



**HAL**  
open science

## VE-cadhérine soluble chez les patients atteints d'un mélanome : recherche d'un nouveau biomarqueur

Clémentine Charlotte Rojon-Broche

► **To cite this version:**

Clémentine Charlotte Rojon-Broche. VE-cadhérine soluble chez les patients atteints d'un mélanome : recherche d'un nouveau biomarqueur. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-03087249

**HAL Id: dumas-03087249**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03087249>**

Submitted on 23 Dec 2020

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

# VE-CADHERINE SOLUBLE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS D'UN MELANOME : RECHERCHE D'UN NOUVEAU BIOMARQUEUR.

THÈSE  
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE  
DOCTEUR EN MÉDECINE

Clémentine Charlotte ROJON- BROCHE

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE  
GRENOBLE

Le 21 novembre 2018

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Mme la Professeure Marie-Thérèse LECCIA

Membres :

Mme la Professeure Julie CHARLES, co-directrice

Mme le Docteur Isabelle VILGRAIN, co-directrice

Mme la Professeure Laurence BOUILLET Laurence

Mme le Docteur Laurence CHAPEROT

*L'UFR de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

# TABLE DES MATIERES

## Table des matières

|  |    |
|--|----|
| TABLE DES MATIERES.....  | 2  |
| REMERCIEMENTS .....  | 4  |
| SERMENT D'HIPPOCRATE .....   | 8  |
| ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE .....                                | 9  |
| LISTE DES ILLUSTRATIONS .....  | 13 |
| RESUME.....  | 15 |
| MOTS CLES .....  | 17 |
| ABREVIATIONS .....   | 17 |
| INTRODUCTION.....  | 18 |
| 1. Epidémiologie .....   | 18 |
| 2. Définitions.....  | 18 |
| 3. Facteurs pronostiques histologiques.....                          | 19 |
| 3.1 Indice de Breslow .....  | 19 |
| 3.2 Index mitotique.....   | 20 |
| 3.3 Ulcération .....   | 20 |
| 4. Facteurs pronostiques sériques.....                               | 21 |
| 5. Voies de signalisation cellulaires activées dans le mélanome..... | 22 |
| 6. Traitement .....  | 22 |
| 7. Histogénèse et vascularisation du mélanome.....                   | 24 |
| 8. VE-Cadhérine.....   | 28 |
| 9. Interaction VEGF/VE-cadhérine.....                                | 29 |
| ARTICLE .....  | 33 |
| DONNEES SUPPLEMENTAIRES .....  | 40 |
| 1. MATERIEL ET METHODES :.....                                       | 40 |
| 1.1 Patients .....   | 40 |
| 1.1.1 Première cohorte : .....                                       | 40 |
| 1.1.2 Deuxième cohorte :.....  | 42 |
| 1.1.3 Troisième population d'étude :.....                            | 44 |
| 1.2 Prélèvements biologiques.....                                    | 44 |
| 1.3 Technique par ELISA.....   | 45 |
| 1.4 Traitement analytique des données .....                          | 46 |
| 1.5 Analyses statistiques des données .....                          | 46 |

|  |    |
|--|----|
| 2. RESULTATS :   | 47 |
| 2.1 Analyses statistiques de la première cohorte   | 47 |
| 2.1.1 Analyse de la survie sans progression en fonction des critères pronostiques du mélanome                      | 47 |
| 2.1.1.1 Indice de Breslow  | 48 |
| 2.1.1.2 Ulcération   | 49 |
| 2.1.1.3 Taux de LDH  | 50 |
| 2.1.2 Analyse de la survie sans progression en fonction du taux de VE-cadhérine soluble                            | 51 |
| 2.1.3 Corrélation du taux de VE-cadhérine soluble avec l'indice de Breslow, l'ulcération et le taux de LDH         | 52 |
| 2.2 Analyses statistiques de la deuxième cohorte   | 53 |
| 2.2.1 Taux de sVE-cadhérine à T0 et T1 par rapport à la réponse au traitement                                      | 53 |
| 2.2.2 Evolution du taux de sVE-cadhérine à court terme après un cycle d'immunothérapie                             | 55 |
| 2.2.3 Survie sans progression en fonction de la variation du taux de sVE-cadhérine après une cure d'immunothérapie | 57 |
| 2.2.4 Evolution du taux de sVE-cadhérine à long terme  | 58 |
| 2.2.5 Etude du taux de sVE-cadhérine selon le stade du mélanome, comparés aux donneurs sains                       | 59 |
| DISCUSSION   | 61 |
| CONCLUSION   | 68 |
| ANNEXES  | 71 |
| BIBLIOGRAPHIE  | 74 |

