos et al. Ces deux derniers travaux suggéraient donc une notion de mauvais pronostic associée à l'expression de Ny-ESO-1 au niveau transcriptionnel ou protéique.

Nous disposons donc de peu de données sur la signification pronostique de l'expression antigénique au niveau métastatique. De plus, les méthodes d'évaluation de l'expression varie (immunohistochimie ou RT-PCR), les effectifs sont souvent assez faibles, et les résultats contradictoires. Il semble donc difficile de conclure sur la signification de l'expression antigénique au niveau des métastases de mélanome avec ces éléments. La seule notion concordante de ces différents travaux serait, de façon globale, une tendance à l'expression des cancer-testis antigènes plus volontiers au sein des stades avancés.

III Etude rétrospective de l'expression des gènes de mélanome et profil clinique

L'étude est exposée dans l'article suivant soumis à publication dans le British Journal of Dermatology.

INTRODUCTION

Ces dernières années, l'identification d'antigènes associés au mélanome ont ouvert les portes de l'immunothérapie du mélanome (vaccination), avec des résultats encore très partiels mais encourageants[1234567]. Une trentaine d'antigènes de mélanome sont aujourd'hui connus avec des niveaux d'expression très variables. Les progrès dans l'immunothérapie du mélanome se heurtent à la connaissance des mécanismes d'échappements des cellules tumorales à l'immunité adaptative. L'inhibition d'expression des antigènes de tumeurs représente l'un de ces mécanismes d'échappement potentiel des cellules mélaniques à leur reconnaissance par les lymphocytes T réactifs et cytotoxiques. L'hypothèse d'une variation continue du pattern d'expression génique a déjà été documentée[8], cependant il existe peu d'études explorant la relation entre les profils d'expression génique des cellules tumorales de mélanome et le profil évolutif clinique des patients.

Mieux connaître cette relation pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes d'échappement aux thérapeutiques d'immunothérapie spécifique et surtout définir des profils de répondeurs potentiels à ces traitements. Dans ce contexte, nous avons déterminé les profils d'expression génique par RT-PCR des cellules tumorales de prélèvements de mélanome pour les gènes Melan-A, MAGE-3, MAGE-1, Tyrosinase, Na-17, NY-ESO-1 et étudié s'il existait

---

[1] Morton D, Foshag L.J, Hoon D.S et al. Prolongatioh of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine.Ann.Surg., 216: 463-482, 1992.
[2] Morton D. L., Barth A. Vaccine therapy for malignant melanoma. CA. Cancer J. Clin. 46 : 225-244, 1996.
[3] Jager, E, Ringhofer, M. ET AL. GMCSF factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. Int. J. Cancer, 67: 54-62, 1996.
[4] Hsueh, E., Nathanson, L. et al. Active specific immunotherapy with polyvalent melanoma cell vaccine for pâtients with in-transit melanoma metastases. Cancer (Phila.), 85: 2160-2169, 1999.
[5] Scheibenbogen, C., Nagorsen, D. et al. Long term freedom from recurrence in 2 stage melanoma paients following vaccination with tyrosinase peptides. Int. J. Cancer,99: 403-408, 2002.
[6] Parmiani, G., Castelli, C. et al. Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines : what have we achieved ? Where are we going? J. Nat. Cancer Inst. (Bethesda), 94: 805-818, 2002.
[7]Takeuchi, H, Kuo C et al. Expression of differentiation melanoma associated anigen genes is associated with favorable outcome in advanced stage melanomas.Cancer Research 63, 441-448, 2003
[8] Jager E, Ringhoffer M et al. Immunoselection in vivo: independent loss of CMH class I and melnocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. Int J Cancer, 71: 142-147, 1997.

une corrélation entre cette expression et la survie sans rechute et la survie globale des patients à différents stades de leur maladie.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL

Il s'agissait d'une étude rétrospective portant sur 202 prélèvements tissulaires techniqués dans le laboratoire d'immunodermatologie (INSERM U601, CHU Nantes) par RT-PCR entre le 30/09/00 et le 01/01/2005. Seul était techniqué le premier prélèvement pour un patient donné s'il en avait eu plusieurs. Chaque prélèvement tumoral était placé dans un tube de RNA later. Le RNA *later* RNA Stabilization Reagent stabilisait les ARN dans les échantillons fraîchement prélevés.

Parallèlement pour chaque patient d'où provenait le prélèvement était relevé dans le dossier le siège de la lésion prélevée.

METHODE

Les différents gènes de mélanome étudiés par une technique de RT-PCR étaient: Mage-3, Mage-1, Melan-A, Tyrosinase, Na-17, NY-ESO-1.

Les prélèvements étaient broyés dans du Trizol® (1 mL pour 50 à 100 g de tissu).0.2 m l de chloroforme étaient ajoutés pour 1 ml de Trizol®. L'ensemble était vigoureusement agité, puis centrifugé (12000g pendant 15 min à 4 °C) après avoir laissé 2 à 3 minutes à température ambiante. La phase aqueuse contenait les ARN totaux, la phase organique correspondait à l'ADN, elles étaient séparées par l'anneau protéique. Les ARN totaux étaient récupérés, précipités dans 0.5mL d'isopropanolol. Le mélange était agité énergiquement, puis laissé 10 min à température ambiante, et à nouveau centrifugé (7500g pendant 5 min à 4°C). Le surnageant était éliminé, le culot lavé dans 1.5 mL d'éthanol 75%, et centrifugé (7500g pendant 5 min à 4°C). Le culot d'ARN était ensuite séché sous vide puis dissous dans de l'eau.

Evaluation de la qualité des ARN extraits :

Cette évaluation était faite en réalisant une migration des échantillons sur gel d'agarose. Les ARN ribosomaux, majorité des ARN extraits migraient en deux bandes (28 S et 18 S), la première devant être deux fois plus intense que la seconde. La qualité de ces ARN ribosomaux signait celle des ARN messagers. La présence de bandes supplémentaires témoignait d'une dégradation de l'ARN, d'autant plus importante qu'il y avait de bandes supplémentaires.

RT-PCR :

Une amorce désoxyribonucléique « oligo dT » de 25 à 30 thymidines s'hybridait avec la queue polyadénosylée des ARN messagers. Etaient ensuite mélangés : 2 µL d'oligo dT (500 pmol/ µL), 4 µL de DNTP (désoxynucléotide triphosphate, 10mM, Gibco BRL®)), 2 µL de DTT (dithiothréitol, 0.1M, Gibco BRL®) avec 6.5 µL d'ARN à 310 ng/ µL. Le mélange était ensuite placé 10 min à -70°C : dénaturation des acides nucléiques, puis 5 min dans la glace pour l'hybridation des amorces. Puis, la RT-PCR était initié en tant que telle, par incorporation d'un mélange de 4 µL de solution tampon (5 * first strand buffer (250mM ; pH= 8.3 ; $MgCl_2$ 15 mMol ; KCl 375 Mm. Gibco BRL®), de 0.5 µL de RNAsine (inhibiteur de RNAse) (400 / µL ; Gibco BRL®) et 1 µL de M-MMLV reverse trancriptase (transcriptase du virus leucémique murin Moloney). La synthèse des acides nucléiques se faisait en laissant le mélange 1 heure à 42°C. La réaction était arrêtée par l'adjonction de 80 µL d'eau distillée RNAse-free par tube.

Evaluation de l'expression des gènes:

Deux µL de tampon (10 x first strand buffer, défini ci-dessus) étaient rajoutés au produit de PCR. Une migration sur gel d'agarose (1%) était réalisée avec 10 µL de ce produit. La migration était arrêtée quand le produit avait migré au milieu du gel. Un témoin positif et négatif (eau stérile) était utilisé pour chaque PCR. Une estimation visuelle était réalisée de l'expression de chaque marqueur en %, en fonction de ces témoins.

L'expression de l'ARN des antigènes était classée en nulle, faible (de 0 à 50 %) et forte (de 50 à 100%).

Critères cliniques étudiés :

Ont été successivement étudiés, l'âge et le sexe du patient, le type d'organe prélevé. Pour les prélèvements cutanés, était relevé le caractère photo exposé ou non de la zone prélevée. On considérait initialement comme exposée visage, cou et mains. Ces données étaient ensuite comparées aux expressions des gènes au niveau transcriptionnel.

Analyse statistique :

Concernant les données épidémiologiques, l'étude d'une relation entre sexe puis âge et expression génique était respectivement réalisée avec le test de Chi-2 et l'analyse de variance (ANOVA).

Les tests statistiques utilisés pour la comparaison des caractéristiques des prélèvements et l'expression génique étaient les tests de Student ou test de Wilcoxon [(test non paramétrique) si les effectifs sont trop faibles] pour la comparaison d'une variable quantitative avec une variable qualitative à deux classes ; pour la comparaison d'une variable quantitative avec une variable qualitative à plus de deux classes : Analyse de variance (ANOVA) ou test de Kruskal-Wallis (test non paramétrique) si les effectifs étaient trop faibles.

Concernant les analyses de survie, l'estimation des courbes de survie était réalisée par la méthode Kaplan-Meier, et le test de Log-Rank était utilisé pour comparer les courbes de survie. La date de début d'évaluation était la date de RT-PCR. En effet, l'objectif était d'étudier le lien éventuel entre l'expression génique au moment d'une récidive et la survie après celle-ci.

RESULTATS

1 .Prélèvements

Sur les 202 prélèvements tissulaires, l'expression transcriptionnelle des gènes Melan-A et Tyrosinase étaient étudiés sur 185, Na-17 sur 184, Mage-3 sur 195, Mage-1 sur 189 et Ny-SO1 sur 74 prélèvements.

Les prélèvements concernaient 5 mélanomes primitifs (IA et B AJCC 6[9]),37 nodules en transit (IIIB AJCC 6), 48 localisations ganglionnaires locorégionales (IIIB AJCC 6), 108 métastases (IV AJCC 6) dont 69 cutanées, 27 ganglionnaires non extirpables et 12 viscérales. Le stade considéré pour l'analyse était donc le stade AJCC au moment du prélèvement analysé par RT-PCR. (cf. Fig.1)

Les 202 prélèvements correspondaient à 202 patients, dont 114 femmes et 88 hommes. L'âge médian était de 66ans (écart type : 15.80).

2. Fréquence d'expression des gènes de tumeur

En considérant l'ensemble des prélèvements, 86.3% des biopsies exprimaient le gène Melan-A, 87% Tyrosinase, 84.6% Na-17, 70.8% NY-ESO-1, 40.6% MAGE-1, 55.4 % MAGE-3 (cf. Fig.2).

3. Expression transcriptionnelle selon le type d'organe

Tous les gènes n'ayant pas été évalués sur tous les prélèvements, on considérait un pourcentage d'expression défini par le rapport : nombre de gènes exprimés / nombre de gènes évalués (de 0 à 6). Il n'existait pas de variation significative dans le profil d'expression génique selon le type d'organe prélevé. Aucun organe n'exprimait significativement un plus grand nombre de gènes de tumeurs (Tableau IIa). De même, on ne retrouvait pas de différence d'intensité d'expression génique selon le type d'organe prélevé. (Tableau IIb)

[9] Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG *et al.*Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. J Clin Oncol 2001; 19: 3635-48.

3. Influence des UV sur l'expression des gènes de mélanome

Cette étude était réalisée uniquement sur les prélèvements cutanés (n=108): nodules en transit IIIB AJCC, et métastases cutanées IV AJCC. Les mélanomes primitifs étant très peu nombreux (n = 5), ils n'avaient pas été pris en compte pour l'analyse. Les zones considérées comme exposées étaient: le visage, le cou, les mains ; toutes les autres zones étaient considérées zones non exposées. Aucune différence significative n'était retrouvée entre le profil transcriptionnel des gènes et le caractère photo exposé ou non de la zone prélevée pour les stades IIIB et IV confondus ni pour les stades IIIB pris isolément. Par contre, pour le stade IV pris isolément, Mage-3 était significativement plus exprimée lorsque la métastase cutanée était en zone non exposée. (p=*0.0399*; cf. Tableau III). En incluant les jambes comme zone photo exposée, on ne retrouvait plus de différence significative pour aucun gène.

5. Intensité d'expression transcriptionnelle selon le sexe et l'âge du sujet prélevé.

Pour chaque prélèvement, on considérait un marqueur donné et l'âge du sujet au moment du prélèvement. Afin d'obtenir des données interprétables, des classes d'âge ont été réalisées de telle sorte que chaque classe comporte des effectifs comparables. On ne retrouvait pas de différence significative de l'intensité d'expression des 6 gènes en fonction du sexe, ni en fonction de l' âge.(Tableau I : évalué sur 99 patients).

6. Expression des gènes et survie

Deux évènements ont été étudiés : la survie sans récidive et la survie globale.
La date finale d'évaluation était fixée au 1er septembre 2006. La date de début d'évaluation était la date de réalisation de la RT-PCR. Les patients perdus de vue au 1er septembre 2006 étaient censurés. Quand la date de début ne comportait que l'année, le 01/07/xxxx était utilisée systématiquement. Sur les 202 patients, 188 ont eu une récidive (soit 96 %), 6 patients avaient un statut inconnu en ce qui concerne la récidive (perdus de vue) et 100 patients sont décédés (soit 49,5 %).

Survie sans rechute (SSR)

On ne retrouvait pas de différence significative de la SSR selon le niveau d'expression transcriptionnelle des gènes Melan A, tyrosinase, NA-17 et MAGE-1. Lorsqu 'on considérait tous les prélèvements de stade III, une expression forte de MAGE-3 (] 50-100%]) était associée à une SSR significativement supérieure ($p<0.005$) (Cf. figure 3).

Survie globale (SG)

On ne retrouvait pas de différence significative de la survie globale selon l'intensité d'expression des gènes.

Comparaison gènes de différentiation et gènes embryonnaires

Les gènes étaient séparés en deux sous-groupes : les gènes de différentiation (Melan-A et Tyrosinase), et les gènes embryonnaires (NA-17, MAGE-1 et 3, NY-ESO-1). La médiane de survie pour un sous-groupe donné a été utilisée pour ces analyses.

Gènes de différentiation : On ne retrouvait pas de relation significative entre l'intensité d'expression (toujours au niveau transcriptionnel) des gènes de différentiation et la SG d'une part, et la SSR d'autre part.

Gènes embryonnaires *:* On ne retrouvait pas de relation significative pour les stades I, II et IV et la SSR. En revanche, pour les prélèvements de stade III, la SSR était significativement supérieure lorsque les gènes embryonnaires étaient exprimés toute intensité d'expression confondue ($p= 0.002$) comparativement aux prélèvements négatifs. Ainsi, la médiane de SSR était de 9 mois pour les prélèvements n'exprimant pas de gènes embryonnaires, elle passait respectivement à 21.5 et 18 mois pour les prélèvements exprimant de [0 à 50%] et de [50 à 100%] (Tableau IV et figure 4a). En regroupant les prélèvements en « pas d'expression » et « expression présente », on retrouvait le même résultat avec une médiane de SSR de 9 mois pour les prélèvements sans expression de gène, et une médiane de SSR de 20 mois pour les prélèvements exprimant des gènes embryonnaires ($p : 0.0005$). (Tableau IV et figure 4b)

DISCUSSION

Notre étude démontre une augmentation de l'expression de MAGE-3 au niveau transcriptionnel dans les métastases cutanées non photo exposées de mélanome, ainsi qu'un lien significatif entre SSR et expression plus forte des antigènes embryonnaires (Mage-1 et 3, Ny-ESO-1) au niveau des prélèvements de stade III.

L'analyse des caractéristiques cliniques (âge et sexe) des prélèvements montre que le sexe et l'âge n'interviennent pas sur le type de gène de tumeur de mélanome exprimé ni sur leur intensité d'expression. En effet, si le gène tyrosinase est plus exprimé sur les prélèvements des sujets âgés de moins de 50 ans. ($p<0.05$), l'absence de linéarité des résultats avec la progression de l'âge amène à considérer ces résultats comme fortuits. Farthmann *et al.*[10] dans une étude concernant 123 patients, portant sur des RT-PCR de cellules circulantes Tyrosinase positives, retrouvait une prédominance masculine d'expression de Tyrosinase ; toutefois le caractère informatif de ce résultat qui ne concerne que des cellules circulantes est sans doute limité. A l'inverse, Takeuchi *et al.*[11] ne retrouvait pas de corrélation significative entre caractéristiques cliniques et intensité d'expression des gènes dans une étude comportant des RT-PCR sur tissu tumoral métastatique (métastases cutanées, ganglionnaires et viscérales) chez 25 patients au stade métastatique (Les antigènes considérés dans cette étude étaient : Tyrosinase, Tyrosinase-related protein 2 et MART-1). Nos résultats sont donc concordants avec cette dernière étude.

En ce qui concerne la nature des gènes, tous prélèvements confondus, les gènes de différentiation sont plus souvent exprimés que les gènes embryonnaires, avec une fréquence d'expression moyenne des 86.5% versus 60%. Parmi les gènes spécifiques de tumeur, NA-17 et NY-ESO1sont plus souvent exprimés (84% et 70.8%) que MAGE-1 et 3 (40.6% et 55.44%). Au niveau protéique, des variations d'expression des antigènes de mélanome, qu'il s'agisse d'antigènes de différentiation ou d'antigènes embryonnaires ont déjà été rapportées.

[10] Farthmann B. RT-PCR tyrosinase-mRNA-positive cells in peripheral blood : evaluation strategy and correlation with known prognostic markers in 123 melanoma patients. J Invest Dermatol. 1998; 110(3): 263-7.

[11] Takeuchi H, Kuo C, Morton D.L, Wang H-J et al. Expression of differentiation Melanoma –associated Antigen Genes is associated with favorable disease outcome in advanced-stage melanomas. Cancer Research 63, 441-448, 2003

Ainsi, Barrow *et al.*[12] sur une analyse immunohistochimique de 586 tissus tumoraux, retrouvaient une expression supérieure, quel que soit le stade, des antigènes de différentiation (gp100, melanA, Tyrosinase) de l'ordre de 93-95%. L'expression transcriptionnelle moyenne de MAGE dans notre étude est comparable à leur résultat concernant les stades avancés avec une expression de MAGE-1 à 40.6% vs 51% dans leur étude pour l'expression des antigènes. Ils retrouvaient en revanche une moindre expression de l'antigène MAGE sur des mélanomes primitifs, concluant à une induction de l'expression de ces antigènes avec la progression de la maladie. Trefzer *et al.*[13] retrouvaient des résultats tout à fait similaires dans une étude portant sur l'expression antigénique (immunohistochimie) au niveau de 191 tissus métastatiques: MART1 était exprimé dans 79.5% des prélèvements, alors que MAGE ne l'était que dans 59.6%. De même, Enk *et al.*[14] dans une étude évaluant par RT-PCR les profils d'expression génique de différents tissus métastatiques de mélanome, retrouvaient une fréquence d'expression élevée des gènes de différentiation : Tyrosinase 59 %, MART-1 et MIA 76%.

Notre étude montre également que l'expression des gènes n'est pas modulée par les UV puisqu'il n'existe pas de différence d'expression aussi bien des gènes de différentiation qu'embryonnaire entre les prélèvements cutanés (pris dans leur globalité) provenant de zones exposées ou non. Par contre, en considérant uniquement les métastases cutanées, on retrouve une expression plus forte de MAGE-3 dans les lésions situées en zones non exposées ($p<0.05$). Nous nous sommes interrogés sur le caractère éventuellement perturbant de la localisation « jambe ». Mais aucune différence significative d'expression des gènes (et notamment de MAGE-3) n'est retrouvée que l'on exclue les localisations « jambes » ou que l'on compare la localisation aux jambes en fonction du sexe. Ceci rend l'interprétation de ce résultat difficile. On ne retrouve pas dans la littérature, d'analyse étudiant l'impact des UV sur l'expression génique ou antigénique dans le mélanome. Pourtant ce résultat est intéressant d'un point de vue physiopathologique, suggérant une éventuelle inhibition de l'expression de MAGE-3 par les UV. Des études portant sur l'influence de la photo exposition sur l'expression de certains gènes ont été réalisées dans des lésions cutanées (tumorales ou non

---

[12] Barrow C, Browning J, Macgregor D et al. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. Clin Cancer Res. 2006 1;12(3Pt 1): 673-8.

[13] Trefzer U, Hofmann M, Reinke S. Concordant loss of melanoma differentiation antigens in synchronous and asynchronous melanoma metastases: implications for immunotherapy. Melanoma Res. 2006; 16(2) : 137-45.

[14] Enk CD, Lotem M, Gimon Z. Molecular detection of MART1, tyrosinase and MIA in peripheral blood, lymph nodes and metastatic sites of stage III/IV melanoma patients.
Melanoma Res. 2004; 14(5):361-5.

tumorales). Ainsi, Sathyanarayana UG *et al.*[15] ont comparé l'index de méthylation de différents gènes (gènes suppresseurs de tumeurs, cadhérine, laminine) de lésions cutanées exposées et non exposées. Il apparaît une méthylation significativement supérieure des gènes sur les prélèvements en zone exposée versus zone non-exposée. En se reportant aux facteurs de régulation de l'expression de MAGE[16,17], le caractère hyperméthylé des promoteurs diminuerait ainsi l'expression des gènes MAGE. Une hypothèse est que la diminution d'expression de MAGE en zone exposée pourrait être liée à une hyperméthylation des promoteurs UV-induite. Étant donné le caractère limité du nombre de prélèvements, cette étude doit être confirmée sur des effectifs plus grands de métastases cutanées « exposé » versus « non exposé ».

L'expression des différents gènes n'est pas dépendante de l'organe où se développent les cellules tumorales, ce qui laisse supposer que l'environnement a peu d'influence sur l'activation des gènes de tumeur. Néanmoins, nous n'avons pas étudié pour un patient donné, si l'expression des gènes variait dans le temps, notamment entre tumeur primitive et lésion métastatique. D'un point de vue thérapeutique, l'homogénéité d'expression des gènes de tumeur quel que soit le tissu prélevé devrait avoir un impact important en termes d'immunothérapie. Or, les données de la littérature sur ce point sont discordantes. En effet, concernant l'expression génique, Enk *et al.*[18] retrouvent sur des prélèvements issus de 17 patients (cellules circulantes, ganglion, tissu métastatique analysés par RT-PCR pour les gènes MIA, MART1 et Tyrosinase) une expression homogène des différents gènes de mélanome sur les différents sites pour un même patient, avec néanmoins une différence dans l'intensité d'expression suivant le siège du prélèvement, sans toutefois pouvoir dégager une règle d'affinité d'un marqueur pour un ou des tissus donnés. Sarantou *et al.*[19]retrouvent également une homogénéité du profil d'expression génique dans les divers prélèvements métastatiques analysés : les gènes étudiés (Tyrosinase, Tyrosinase related protein 1 et 2, Pmel 17 et MART1/Melan-A) sont tous exprimés dans 74% des tissus métastatiques. En revanche,

[15] Sathyanarayana UG, Moore AY, Padar A, Majmudar K et al. Sun exposure related methylation in malignant and non-malignant skin lesions. Cancer Lett. 2006; (Epub ahead of print).
[16] Wischnewski F, Pantel K, Schwarzenbach H. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1,-A2,-A3 and –A12 in human cancer cells. Mol Cancer Res. 2006;4(5):339-49.
[17] Signalotti L, Coral S, Nardi G, Spessotto A et al. Promoter methylation controls the expression of MAGE2,3 and 4 genes in human cutaneous melanoma. J Immunother. 2002; 25(1): 16-26.
[18] Enk CD, Lotem M, Gimon Z, Hochberg M. Molecular detection of MART1, tyrosinase and MIA in peripheral blood, lymph nodes and metastatic sites of stage III/IV melanoma patients. Melanoma Res. 2004; 14(5):361-5.
[19] Sarantou T. Melanoma associated antigens as messenger RNA detection markers for melanoma. Cancer Res. 1997 ;57 : 1371-76.

au niveau protéique, Trefzer *et al.*[20] concluent à une hétérogénéité d'expression antigénique. En effet, leur analyse qui porte sur l'expression des antigènes MAGE, Tyrosinase, MART1 et gp100 par immunohistochimie de 191 métastases de mélanome (synchrones ou asynchrones), retrouve une hétérogénéité d'expression dans 10 à 39 % des métastases synchrones chez un sujet donné, en ce qui concerne les antigènes de différentiation. Ils ne retrouvent une expression de tous les antigènes étudiés que chez 14.1 % des prélèvements. De plus, l'analyse immunohistochimique révélait une fixation moyenne des antigènes sur environ 50-60% des cellules d'une même lésion, et l'analyse des métastases synchrones montrait une hétérogénéité d'expression dans 10 à 40% des cas

Il serait donc intéressant de réaliser ce type d'étude en comparant pour un patient donné l'expression génique au niveau de la tumeur primitive et des localisations secondaires successives afin de réellement documenter l'existence d'une perte d'expression génique.