# REMERCIEMENTS

**A mes enseignants,**

**A Madame la Professeure Marie-Thérèse Leccia** de faire l'honneur de présider ce jury. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre aide et votre considération des internes. Je vous témoigne ma profonde et respectueuse reconnaissance.

**A Madame la Professeure Julie Charles** de m'avoir soutenue et de m'avoir accompagnée tout au long de ce travail. Tes réflexions et tes commentaires précieux ont été d'une grande aide dans l'avancement de ce travail. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi, je t'en suis infiniment reconnaissante.

**A Madame le Docteur Isabelle Vilgrain,** pour votre accessibilité, votre soutien au cours de ce travail de thèse. Recevez ici toute ma reconnaissance.

**A Madame le Docteur Laurence Chaperot** de me faire l'honneur de participer au jury de ma thèse. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

**A Madame le Professeur Laurence Bouillet,** pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse, c'est un honneur.

**A Khémery,** pour m'avoir soutenue dans ce travail de thèse et également merci pour tous les résultats sans lesquels ma thèse n'aurait jamais vu le jour.

**A Sabiha,** pour ta franchise, ta sympathie, ta sagesse et surtout ton aide en dermoscopie.

**A Isabelle,** pour ton dynamisme et surtout ton profond respect pour les patients. Je te remercie pour ton encadrement dans le service d'hospitalisation.

**A Mathilde et Karima,** pour votre engagement, vos valeurs apportées au service de dermatologie.

**A Pauline,** pour ton temps consacré à l'enseignement de l'allergologie. Merci d'avoir eu confiance en moi pour la rédaction de notre article. La persévérance a payé.

**A Amélie et Marie,** mes assistantes et anciennes co-internes préférées. Merci pour ces belles années passées à vos côtés, toujours dans la bonne humeur.

**A l'équipe de dermatologie de Grenoble** du 11<sup>e</sup> C, de l'hôpital de jour, d'allergologie et de consultation notamment Céline, Alex, Juliana, Brigitte, Marie Paule, Françoise, Morgane, Julie, Laureen, Claire pour m'avoir accueillie et formée durant tout mon internat. Quelle sympathie de travailler à vos côtés.

**A l'équipe d'anatomopathologie,** notamment Adeline, Antonin (sans « h »), Romane, Guillaume, Anne-Sophie, Hugo et Olivier pour ce semestre dans la bonne humeur. L'empéripolèse n'a plus de secret pour moi. J'espère qu'on aura l'occasion de se recroiser ou de travailler ensemble.

**A Margaux,** pour ces virés à Paris toujours aussi sympathiques les unes des autres ; à nos cookies en format familial, nos pique-niques pendant ton congé maternité et la joie de partager un bonheur sans limite : nos bébés.

**A Elisa**, d'avoir été ma cointerne de promo, toujours dynamique et pleine de vie (même ton genou en témoigne !).

**A Josépha**, pour ta simplicité, ton honnêt . J'ai été très contente de travailler avec toi.

**A mes autres cointernes**, Lisa, Manue, Cédric, Pauline pour ces belles années passées à vos côtés.

**A Alexandrine**, pour m'avoir appris tellement de chose au début de mon internat, une belle amitié est n e.

**A ma Famille**,

**A ma maman**, pour tes sacrifices et ton soutien inconditionnel tout au long de mes études. Merci pour tout.

**A mon papa**, qui m'a fait partager depuis toujours sa passion pour la médecine, merci de m'avoir soutenue toutes ces années.