Si l'on prend l'ensemble des 202 prélèvements, notre étude ne montre aucune corrélation entre l'expression par les cellules tumorales de certains gènes et la survie sans rechute ou la survie globale. Par contre, si on considère les prélèvements correspondants au stade III de la classification AJCC 6 (nodule en transit + ganglions) soit 77 prélèvements, une expression forte des gènes embryonnaires (MAGE-1 et MAGE-3 et NY-ESO1) est associée à une SSR significativement supérieure (p=0.0021) Cette différence significative est retrouvée avec Mage-3 seul (p=0.0319).

Par contre, nos résultats ne mettent pas en évidence de relation significative entre niveau d'expression des gènes de différentiation et survie sans rechute. Les données sur ce point sont rares et hétérogènes. Takeuchi *et al.*[21] ont émis l'hypothèse que le niveau d'expression génique des antigènes de différentiation était un facteur prédictif de la survie. Ils ont étudié par RT-PCR le niveau d'expression des RNAm de Tyrosinase, Tyrosinase-related protein2 (TRP-2) et MART1 sur des prélèvements de 35 patients de stade IV. La SG était significativement plus basse lorsque l'expression des RNAm de Tyrosinase et de TRP-2 était basse. Il existait une tendance similaire, sans toutefois être significative, avec MART-1. Jäger

---

[20] Trefzer U, Hofmann M, Reinke S. Concordant loss of melanoma differentiation antigens in synchronous and asynchronous melanoma metastases: implications for immunotherapy. Melanoma Res. 2006; 16(2) : 137-45.

[21] Takeuchi H, Kuo C, Morton D.L, Wang H-J et al. Expression of differentiation Melanoma –associated Antigen Genes is associated with favorable disease outcome in advanced-stage melanomas. Cancer Research 63, 441-448, 2003

et al.[22] ont étudié l'expression des gènes Melan-A/ MART-1 par RT-PCR chez 20 patients de stade IV . L'analyse de biopsies répétées des lésions métastatiques montrait une perte d'expression génique de MelanA/MART-1 dans 4 prélèvements sur 5. Ces deux dernières études tendent donc à conclure que la progression tumorale peut être associée à une perte d'expression génique, concernant les gènes de différentiation. Toutefois, les effectifs de ces études sont modestes (n=35et n=20), et la seconde étude n'évalue pas la relation expression antigénique/survie.

A l'opposé, De Vries[23] *et al.* ont étudié par immunohistochimie l'expression d'antigènes de différentiation (MART-1, tyrosinase, gp100) au sein de 86 localisations métastatiques et 44 primitifs sans trouver de modification du pattern d'expression, concluant à une relation faible entre la modification d'expression des antigènes de mélanome et la progression tumorale.

Concernant les gènes embryonnaires, dans notre étude, une expression transcriptionnelle forte de Mage-3 est corrélée à une SSR significativement supérieure pour les prélèvements de stade III au moment du prélèvement (n=77), résultat corroboré avec celui observé pour les prélèvements de stade III lorsqu'on considère l'expression globale des gènes embryonnaires. On ne retrouve pas d'études portant directement sur l'analyse de la relation entre expression des antigènes embryonnaires au niveau transcriptionnel et protidique et survie sans rechute. En revanche, plusieurs études rapportent de façon descriptive l'expression ou non des antigènes embryonnaires au sein de prélèvements de mélanome. Barrow *et al.* [24] ont étudié par immunohistochimie l'expression antigénique (MAGE-A1, A4et Ny-ESO-1) au sein de tumeurs primitives et de métastases de mélanome. Ils constatent une fréquence d'expression supérieure de MAGE-A1 et A4 au sein des prélèvements métastatiques, concluant à une possible signification pronostique de ces antigènes. De même, Velasquez *et al.*[25] analysent par immunohistochimie l'expression de Ny-ESO-1 parmi des biopsies de tumeurs primitives et

---

[22] Jager E, Ringhoffer M et al. Immunoselection in vivo: independent loss of CMH class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. Int J Cancer, 71: 142-147, 1997.

[23]De Vries JJ, Smeets M, de Graaf R *et al.* Expression of gp100, MART-1, tyrosinase, and S100 in paraffin-embedded primary melanomas and locoregional, lymph node, and visceral metastases: implications for diagnosis and immunotherapy. A study conducted by the EORTC Melanoma Cooperative Group. J Pathol. 2001 Jan; 193(1):13-20.

[24] Barrow C, Browning J, Macgregor D *et al.* Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage.Clin Cancer Res. 2006 1;12(3Pt 1): 673-8.

[25] Velasquez EF, Jungblut AA, Yancovitz M, Gnjatic S *et al.* Expression of the cancer/testis antigen NY-ESO-1 in primary and metastatic malignant melanoma (MM)—correlation with prognostic factors. Cancer Immun. 2007 ; 12:7-11.

métastatiques. Ils constatent de façon significative une expression supérieure de Ny-ESO-1 dans les prélèvements métastatiques sans pouvoir toutefois dégager de relation significative entre cette expression antigénique et la SG. Ainsi, si les travaux antérieurs ont retrouvé une expression plus importante des antigènes embryonnaires aux stades avancés, MAGE-3 n'a pas été étudié dans ces travaux, et d'autre part, ces études n'ont pas évalué non plus la relation entre expression antigénique (au niveau transcriptionnel ou protéique) et données de survie.

Nos résultats toutefois, ne tiennent pas compte des traitements antérieurs aux prélèvements ou lors des prélèvements qui auraient pu modifier l'expression des gènes. De plus, pour certains sous groupes comme les stades I et II (n = 5), le petit effectif limite la valeur des résultats. Par ailleurs, nous avons étudié l'expression des gènes au niveau transcriptionnel, il serait intéressant dans une autre étude, d'évaluer parallèlement à l'expression transcriptionnelle des gènes celles des protéines correspondantes qui interviennent directement dans l'activation des lymphocytes T cytotoxiques.

CONCLUSION

Ainsi, notre travail montre que dans les mélanomes de stade III, une expression forte isolée de MAGE-3 au niveau transcriptionnel ou associée à une expression forte des autres antigènes embryonnaires, est un facteur de bon pronostic avec une survie sans rechute augmentée. Toutefois, la valeur pronostique de ces gènes est limitée à ce sous groupe de patients dans notre étude. Dans le futur, il serait intéressant de comparer l'expression transcriptionnelle et protidique de ces mêmes gènes de mélanome et de voir si la même corrélation existe sur la survie sans rechute et la survie globale.

.

<u>Tableau I</u> : Intensité d'expression transcriptionnelle des gènes en fonction du sexe et de l'âge

Effectifs (pourcentage par rapport au sous-effectif évalué (femmes ou hommes)*)*

	FEMMES N = 114			HOMMES N= 88			Test du Chi-2	[0-55] ans n=66	[56-70] ans n=61	>70 ans n=75	ANOVA
	0%	]0-50%]	]50-100%]	0%	]0-50%]	]50-100%]	p-value				p-value
Melan A (43 vm)	12 (13.0)	19 (20.7)	61 (66.3)	13 (19.4)	14 (20.9)	40 (59.7)	*0.53*	(9)* 73.3	(17) 59.1	(17) 77.1	0.07
Tyrosinase (44 vm)	12 (13.3)	16 (17.8)	62 (68.9)	12 (17.7)	12 (17.7)	44 (64.7)	*0.74*	(11) 79.1	(17) 59.8	(16) 75.6	0.04**
Mage 1 (33 vm)	60 (62.5)	20 (20.8)	16 (16.7)	51 (69.9)	13 (17.8)	9 (12.3)	*0.58*	(11) 22.3	(8) 16.6	(14) 22.5	0.61
Mage 3 (20 vm)	44 (42.7)	34 (33.0)	25 (24.3)	41 (51.9)	24 (30.4)	14 (17.7)	*0.40*	(8) 30.9	(4) 33.6	(8) 34.2	0.88
NY SO1 (130 vm)	25 (65.8)	4 (10.5)	9 (23.7)	26 (76.5)	3 (8.8)	5 (14.7)	*0.58*	(40) 22.5	(43) 13.1	(47) 28.6	0.44
NA 17 (45 vm)	15 (16.7)	24 (26.7)	51 (56.7)	13 (19.4)	26 (38.8)	28 (41.8)	*0.16*	(11) 61.2	(17) 55.5	(17) 61.0	0.76

**(Nombre de valeurs manquantes) moyenne.*

***p<0.05, mais l'absence de linéarité dans l'intensité d'expression de tyrosinase selon les classes d'âge amène à conclure que ce résultat est fortuit*

<u>Figure 1: Nature des prélèvements tumoraux étudiés</u>

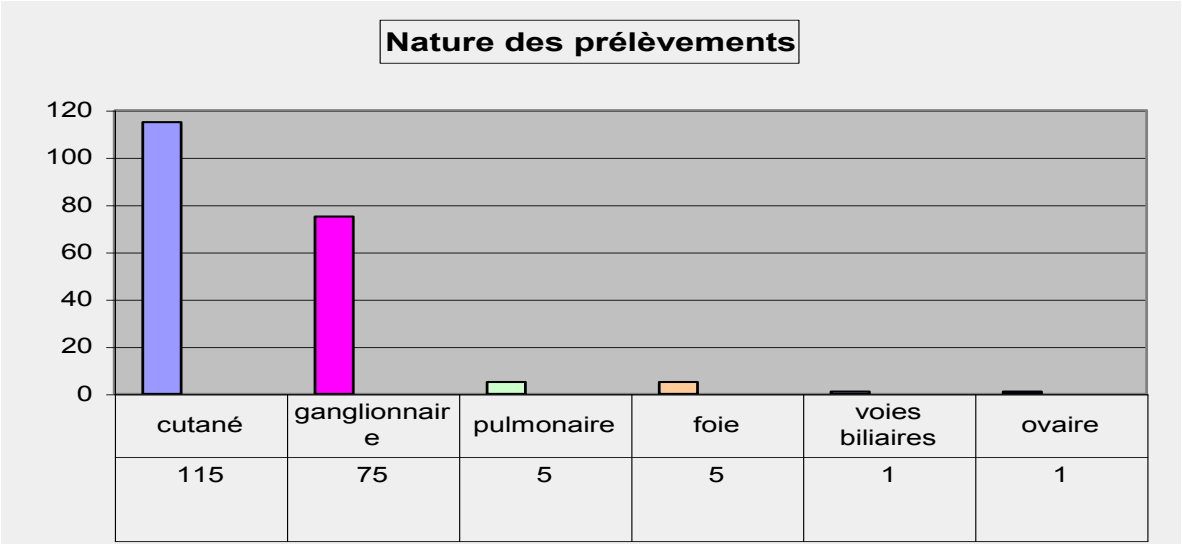
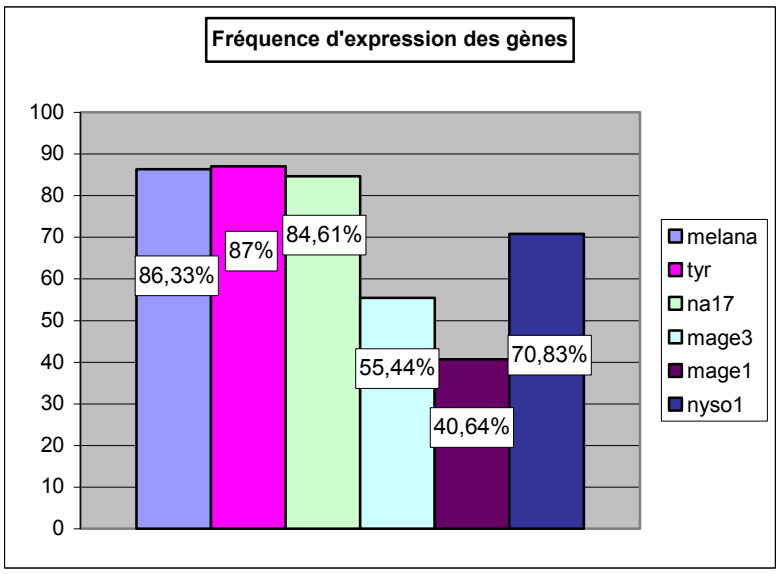


Figure 2 : Fréquence globale d'expression des gènes tous prélèvements confondus



<u>Tableau IIa</u> : Pourcentage d'expression des gènes par rapport au nombre de gènes étudiés en fonction du stade.

Le pourcentage est calculé de la façon suivante : (n exprimés *100 / n évalués). n=190 – effectif (pourcentage)

	≤ 50 %	>50 %	Test du Chi-2 p-value
IIIB CUTANE	17 (47.22%)	19 (52.78%)	
IIIB GG	21 (43.75%)	27 (56.25%)	*0.9209*
IV GG	12 (46.15%)	14 (53.85%)	
IV CUTANE	28 (41.18%)	40 (58.82%)	
IV VISCERAL	4 (33.33%)	8 (66.67%)	

<u>Tableau II b</u> Intensité d'expression des gènes en fonction du site de prélèvement – (nombre de valeurs manquantes) moyenne d'expression génique pour le type de prélèvement considéré

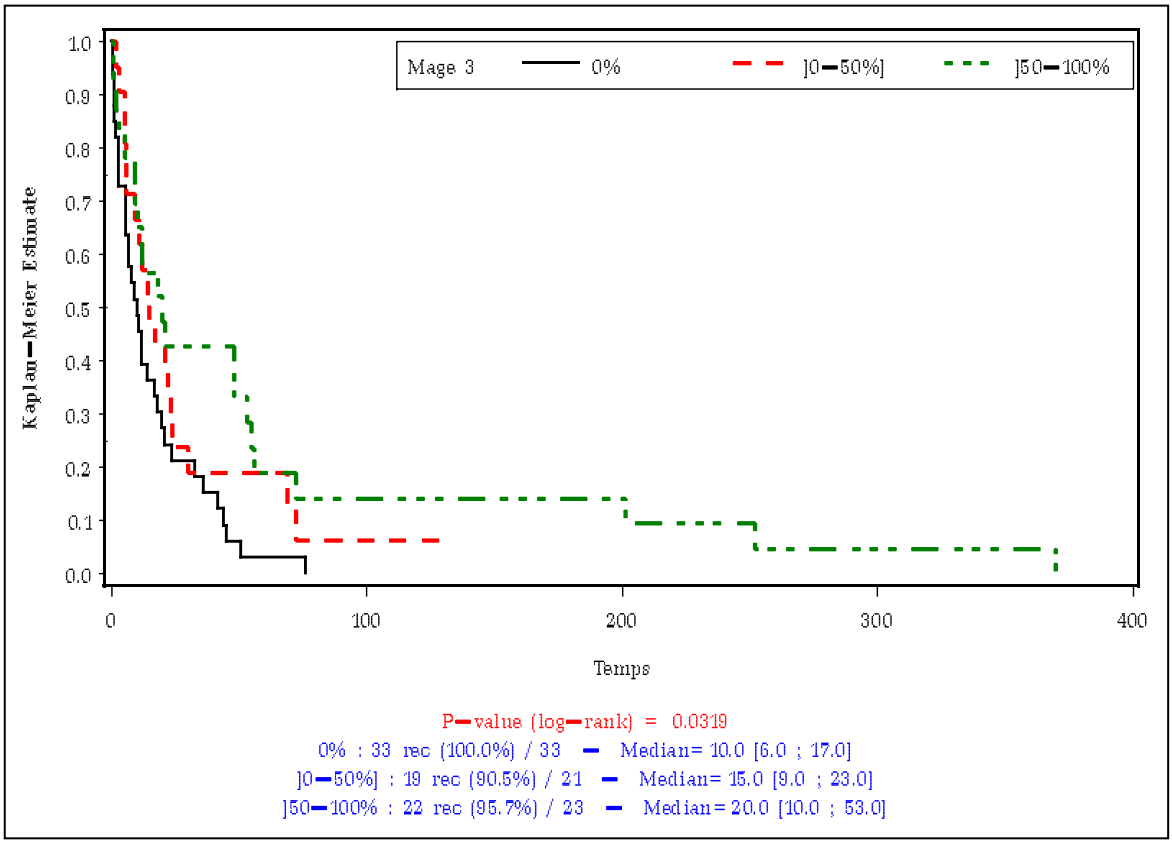
	CUTANE N=116		GG N=74		FOIE N=5		POUMON N=5		Test de Kruskal-Wallis p-value
Melan a	(25)	68.8	(17)	73.5	(1)	75.0	(0)	90.0	*0.6897*
Tyrosinase	(26)	70.0	(17)	74.5	(1)	75.0	(0)	100.0	*0.3380*
Mage 1	(17)	19.1	(12)	23.1	(1)	31.3	(2)	8.3	*0.9082*
Mage 3	(11)	29.8	(6)	39.2	(1)	25.0	(1)	25.0	*0.4380*
NYSO1	(72)	23.0	(49)	24.4	(4)	0.0	(3)	0.0	*0.7384*
Na17	(26)	58.6	(18)	58.4	(1)	75.0	(0)	80.0	*0.6728*

<u>Tableau III</u> : Intensité d'expression des gènes de tumeur en fonction de caractère exposé ou non de la métastase cutanée.

(Nombre de valeurs manquantes)/ Moyenne d'intensité d'expression

	Exposé N=8		Non exposé N=61		Test de Wilcoxon p-value
Melan a	(2)	91.7	(15)	73.4	*0.3145*
Tyrosinase	(2)	100.0	(15)	73.3	*0.1017*
Mage 1	(1)	10.7	(9)	20.2	*0.6069*
Mage 3	(0)	6.9	(6)	33.6	*0.0399*
NYSO1	(4)	0.0	(39)	28.9	*0.1535*
Na17	(2)	54.2	(14)	61.8	*0.7979*

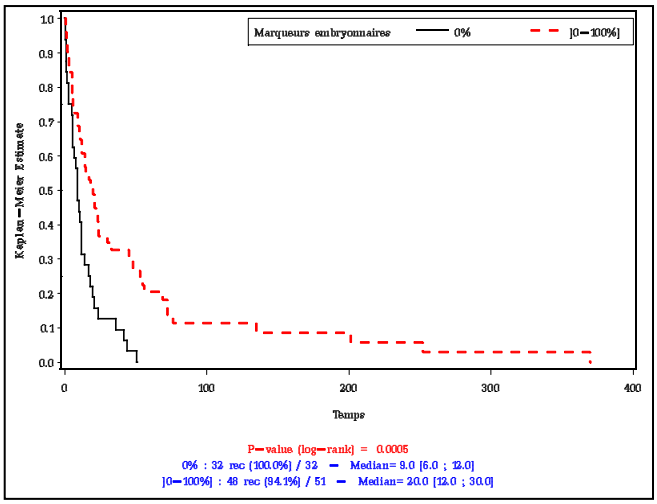
Figure 3 **Courbe de survie dans récidive selon l'intensité d'expression de MAGE-3 pour les prélèvements de stade III**



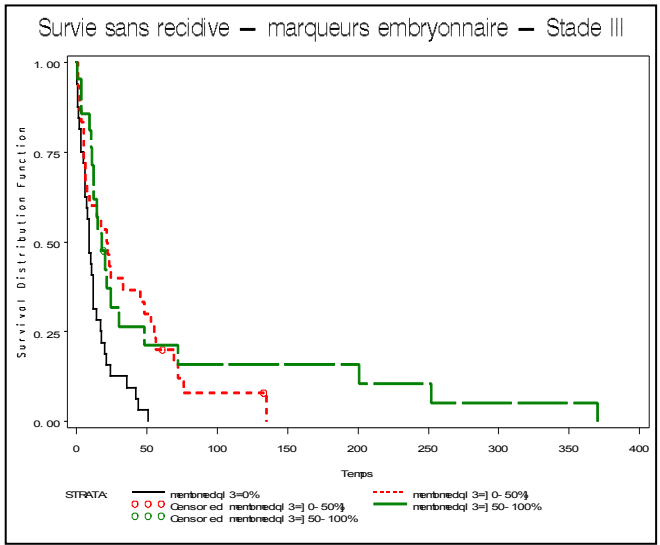
<u>Tableau IV:</u> Comparaisons des courbes de survie sans récidive en fonction de l'intensité d'expression des gènes embryonnaires

Expression génique	Effectif	Nb récidive	Médiane survie (mois)	Test Log-rank	Expression génique	Effectif	Nb récidive	Médiane survie (mois)	Test Log-rank
0%	32	32	9	P=0.0021	0%	32	32	9	P=0.0005
]0-50%]	30	28	21.5		]0-100%]	51	48	20	
]50-100%]	21	20	18						

<u>Figure 4</u>: Courbe de survie sans récidive selon l'intensité d'expression des gènes embryonnaires pour les prélèvements de stade III



<u>Figure 4a</u> : Courbes de survie sans récidive selon trois classes d'intensité d' expression des gènes : 0,]0-50] et]50-100].



<u>Figure 4b</u>: Courbes de survie selon deux classes d'expression des gènes : 0 et]0-100]

IV Limites de l'étude et perspectives

A- Considérations techniques

La fiabilité de la méthode conventionnelle de RT-PCR, utilisée ici, a été remise en cause dans de nombreux travaux[92155156157158159160], du fait des grandes variations dans les résultats d'une étude à l'autre. Les problèmes pouvant se situer au niveau du traitement de l'échantillon, de l'extraction de l'ARN, ou de l'amplification PCR. De ce fait, des études de contrôle qualité ont été réalisées.

Une étude multicentrique a été réalisée à l'initiative de l'EORTC[161] comparant des RTPCR sur sang total, sur cellules mononucléées périphériques et une seconde étude par le Dermatologic Cooperative Oncology Group[162]. Ces deux études rapportaient comme cause principale des disparités entre études la grande hétérogénéité dans la qualité de l'ADN issu des échantillons.

La qualité de l'échantillon et son contrôle seraient donc les points principaux conditionnant de la sensibilité de la méthode. Keilholz[163] *et al* dans une étude évaluant par RT-PCR quantitative l'expression sérique des antigènes de mélanome, concluaient que la RT-PCR quantitative fournissait l'avantage d'un contrôle qualité meilleur (évaluation quantitative des antigènes de mélanome et du contrôle interne), cependant, les corrélations résultats de RT-PCR/ caractéristiques cliniques étaient les mêmes avec RT-PCR quantitative et semi-quantitative.

Ainsi, la RT-PCR conventionnelle évalue les résultats de l'amplification de façon visuelle (Cf. Figure7) par rapport à un contrôle positif et négatif, et non de façon quantitative en nombres de copies calculé automatiquement.