**A Anne**, petit lutin de la forêt pour ton soutien depuis mon plus jeune âge. J'ai eu beaucoup de chance, merci pour tout.

**A mes beaux-parents**, Nadine et Bruno, vous m'avez accueillie et soutenue comme votre fille. Merci pour votre soutien. Merci également aux nombreux mojitos de Bruno et nos bonnes soirées sur la terrasse de Saint Nic'.

**A mes frères, belles sœurs, beau-frère, nièces**, merci pour tous ces moments partagés, passés et à venir. Merci à tous pour votre simplicité, votre bonne humeur.

**A ma m m  et à Thierry**, de votre soutien depuis de nombreuses années. M m , à tes petits plats toujours aussi savoureux même si thermomix est passé par là.

**A Guerric**, merci pour toutes ces belles années passées à tes côtés, ta présence, ton aide. Tu as su me soutenir durant toutes ces années d'études, sans faille. Tu as toujours été là pour moi même dans les situations les plus difficiles. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci pour ton amour tout simplement. Je t'aime

*« Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ;  
elles sont les charmants jardiniers par qui nos  mes sont fleuries. »*

*Marcel Proust*

**A Paul**, mon enfant qui restera toute la vie mon bébé. Merci pour tout le bonheur que tu m'apportes au quotidien, un amour sans limite. Comme tu dirais « Ze t'aime ! ».

*« Vivre la naissance d'un enfant est notre chance la plus accessible  
de saisir le sens du mot miracle. »*

*Paul Carvel.*

**A mes amis,**

**A Jessica**, ma Jéjé, pour tous les moments partagés depuis notre rencontre au CH de VOIRON. Merci pour ton soutien et ton aide dans toutes les situations. Merci pour ta bonne humeur et ta simplicité. Merci également à tes deux hommes qui ont fait de toi une femme ravissante. Une pensée également à la jolie future princesse.

**A Pauline**, pour toutes ces belles années de jeunesse passées à tes côtés ; nos 3h de préparations avant nos spectacles de danse, nos petits repas sucrés à minuit, nos films d'horreur dans le noir en compagnie de nounours en guimauve... je ne compte plus les années qu'on se connaît car ça commence à faire trop. Une future maman au top, restes comme tu es !

**A Axel**, pour tous ces beaux moments passés à tes côtés. Merci pour ta présence, un parrain pour Paul en or.

**A la dream'team, Julie, Yannick, Jenn', Jean-Phi, Chrys', Fab', Clem, Ludo et les bébés Joy et Théo**, merci à vous pour ces beaux moments remplis de déconnades. Fab, promis j'arrête les collants troués. Mamie, promis, le pyjama s'est pas avant 23h. Promis on arrête le mojito champagne... ou pas !

**A la famille « Oyeux », Justine et Max** sans oublier les enfants **Victor et Alban**, qui sans eux nous n'aurions jamais eu l'occasion de se rencontrer. Merci à vous pour votre bonne humeur, votre sympathie. Vous avez deux formidables petits garçons. Grosses bises de « Tata Kem ».

**A nos « ex-voisins »** pour ces bons moments en votre compagnie. Merci pour votre simplicité.

**A mes amies du lycée** que j'ai eu l'immense chance de les rencontrer et pour lesquelles, l'éloignement n'a pas empêché de rester en contact.

A tous ceux que j'ai pu oublier, j'espère qu'ils ne m'en tiendront pas rigueur....