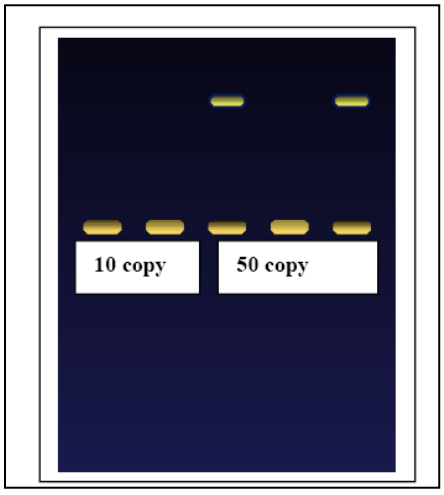


Figure 7 : Migration sur gel d'agarose de deux échantillons de 10 et 50 copies. Il est difficile visuellement de différencier un nombre de copies différant d'un facteur 5.
Extraite de :
http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf

D'autre part, la RT-PCR conventionnelle est une « end-point » PCR, évaluant les transcrits à la fin de la PCR. Or, à cette phase de plateau les résultats peuvent ne pas refléter les données exactes des transcrits (ADN déjà dégradés, réactifs consommés) comme cela l'est dans la RT-PCR quantitative qui évalue en temps réel, lors de la phase exponentielle. (Cf. Figure 8)

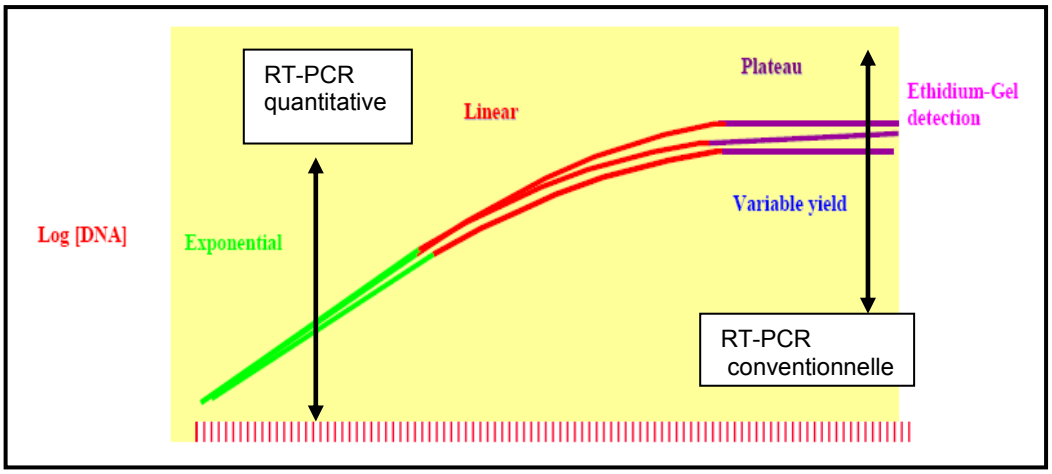


Figure8:
Courbes représentant l'évolution des transcrits lors d'une PCR . On constate que pour une même quantité de transcrits initialement, lors de la phase exponentielle, apparaissent des divergences (dégradation de l'ARN, consommation des réactifs). De ce fait, l'analyse à la phase de plateau peut mettre en évidence des divergences plus ou moins pertinentes.

B- Choix méthodologiques

L'étude de la relation entre expression antigénique et SSR et SG a été conçue sur l'interrogation suivante : Quel est l'impact de l'expression antigénique au moment d'une progression tumorale, d'une récidive sur la survie ultérieure ? De ce fait, le stade considéré était celui constaté au moment de la récidive, de la réalisation de la RT-PCR, et la survie était calculée à partir de là. Cependant, étudier l'impact de l'expression antigénique comparativement aux autres facteurs de risque reconnus serait informatif. Cela nécessiterait

de reconsidérer l'ensemble des données des patients en les intégrant dans un modèle statistique plus élaboré, la survie serait alors calculée à partir du moment du diagnostic du mélanome.

Nous avons considéré, du fait de la conception expliquée ci-dessus, un seul prélèvement par patient. L'étude de plusieurs prélèvements pour un même patient permettrait de répondre à d'autres questions : l'étude de l'expression antigénique chez un individu est-elle représentative ? De quelle façon évolue-t'elle ? Existe t'il une modification antigénique avec la progression tumorale ? S'agit-t'il d'une perte d'expression antigénique, comme cela a précédemment été rapporté[164 165]?

Enfin, l'étude a évalué l'expression antigénique au niveau transcriptionnel, or, comme l'ont constaté Chen[166] *et al*., si la régulation des antigènes semble principalement se faire au niveau transcriptionnel, il peut exister quelques variations au niveau traductionnel. L'étude de l'expression antigénique « directe », au niveau protéique pourrait conclure à des résultats sensiblement différents, et serait donc instructive.

Conclusion

De façon globale cette étude ne retrouve pas de relation significative entre expression antigénique et survie (globale et sans récidive), ni entre expression antigénique et caractéristiques cliniques. Toutefois, lorsqu'on considère un sous-groupe donné, en l'occurrence le stade III, l'expression de MAGE-3 et des antigènes embryonnaires est significativement reliée à la survie sans récidive. De même, pour les patients présentant une métastase cutanée, l'expression de MAGE-3 semble pouvoir être modifiée par la photo exposition. Ces résultats sont à considérer avec les limites précédemment discutées. Enfin, les données retrouvées pour des sous-groupes définis appellent à être approfondies par d'autres travaux, notamment avec l'analyse de l'expression antigénique sur des prélèvements itératifs, et enfin avec l'analyse de l'expression antigénique au niveau protéique.

TABLE DES MATIERES

Sommaire 2
Introduction 4

I. **Données actuelles sur les facteurs pronostics dans le mélanome** 5

A- Facteurs pronostiques cliniques et histopathologiques selon le stade 5
1. Au stade de mélanome primitif (*ou catégorie T de la classification TNM ; stades I et II AJCC6)* 5
a. L'épaisseur du mélanome 5
b. L'ulcération 7
c. Autres facteurs pronostiques 8
2. Au stade de localisation ganglionnaire (*ou catégorie N de la classification TNM ; stade III AJCC6)* 9
a. Le nombre de ganglions métastatiques 9
b. La masse tumorale ganglionnaire 10
c. L'effraction capsulaire 11
d. L'ulcération du mélanome primitif 11
3. Au stade métastatique (*ou catégorie M de la classification TNM ; stade IV AJCC6)* 12
a. Le site viscéral vs non-viscéral 12
b. Autres facteurs 12

B- Facteurs pronostiques sériques et tissulaires 12
1. Facteurs sériques 12
a. Lactate déshidrogénase (LDH) 12
b. Protéine S100 et Melanoma Inhibiting Activity (MIA) 13
c. Facteurs angiogéniques 13
2. Facteurs tissulaires 14
a. Molécules d'adhésion 14
b. Cytokines immunomodulatrices 14

C- Détection de cellules tumorales circulantes 15

D- Valeur pronostique du ganglion sentinelle 17
1. Ganglion sentinelle et survie sans récidive 17
2. Ganglion sentinelle et survie globale 20
3. Valeur de la RT-PCR au niveau du ganglion sentinelle 20

II. Les antigènes de tumeur associés au mélanome 24

A- Historique de la découverte des antigènes de tumeur du mélanome 24

B- Les antigènes de différentiation 25
1. Tyrosinase 25
2. MelanA/MART-1 26
3. Autres antigènes 26

C- Les antigènes de tumeurs 27
1. Les cancers-testis antigènes 27
a. Mage 1 et 3. 27
b. Ny-ESO-1 28
2. NA-17 28

D- Valeur pronostique de l'expression des antigènes de tumeur au niveau de métastases de mélanome. 29

III Etude rétrospective de l'expression des gènes de mélanome et profil clinique 31
INTRODUCTION 31
MATERIEL ET METHODES 32
RESULTATS 35
DISCUSSION 38
CONCLUSION 43

IV Limites de l'étude et perspectives 50

A- Considérations techniques 50

B- Choix méthodologiques 51

Conclusion 53

REFERENCES

[1] .Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N *et al.*: Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. J Clin Oncol. 2001; 19: 3622-3634.

[2] Breslow A. Thickness, cross-sectionnal areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann. Surg 1970; 172: 902-908.

[3] Balch CM, Murad TM, Soong SJ, Ingalls AL, Halpern NB, Maddox WA. A multifactorial analysis of melanoma: Prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods. Ann Surg 1978; 188: 732-742.

[4] Balch CM, Soong SJ, Murad TM, Ingalls AL, Maddox WA. A multifactorial analysis of melanoma: II. Prognostic factors in patients with stage I (localized) melanoma. Surgery 1979; 86: 343-351.

[5] Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, *et al.* Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients.Cancer 1995;75(10): 2484-91.

[6] Van Der Esch EP, Cascinelli N, Preda F, Morabito A, Bufalino R. Stage I melanoma of the skin: Evaluation of prognosis according to histologic characteristics. Cancer 1981; 48: 1668-1673.

[7] ClarkW.H, From L., Beranrdino E.A. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Cancer Res. 1969; 29: 705-726.

8 Büttner P, Garbe C, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H *et al*. Primary cutaneous melanoma: Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. Cancer 1995; 75: 2499-2506.

9 Månsson-Brahme E, Carstensen J, Erhardt K, Lagerlöf B, Ringborg U, Rutqvist LE. Prognostic factors in thin cutaneous malignant melanoma. Cancer 1994; 73: 2324-2332.

10 Marghoob AA, Koenig K, Bittencourt FV, Kopf AW, Bart RS. Breslow thickness and Clark level in melanoma: Support for including level in pathology reports and in AJCC staging. Cancer 2000; 88: 589-595.

11 Morton DL, Davtyan DG, Wanek LA, Foshag LJ, Cochran AJ. Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by Clark level and Breslow thickness. Cancer 1993;71: 3737-3743.

12 Finley JW, Gibbs JF, Rodriguez LM, Letourneau R, Driscoll D, Kraybill W. Pathologic and clinical features influencing outcome of thin cutaneous melanoma: Correlation with newly proposed staging system. Am Surg 2000; 66: 527-531; discussion 531-532.

13 Salman SM, Rogers GS. Prognostic factors in thin cutaneous malignant melanoma. J Dermatol Surg Oncol 1990;16: 413-418.

[14] Sahin S, Rao B, Kopf AW, Lee E, Rigel DS, Nossa R *et al.* Predicting ten-year survival of patients with primary cutaneous melanoma: corroboration of a prognostic model. Cancer 1997; 80: 1426-1431.

[15] Shaw HM, Balch CM, Soong SJ, Milton GW, McCarthy WH. Prognostic histopathologic factors in malignant melanoma. Pathology 1985; 17: 271-274.

[16] Soong SJ, Harrison RA, McCarthy WH, Urist MM, Balch CM. Factors affecting survival following local, regional, or distant recurrence from localized melanoma. J Surg Oncol 1998; 67: 228-233.

[17] Urist MM, Balch CM, Soong SJ, Milton GW, Shaw HM, McGovern VJ *et al.* Head and neck melanoma in 534 clinical stage I patients: A prognostic factors analysis and results of surgical treatment. Ann Surg 1984; 200: 769-775.

[18] Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, Lee JE, Colome MI, Tseng CH *et al.* Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: The prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. J Clin Oncol 1999;17: 976-983.

[19] Häffner AC, Garbe C, Burg G, Büttner P, Orfanos CE, Rassner G. The prognosis of primary and metastasising melanoma: An evaluation of the TNM classification in 2,495 patients. Br J Cancer 1992; 66: 856-861.

[20] Haddad FF, Stall A, Messina J, Brobeil A, Ramnath E, Glass LF, Cruse CW, Berman CG, Reintgen DS. The progression of melanoma nodal metastasis is dependent on tumor thickness of the primary lesion. Ann Surg Oncol 1999;6: 144-149.

[21] Day CL Jr, Mihm MC Jr, Lew RA, Harris MN, Kopf AW, Fitzpatrick TB *et al*. Prognostic factors for patients with clinical stage I melanoma of intermediate thickness (1.51-3.39mm): A conceptual model for tumor growth and metastasis. Ann Surg 1982;195: 35-43.

[22] Kuehnl-Petzoldt C, Wiebelt H, Berger H. Prognostic groups of patients with stage I melanoma. Arch Dermatol 1983;119: 816-819.

[23] Cascinelli N, Marubini E, Morabito A, Bufalino R. Prognostic factors for stage I melanoma of the skin: A review. Stat Med 1985 ;4: 265-278.

[24] Meyskens FL Jr, Berdeaux DH, Parks B, Tong T, Loescher L, Moon TE. Cutaneous malignant melanoma (Arizona Cancer Center experience): I. Natural history and prognostic factors influencing survival in patients with stage I disease. Cancer 1988; 62: 1207-1214.

[25] McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW, Farago GA. Prognostic significance of the histological features of malignant melanoma. Histopathology 1979; 3: 385-393.

[26] Wagner JD, Gordon MS, Chuang TY, Coleman JJ 3rd, Hayes JT, Jung SH *et al.* Predicting sentinel and residual lymph node basin disease after sentinel lymph node biopsy for melanoma. Cancer 2000; 89: 453-462.

[27] Straume O, Akslen LA. Independent prognostic importance of vascular invasion in nodular melanomas. Cancer 1996; 78: 1211-1219.

[28] Balch CM, Soong S, Ross MI, Urist MM, Karakousis CP, Temple WJ, Mihm MC *et al.* Long-term results of a multi-institutional randomized trial comparing prognostic factors and surgical results for intermediate thickness melanomas (1.0 to 4.0 mm). Ann Surg Oncol 2000; 7: 87-97.

[29] Lock-Andersen J, Hou-Jensen K, Hansen JP, Jensen NK, Søgaard H, Andersen PK. Observer variation in histological classification of cutaneous malignant melanoma. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 1995 ; 29: 141-148.

[30] Corona R, Mele A, Amini M, De Rosa G, Coppola G, Piccardi P, *et al.* Interobserver variability on the histopathologic diagnosis of cutaneous melanoma and other pigmented skin lesions. J Clin Oncol 1996 ; 14: 1218-1223.

[31] Ostmeier H, Fuchs B, Otto F, Mawick R, Lippold A, Krieg V *et al.* Can immunohistochemical markers and mitotic rate improve prognostic precision in patients with primary melanoma? Cancer 1999 ; 85: 2391-2399.

[32] Averbook BJ, Russo LJ, Mansour EG. A long-term analysis of 620 patients with malignant melanoma at a major referral center. Surgery 124: 746-756, 1998

33 Balch CM, Soong SJ, Bartolucci AA, Urist MM, Karakousis CP, Smith TJ *et al.* Efficacy of an elective regional lymph node dissection of 1- to 4-mm thick melanomas for patients 60 years of age and younger. Ann Surg 1996; 224: 255-263; discussion 263-266.

34 Austin PF, Cruse CW, Lyman G, Schroer K, Glass F, Reintgen DS. Age as a prognostic factor in the malignant melanoma population. Ann Surg Oncol 1994; 1: 487-494.

35 Cohen HJ, Cox E, Manton K, Woodbury M. Malignant melanoma in the elderly. J Clin Oncol 1987; 5: 100-106.

36 Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, Noyes RD, Goydos JS, Beitsch PD *et al.* Gender-related differences in outcome for melanoma patients. Ann Surg. 2006; 243(5):693-8; discussion 698-700.

[37] Balch CM, Soong SJ, Murad TM, Ingalls AL, Maddox WA.. A multifactorial analysis of melanoma: III. Prognostic factors in melanoma patients with lymph node metastases (stage II). Ann Surg 1981 ; 193: 377-388.

[38] Balch CM. Cutaneous melanoma: Prognosis and treatment results worldwide. Semin Surg Oncol 1992 ; 8: 400-414.

[39] Buzaid AC, Tinoco LA, Jendiroba D, Tu ZN, Lee JJ, Legha SS *et al.* Prognostic value of size of lymph node metastases in patients with cutaneous melanoma. J Clin Oncol 1995 ; 13: 2361-2368.

[40] Calabro A, Singletary SE, Balch CM. Patterns of relapse in 1001 consecutive patients with melanoma nodal metastases. Arch Surg 1989 ; 124: 1051-1055.

[41] Gershenwald JE, Prieto V, Colome-Grimmer MI. The prognostic significance of microscopic tumor burden in 925 melanoma patients undergoing sentinel lymph node biopsy. Proc Am Soc Clin Oncol 2000 ;19: 551a (abstr 2169)

[42] Morton DL, Wanek L, Nizze JA, Elashoff RM, Wong JH. Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes: Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. Ann Surg 1991 ; 214: 491-499; discussion 499-501.

[43]Coit DG, Rogatko A, Brennan MF. Prognostic factors in patients with melanoma metastatic to axillary or inguinal lymph nodes: A multivariate analysis. Ann Surg 1991 ; 214: 627-636

[44] Bevilacqua RG, Coit DG, Rogatko A, Younes RN, Brennan MF. Axillary dissection in melanoma: Prognostic variables in node-positive patients. Ann Surg 1990; 212: 125-131.

[45]Drepper H, Biess B, Hofherr B, Hundeiker M, Lippold A, Otto F. *et al.*The prognosis of patients with stage III melanoma. Cancer 1993; 71: 1239-1246.

[46]Cascinelli N, Vaglini M, Nava M. Prognosis of skin melanoma with regional node metastases (stage II). Surg Oncol 1989; 25: 240-247.

[47] Singletary SE, Shallenberger R, Guinee VF, McBride CM.Melanoma with metastasis to regional axillary or inguinal lymph nodes: prognostic factors and results of surgical treatment in 714 patients. South Med J. 1988 Jan;81(1):5-9.

[48] Calabro A, Singletary SE, Balch CM. Patterns of relapse in 1001 consecutive patients with melanoma nodal metastases. Arch Surg. 1989 Sep;124(9):1051-5.

[49] Nathansohn N**,** Schachter J**,** Gutman H**.** Patterns of recurrence in patients with melanoma after radical lymph node dissection**.** Arch. Surg. 2005 Dec; 140(12):1172-7.

[50] Rutkowski P, Nowecki ZI, Nasierowska-Guttmejer A, Ruka W *et al.* Lymph node status and survival in cutaneous malignant melanoma--sentinel lymph node biopsy impact. J Surg Oncol. 2003 Sep; 29(7): 611-8.

[51] Galliot-Repkat C, Cailliod R, Trost O, Danino A, Collet E, Lambert D, The prognostic impact of the extent of lymph node dissection in patients with stage III melanoma.Eur J Surg Oncol. 2006 Sep; 32(7): 790-4.

[52] Debarbieux S, Duru G, Dalle S, Béatrix O, Balme B, Thomas L.Sentinel lymph node biopsy in melanoma: a micromorphometric study relating to prognosis and completion lymph node dissection. Br J Dermatol. 2007 Jul; 157(1): 58-67.

[53]Pidhorecky I, Lee R.J., Proulx G., Kollmorgen D.R., Jia C., Driscoll D.L. *et al.* Risk Factors for Nodal Recurrence After Lymphadenectomy for Melanoma. Annals of Surgical Oncology 2001 *;* 8: 109-115.

[54]Badgwell B, Xing Y, Gershenwald JE, Lee JE, Mansfield PF, Ross MI *et al.* Pelvic lymph node dissection is beneficial in subsets of patients with node-positive melanoma. Ann Surg Oncol. 2007 Oct;14(10):2867-75.

[55] Meyer T, Merkel S, Göhl J, Hohenberger W.Lymph node dissection for clinically evident lymph node metastases of malignant melanoma. Eur J Surg Oncol. 2002 Jun; 28(4):424-30.

[56] Van Akkooi AC, Bouwhuis MG, van Geel AN, Hoedemaker R, Verhoef C, Grunhagen DJ *et al.* Morbidity and prognosis after therapeutic lymph node dissections for malignant melanoma. Eur J Surg Oncol. 2007; 33(1): 102-8.

[57] Manola J, Atkins M, Ibrahim J, Kirkwood J. Prognostic factors in metastatic melanoma: A pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. J Clin Oncol 2000 ;18: 3782-3793.

[58] Barth A, Wanek LA, Morton DL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. J Am Coll Surg 1995 ; 181: 193-201.

[59] Balch CM, Soong SJ, Murad TM, Smith JW, Maddox WA, Durant JR.. A multifactorial analysis of melanoma: IV. Prognostic factors in 200 melanoma patients with distant metastases (stage III). J Clin Oncol 1983 ; 1: 126-134.

[60] Keilholz U, Scheibenbogen C, Sommer M, Pritsch M, Geuke AM. Prognostic factors for response and survival in patients with metastatic melanoma receiving immunotherapy. Melanoma Res. 1996; 6(2): 173-8.

[61] Brand CU, Ellwanger U, Stroebel W, Meier F, Schlagenhauff B, Rassner G *et al*. Prolonged survival of 2 years or longer for patients with disseminated melanoma. Cancer 1997 ;79: 2345-2353.

[62] Keilholz U, Conradt C, Legha SS, Khayat D, Scheibenbogen C, Thatcher N. *et al.* Results of interleukin-2-based treatment in advanced melanoma: A case record-based analysis of 631 patients. J Clin Oncol 1998 ; 16: 2921-2929.

[63] Presant C.A, Batrolucci A.A. The southern Cancer Study Group. Prognosis factors in malignant melanoma. Cancer 1982; 49: 2192-6.

[64] Ryan L., Kramar A., Borden E. Prognostic factors in metastatic melanoma. Cancer 1993; 71: 2995-3005.

[65] Eton O, Legha SS, Moon TE, Buzaid AC, Papadopoulos NE, Plager C *et al.* Prognostic factors for survival of patients treated systemically for disseminated melanoma. J Clin Oncol 1998 ; 16: 1103-1111.

[66] Deichmann M, Benner A, Bock M, Jäckel A, Uhl K *et al.* S100-beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive AJCC stage IV melanoma. J Clin Oncol 1999 ; 17: 1891-1896.

[67] Franzke A, Probst-Kepper M, Buer J, Duensing S, Hoffmann R, Wittke F *et al.* Elevated pretreatment serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 and lactate dehydrogenase as predictors of survival in cutaneous metastatic malignant melanoma. Br J Cancer 1998 ; 78: 40-45.

[68]Bogdahn U, Apfel R, Hahn M, Gerlach M, Behl C, Hoppe J, *et al.* Autocrine tumor cell growth-inhibiting activities from human malignant melanoma. Cancer Res 1989; 49: 5358-63.

[69] Kaskel P, Berking C, Sander S, Volkenandt M, Peter RU, Krähn G, *et al.* S100 protein in peripheral blood: a maker for melanoma metastases. J Am Acad Dermatol 1999; 41: 962-9.

[70] Schultz ES, Diepgen TL, Von Den Driesch P. Clinical and prognostic relevance of serum S-100B protein in malignant melanoma. Br J Dermatol 1998; 138: 426-30.

[71] Meral R, Duranyildiz D, Tas F, Camlica H, Yasasever V, Kurul S *et al.* Prognostic significance of melanoma inhibiting activity levels in malignant melanoma. Melanoma Res 2001; 11: 627-32.

[72] Garbe C, Leiter U, Ellwanger U, Blaheta HJ, Meier F, Rassner G, *et al.* Diagnostic value and pronostic significance of protein S-100B, melanoma-inhibitory activity, and tyrosinase/MART-1 Reverse transcription polymerase chain reaction in the follow-up of high-risk melanoma patients. Cancer 2003; 97:1737-45.

[73] Smit LH, Korse CM, Hart AA, Bonfrer JM, Haanen JB, Kerst JM, *et al.* Normal value of serum S-100B predict prolonged survival for stage IV melanoma patients. Eur J Cancer 2005; 41: 386-92.

[74] Jury CS, McAllister EJ, McKie RM. Rising levels of serum S100 protein precede other evidence of disease progression in patients with malignant melanoma. Br J Dermatol 2000; 143: 269-74.

[75] Dornier C, Dousset B, Legras B, Barbaud A, Schmutz JL. Protéine S-100B et MIA (*melanoma inhibiting activity*) sériques. Étude prospective de leur valeur comme marqueur de progression du mélanome. Ann DermatolVenereol 2002; 129: 739-40.

[76] Deichmann M, Benner A, Kuner N, Wacker J, Waldmann V, Näher H. Are responses to therapy of metastasized malignant melanoma reflected by decreasing serum values of S100B or melanoma inhibitory activity(MIA)? Melanoma Res 2001; 11: 291-6.

[77] Hamberg AP, Korse CM, Bonfrer JM, Gast GC. Serum S100B is suitable for prediction and monitoring of response to chemoimmunotherapy in metastatic malignant melanoma. Melanoma Res 2003; 13: 45-9.

[78] Loppin M, Quillien V, Adamski H, Ollivier I, Garlantézec R, Chevrant-Breton J. Protein S100 beta and Melanoma Inhibitory Activity (MIA): a prospective study of their clinical value for the early detection of metastasis in malignant melanoma Ann Dermatol Venereol. 2007; 134(6-7): 535-40.

[79] Meurer M, Szeimies R. M. Serummarker des malignen Melanoms. Hautarzt 2005; 56: 173-86.

[80] Vihinen PP, Hilli J, Vuoristo MS, Syrjänen KJ, Kähäri VM, Pyrhönen SO. Serum VEGF-C is associated with metastatic site in patients with malignant melanoma. Acta Oncol 2007; 46(5): 678-84

[81] Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Circulating serum levels of angiogenic factors and vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in melanoma patients. Melanoma Res.2006; 16(5): 405-11

[82] Ugurel S, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. J Clin Oncol 2001; 19(2): 577-83

[83] Kurschat P, Eming S, Nashan D, Krieg T, Mauch C. Early increase in serum levels of the angiogenesis-inhibitor endostatin and of basic fibroblast growth factor in melanoma patients during disease progression. Br J Dermatol 2007; 156(4): 653-8.

[84] Ascierto PA, Leonardi E, Ottaiano A, Napolitano M, Scala S, Castello G. Prognostic value of serum VEGF in melanoma patients: a pilot study. Anticancer Res 2004; 24(6): 4255-8.

[85]Pelletier F, Bermont L, Puzenat E, Blanc D, Cairey-Remonnay S, Mougin C *et al.* Circulating vascular endothelial growth factor in cutaneous malignant melanoma. Br J Dermatol. 2005; 152(4): 685-9.

[86] Hansen NL, Ralfkiaer E, Hou-Jensen K, Thomsen K, Drzewiecki KT, Rothlein R *et al*. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in benign naevi and malignant melanomas Acta Derm Venereol 1991; 71(1): 48-51

[87] Boyano MD, Garcia-Vázquez MD, López-Michelena T, Gardeazabal J, Bilbao J, Cañavate ML *et al.* Soluble interleukin-2 receptor, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 serum levels in patients with melanoma. Br J Cancer 2000; 83(7): 847-52

[88] Nemunaitis J, Fong T, Shabe P, Martineau D, Ando D. Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma Cancer Invest. 2001; 19(3): 239-47

[89] Torisu-Itakura H, Lee JH, Huynh Y, Ye X, Essner R, Morton DL. Monocyte-derived IL-10 expression predicts prognosis of stage IV melanoma patients. J Immunotherapy 2007; 30(8): 831-8.

[90] Quereux G, Pandolfino MC, Knol AC, Khammari A, Volteau C, Nguyen JM, Dreno B. Tissue prognostic markers for adoptive immunotherapy in melanoma. Eur J Dermatol 2007 ; 17(4) : 295-301.

[91] Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C, Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. Lancet 1991; 338: 1227–9.

[92] Mellado B, Gutierrez L, Castel T, Colomer D., Fontanillas M., Castro J *et al.* Prognostic significance of the detection of circulating malignant cells by reverse transcriptase–polymerase chain reaction in long-term clinically disease-free melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 1843-1848.

[93] Brownbridge GG, Gold J, Edward M, *et al.* Evaluation of the use of tyrosinase-specific and melanA/MART-1-specific reverse transcriptase coupled–polymerase chain reaction to detect melanoma cells in peripheral blood samples from 299 patients with malignant melanoma. Br J Dermatol 2001; 144: 279-287.

[94] Ghossein RA, Coit D, Brennan M, Zhang ZF, Wang Y, Bhattacharya S *et al*. Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase messenger RNA in malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 1998; 4: 419-428.

[95] Ranieri JM, Wagner JD, Wiebke EA, Azuaje R, Smith ML, Wenck S *et al.* Lack of prognostic importance of reverse-transcriptase polymerase chain reaction detection of circulating messenger RNA in patients with melanoma. Plast Reconstr Surg. 2005; 115(4): 1058-63.

[96] Kunter U, Buer J, Probst M, Duensing S, Dallmann I, Grosse J, *et al.* Peripheral blood tyrosinase messenger RNA detection and survival in malignant melanoma**.** *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88: 590-594.

[97] Scoggins C.R, Ross M.I,Reintgen D S, Noyes R.D., Goydos J. S.,. Beitsch P D *et al.* Prospective Multi-Institutional Study of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Molecular Staging of Melanoma. J Clin Oncol 2006; 24: 2849-2857.

[98] Voit C, Kron M, Rademaker J, Schwürzer-Voit M, Sterry W, Weber L *et al.* Molecular staging in stage II and III melanoma patients and its effect on long-term survival. J Clin Oncol 2005; 23: 1218–27.

[99] Schmidt H, Sorensen BS, Sjoegren P, Christensen IJ, Fode K, Larsen J *et al.* Circulating tyrosinase and MART-1 mRNA does not independently predict relapse or survival in patients with AJCC stage I-II melanoma. J Invest Dermatol. 2006; 126(4): 849-54.

[100] Glumac N, Snoj M, Hocevar M, Novakovic S. Prognostic significance of tyrosinase mRNA detected by nested RT-PCR in patients with malignant melanoma. Neoplasma. 2006; 53(1): 9-14.

[101] Domingo-Domenech J, Molina R, Castel T, et al. Serum protein S-100 predicts clinical outcome in patients with melanoma treated with adjuvant interferon-comparison with tyrosinase rt-PCR. Oncology 2005; 68: 341–9.

[102] Schmidt H, Sorensen BS, Fode K, Nexo E, von der Maase H. Tyrosinase messenger RNA in peripheral blood is related to poor survival in patients with metastatic melanoma following interleukin-2-based immunotherapy. Melanoma Res. 2005; 15(5): 409-16.

[103] Palmieri G, Ascierto PA, Perrone F, Satriano SM, Ottaiano A, Daponte A *et al.* Prognostic value of circulating melanoma cells detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Oncol 2003; 21: 767–73.

[104] Carrillo E, Prados J, Marchal JA, Boulaiz H, Martínez A, Rodríguez-Serrano F *et al.* Prognostic value of RT-PCR tyrosinase detection in peripheral blood of melanoma patients. Dis Markers. 2006; 22(3): 175-81.

[105] Garbe C, Leiter U, Ellwanger U, Blaheta HJ, Meier F, Rassner G *et al.* Diagnostic value and prognostic significance of protein S-100ß, melanoma-inhibitory activity, and tyrosinase/MART-1 reverse transcription-polymerase chain reaction in the follow-up of high-risk melanoma patients. Cancer. 2003; 97(7): 1737-45.

[106] Proebstle TM, Jiang W, Högel J, Keilholz U, Weber L, Voit C. Correlation of positive RT-PCR for tyrosinase in peripheral blood of malignant melanoma patients with clinical stage, survival and other risk factors. Br J Cancer. 2000; 82(1): 118-23.

[107] Hanekom GS, Stubbings HM, Johnson CA, Kidson SH. The detection of circulating melanoma cells correlates with tumour thickness and ulceration but is not predictive of metastasis for patients with primary melanoma**.** Melanoma *Res.* 1999; 9: 465-473.

[108] Osella-Abate S, Savoia P, Quaglino P, Fierro MT, Leporati C, Ortoncelli M *et al*. Tyrosinase expression in the peripheral blood of stage III melanoma patients is associated with a poor prognosis: a clinical follow-up study of 110 patients. Br J Cancer. 2003; 89(8): 1457-62

[109] Reinhold U, Lüdtke-Handjery HC, Schnautz S, Kreysel HW, Abken H. The analysis of tyrosinase-specific mRNA in blood samples of melanoma patients by RT-PCR is not a useful test for metastatic tumor progression. *J Invest Dermatol.* 1997; 108: 166-169.

[110] Wascher R. A., Morton D. L., Kuo C., Elashoff R. M., Wang H-J, Gerami M. *et al*. Molecular Tumor Markers in the Blood: Early Prediction of Disease Outcome in Melanoma Patients Treated With a Melanoma Vaccine. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21(13): 2558-2563.

[111] Blaheta HJ, Paul T, Sotlar K, Maczey E, Schittek B, Paul A *et al.* Detection of melanoma cells in sentinel lymph nodes, bone marrow and peripheral blood by a reverse transcriptionpolymerase chain reaction assay in patients with primary cutaneous melanoma: Association with Breslow's tumour thickness. Br J Dermatol 2001; 145:195-202.

[112] Curry BJ, Myers K, Hersey P. MART-1 is expressed less frequently on circulating melanoma cells in patients who develop distant compared with locoregional metastases. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 2562-2571.

[113] Mellado B, Colomer D, Castel T, Muñoz M, Carballo E, Galán M*,, et al.* Detection of circulating neoplastic cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in malignant melanoma**:** association with clinical stage and prognosis. J Clin Oncol. 1996; 14: 2091-2097.

114 Hoon DS, Bostick P, Kuo C, Okamoto T, Wang HJ, Elashoff R *et al.* Molecular markers in blood as surrogate prognostic indicators of melanoma recurrence.Cancer Res. 2000; 60(8): 2253-7.

[115] Hoon DS, Wang Y, Dale PS, Conrad AJ, Schmid P, Garrison D *et al.* Detection of occult melanoma cells in blood with a multiplemarker polymerase chain reaction assay. J Clin Oncol 1995; 13: 2109-2116.

[116] Tsao H, Nadiminti U, Sober AJ, Bigby M. A meta-analysis of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosinase mRNA as a marker for circulating tumor cells in cutaneous melanoma. Arch Dermatol 2001; 137: 325–30.

[117] Quaglino P, Savoia P, Fierro MT, Osella-Abate S, Bernengo MG. Clinical significance of sequential tyrosinase expression in the peripheral blood of disease-free melanoma patients: a review of literature data. Melanoma Res 2004; 14: S17–9.

[118] Mocellin S., Hoon D., Ambrosi A., Nitti D. and Rossi CR. The Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Patients with Melanoma: A Systematic Review and Meta-analysis Clinical Cancer Research 2006; 12: 4605-4613.

[119] Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Essner R, Elashoff R, Multicenter selective lymphadenectomy trial group. Interim results of the Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial (MSLT-1) in clinical stage I melanoma. [abstract 7500]. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 710S.

[120] Cecchi R, Buralli L, Innocenti S, Seghieri G, De Gaudio C. Sentinel lymph node biopsy in patients with thick (≥4 mm) melanoma: a single-centre experience. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2007; 21(6): 758-61.

[121] Jansen L, Nieweg OE, Peterse JL, Hoefnagel CA, Olmos RA, Kroon BB. Reliability of sentinel lymph node biopsy for staging melanoma. Br J Surg. 2000; 87(4): 484-9.

[122] Vuylsteke RJ, Van Leeuwen PA, Statius Muller MG, Gietema , Kragt DR, Meijer S. Clinical Outcome of Stage I/II Melanoma Patients After Selective Sentinel Lymph Node Dissection: Long-Term Follow-Up Results. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21(6): 1057-1065.

[123] Liszkay G, Peley G, Sinkovicz I, Peter I, Orosz Z, Fejos Z *et al.* Clinical Significance of Sentinel Lymph Node Involvement in Malignant Melanoma. Pathology Oncology Research 2003; 9 : 184-187.

[124] Fincher TR, McCarty TM, Fisher TL, Preskitt JT, Lieberman ZH, Stephens JF *et al.* Patterns of recurrence after sentinel lymph node biopsy for cutaneous melanoma. Am J Surg. 2003; 186(6): 675-81.

[125] Doting MH, Hoekstra HJ, Plukker JT, Piers DA, Jager PL, Tiebosch AT *et al.* Is sentinel node biopsy beneficial in melanoma patients? A report on 200 patients with cutaneous melanoma. Eur J Surg Oncol. 2002; 28(6): 673-8.

[126] Essner R, Chung MH, Bleicher R, Hsueh E, Wanek L, Morton DL. Prognostic Implications of Thick (≥4-mm) Melanoma in the Era of Intraoperative Lymphatic Mapping and Sentinel Lymphadenectomy. *Annals of Surgical Oncology 2002;* 9: 754-761.

[127]Statius Muller MG, van Leeuwen PA, de Lange-De Klerk ES, van Diest PJ, Pijpers R, Ferwerda CC *et al.* The sentinel lymph node status is an important factor for predicting clinical outcome in patients with Stage I or II cutaneous melanoma. Cancer. 2001; 91: 2401-8.

[128] Blumenthal R, Banic A, Brand CU, Ris HB, Lardinois D. Morbidity and outcome after sentinel lymph node dissection in patients with early-stage malignant cutaneous melanoma. Swiss Surg 2002; 8: 209-14.

[129] Mocellin S, Hoon DS, Pilati P, Rossi CR, Nitti D. Sentinel lymph node molecular ultrastaging in patients with melanoma: a systematic review and meta-analysis of prognosis. J Clin Oncol. 2007; 25(12): 1588-95.

[130] Scoggins C.R, Ross M.I, Reintgen D S, Noyes R.D., Goydos J. S.,. Beitsch P D *et al.* Prospective Multi-Institutional Study of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Molecular Staging of Melanoma. J Clin Oncol 2006;24:2849-2857.

[131] Wölfel T., Hauer M., Schneider J., Serrano M., Wölfel C., Klehmann-Hieb *et al*. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma Science 1995; 269(5228): 1281-1284.

132 Robbins P. F., El-Gamil M., Li Y. F., Kawakami Y., Loftus D., Appella E. *et al.* A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes J. Exp. Med. 1996; 183: 1185-119.

[133] Cheever M. A., Disis M. L., Bernhard H., Gralow J. R., Hand S. L., Huseby E. S. *et al.* Immunity to oncogenic proteins. *Immunol. Rev.*1995, 145: 33-59.

[134] Gnjatic S., Cai Z., Viguier M., Chouaib S., Guillet J. G. & Choppin J. Accumulation of the p53 Protein Allows Recognition by Human CTL of a Wild-Type p53 Epitope Presented by Breast Carcinomas and Melanomas *The Journal of Immunology* 1998, 160: 328-333.

[135] Brichard V., Van Pel A., Wolfel T., Wolfel C., De Plaen E., Lethe B *et al*. The Tyrosinase Gene Codes for an Antigen Recognized by Autologous Cytolytic T Lymphocytes on HLA-A2 Melanomas J. Exp. Med. 1993; 178: 489-495.

[136] Bouchard R, Fuller R,Vijayasaradhi S and Houghton A.N. Induction of pigmentation in mouse fibroblasts by expression of human tyrosinase cDNA..J. *Exp Med.*1989; 169: 2029-2042.

[137] Kwon B.S., Haq A.K, Pomerantz S.H, and K. Halaban. Isolation and sequence of a cDNA for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*1987; 84: 7473-7477.

[138] Robbins P. F., El-Gamil M., Kawakami Y. and Rosenberg S. A. Recognition of Tyrosinase by Tumor-infiltrating Lymphocytes from a Patient Responding to Immunotherapy Cancer Res.1994; 54: 3124-3126.

[139] Kawakami Y., Eliyahu S., Delgado C. H., Robbins P.F., Sakaguchi K., Apella E *et al*. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; 91: 6458-6462.

[140] Wang R.F, Robbins P.F, Kawakami Y, Kang X.Q, and SA Rosenberg**.** Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. J. Exp. Med. 1995; 181: 799-804.

[141] Coulie P. G., Brichard V., Van Pel A., Wolfel T., Schneider J., Traversari C.*et al.* A New Gene Coding for a Differentiation Antigen Recognized by Autologous Cytolytic T Lymphocytes on HLA-A2 Melanomas. J. Exp. Med. 1994; 180: 35-42.

[142] Kawakami Y., Eliyahu S., Delgado C. H., Robbins P.F., Rivoltini L., Topalian S. L *et al.* Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; 91, 3515-3519.

[143] Bakker AB, Schreurs MW, de Boer AJ, Kawakami Y, Rosenberg SA, Adema GJ *et al*. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. J Exp Med. 1994; 179(3): 1005-9.

[144] Kwon B. S. Pigmentation genes: the tyrosinase gene family and the pmel 17 gene family. J Invest Dermatol. 1993;100(2 Suppl):134S-140S.

[145] Chen Y.-T., Stockert E., Tsang S., Coplan K. A. & Old L. J. Immunophenotyping of melanomas for tyrosinase: implications for vaccine development. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(18): 8125-9.

[146] Van der Bruggen P.,Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-1647.

[147] Brasseur E, Marchand M, Vanwijck K, Herin M, Lethe B, Chomez P.*et al.* Human gene MAGE-1, which codes for a tumor rejection antigen, is expressed by some breast tumors. *Int.j.Cancer.* 1992; 52: 839-841.

[148] Traversari C., Van der Bruggen P, Luescher I.E, Lurquin C, Chomez E, Van Pel A *et al.* A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by CTL directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 1453-1457.

[149] Gaugler B, Van den Eynde B, Van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E *et al.* Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes.J Exp Med. 1994; 179(3): 921-30.

[150] Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. J Exp Med. 1995; 182(3): 689-98.

[151] Boël P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P. *et al.* BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. Immunity. 1995; 2(2): 167-75.

[152] Chen Y.-T., Scanlan M.J, Sahin U, Türeci Ö, Gure A.O, Tsang S *et al.* A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*1997; 94: 1914–1918.

[153] Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jäger D. *et al*. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. J Exp Med 1998; 187 (2): 265–270.

[154] Guilloux Y., Lucas S, Brichard V, Van Pel A, Viret C, De Plaen E *et al*. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-Acetylglucosaminyltransferase V gene. *J. Exp. Med.*1996; 183: 1173-1183.

[155] Tobal K., Sherman L. S., Foss A. J., Lightman S. L. Detection of melanocytes from uveal melanoma in peripheral blood using the polymerase chain reaction. Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.1993; *34:* 2622-2625.

[156] Foss A. J., Guille M. J., Occleston N. L., Hykin P. G., Hungerford J. L., Lightman S. The detection of melanoma cells in peripheral blood by reverse transcription polymerase chain reaction. Br. J. Cancer 1995; 72: 155-159.

[157] Palmieri G., Strazzullo M., Ascierto P. A., Satriano S. M. R., Daponte A., Castello G., for the Melanoma Cooperative Group. Polymerase chain reaction-based detection of circulating melanoma cells as an effective marker of tumor progression. Melanoma Cooperative Group. J. Clin. Oncol. 1999; 17: 304-311.

[158] De Vries T. J., Fourkour A., Punt C. J., Van de Locht L. T., Wobbes T., Van den Bosch S *et al.* Reproducibility of detection of tyrosinase and MART-1 transcripts in the peripheral blood of melanoma patients: a quality control study using real-time quantitative RT-PCR. Br. J. Cancer 1999; *80:* 883-891.

[159] Schittek B., Blaheta H-J., Flörchinger G., Sauer B., Garbe C. Increased sensitivity for the detection of malignant melanoma cells in peripheral blood using an improved protocol for reverse transcription-polymerase chain reaction. Br. J. Dermatol.1999; 141: 37-43.

[160] Berking C., Schlüpen E-M., Schrader A., Atzpodien J., Volkenandt M. Tumor markers in peripheral blood of patients with malignant melanoma: Multimarker RT-PCR versus a luminoimmunometric assay for S-100. Arch. Dermatol. Res.1999; 291: 479-484.

[161] Keilholz U., Willhauck M., Rimoldi D., Brasseur F., Dummer W., Rass K *et al*. Reliability of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)-based assays for the detection of circulating tumour cells: a quality-assurance initiative of the EORTC Melanoma Cooperative Group. Eur. J. Cancer1998; *34:* 750-753.

[162] Reinhold U., Berkin C., Bosserhoff A. K., Deutschmann A., Garbe C., Glaser R. *et al.* Interlaboratory evaluation of a new reverse transcriptase polymerase chain reaction-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating melanoma cells: a multicenter study of the Dermatologic Cooperative Oncology Group. J. Clin. Oncol.2001; *19:* 1723-1727.

[163] Keilholz U, Goldin-Lang P, Bechrakis NE, Max N, Letsch A, Schmittel A. *et al.* Quantitative detection of circulating tumor cells in cutaneous and ocular melanoma and quality assessment by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Clin Cancer Res. 2004; 10(5): 1605-12.

[164] Takeuchi H, Kuo C, Morton D.L, Wang H-J *et al.* Expression of differentiation Melanoma–associated Antigen Genes is associated with favorable disease outcome in advanced-stage melanomas. Cancer Research 2003; 63: 441-448.

[165] Jäger E, Ringhoffer M, Altmannsberger M, Arand M, Karbach J, Jäger D. *et al.* Immunoselection in vivo: independent loss of CMH class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. Int J Cancer 1997; 71: 142-147.

[166] Chen Y.T, Stockert E., Jungblut A., Tsang S., Coplan K.A., Scanlan M.J. *et al.* Serological analysis of Melan-A(MART-l), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93: 5915-5919.

NOM : Vourc'h-Jourdain **Prénom** : Morgane

Titre de thèse : Expression des gènes de mélanome et profil clinique évolutif

RESUME

De nombreux antigènes associés au mélanome ont été identifiés comme induisant une réponse tant cellulaire qu'humorale. Ces antigènes sont donc des cibles pour les thérapeutiques d'immunothérapie spécifique. Cependant leur expression est variable au cours de la progression tumorale et contribue à l'échappement thérapeutique et à la progression tumorale elle-même. De ce fait, afin de préciser l'importance de ces mécanismes, nous avons étudié l'expression de certains gènes de mélanome à partir de biopsies de métastases. Nous l'avons ensuite confrontée aux données de survie des patients afin d'évaluer une éventuelle relation.

202 prélèvements tissulaires (cutané, ganglionnaire, viscéral) ont ainsi été étudiés par RT-PCR Les gènes étudiés ont été : Melan-A, Mage-3, Mage-1, Tyrosinase, Na-17, Ny-ESO-1.

Notre travail montre que dans les mélanomes de stade III, une expression forte isolée de MAGE-3 au niveau transcriptionnel ou associée à une expression forte des autres antigènes embryonnaires, est un facteur de bon pronostic avec une survie sans rechute augmentée. Toutefois, la valeur pronostique de ces gènes est limitée à ce sous groupe de patients dans notre étude. Dans le futur, il serait intéressant de comparer l'expression transcriptionnelle et protidique de ces mêmes gènes de mélanome et de voir si la même corrélation existe sur la survie sans rechute et la survie globale.

Mots-clés : Mélanome ; gènes ; antigènes ; pronostic.