*« La reconnaissance est la plus belle fleur qui jaillit de l'âme »*

*de Henry Ward Beecher*

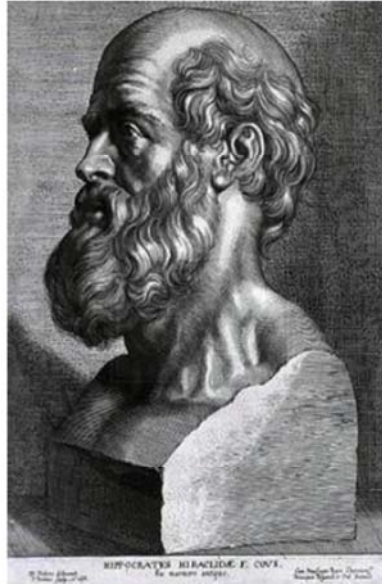


*« Voir le possible là où les autres voient l'impossible,*

*telle est la clé du succès. »*

*Charles-Albert Poissant*

## SERMENT D'HIPPOCRATE



## **SERMENT D'HIPPOCRATE**

*En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,*

*Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.*

*Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.*

*Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.*

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine.*

*Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

# ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE



Doyen de la Faculté : **Pr. Patrice MORAND**  
Année 2018-2019

| CORPS  | NOM-PRENOM                    | Discipline universitaire  |
|--------|-------------------------------|---|
| PU-PH  | ALBALADEJO Pierre             | Anesthésiologie réanimation   |
| PU-PH  | APEL Florent                  | Ophthalmologie  |
| PU-PH  | ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine  | Chirurgie générale  |
| PU-PH  | BAILLET Athan                 | Rhumatologie  |
| PU-PH  | BARONE-ROCHETTE Gilles        | Cardiologie   |
| PU-PH  | BAYAT Sam                     | Physiologie   |
| PU-PH  | BENHAMOU Pierre Yves          | Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques                        |
| PU-PH  | BERGER François               | Biologie cellulaire   |
| MCU-PH | BIDART-COUTTON Marie          | Biologie cellulaire   |
| MCU-PH | BOISSET Sandrine              | Agents infectieux   |
| PU-PH  | BONAZ Bruno                   | Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie                           |
| PU-PH  | BONNETERRE Vincent            | Médecine et santé au travail  |
| PU-PH  | BOREL Anne-Laure              | Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques                        |
| PU-PH  | BOSSON Jean-Luc               | Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication |
| MCU-PH | BOTTARI Serge                 | Biologie cellulaire   |
| PU-PH  | BOUGEROL Thierry              | Psychiatrie d'adultes   |
| PU-PH  | BOUILLET Laurence             | Médecine interne  |
| PU-PH  | BOUZAT Pierre                 | Réanimation   |
| MCU-PH | BRENIER-PINCHART Marie Pierre | Parasitologie et mycologie  |
| PU-PH  | BRICAULT Ivan                 | Radiologie et imagerie médicale   |
| PU-PH  | BRICHON Pierre-Yves           | Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire                              |
| MCU-PH | BRIOT Raphaël                 | Thérapeutique, médecine d'urgence                                       |
| MCU-PH | BROUILLET Sophie              | Biologie et médecine du développement et de la reproduction             |
| PU-PH  | CAHN Jean-Yves                | Hématologie   |
| PU-PH  | CARPENTIER Françoise          | Thérapeutique, médecine d'urgence                                       |
| PU-PH  | CARPENTIER Patrick            | Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire                               |
| PU-PH  | CESBRON Jean-Yves             | Immunologie   |
| PU-PH  | CHABARDES Stephan             | Neurochirurgie  |
| PU-PH  | CHABRE Olivier                | Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques                        |
| PU-PH  | CHAFFANJON Philippe           | Anatomie  |
| PU-PH  | CHARLES Julie                 | Dermatologie  |
| PU-PH  | CHAVANON Olivier              | Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire                              |
| PU-PH  | CHIQUET Christophe            | Ophthalmologie  |

|        |                         |   |
|--------|-------------------------|---|
| PU-PH  | CHIRICA Mircea          | Chirurgie générale  |
| PU-PH  | CINQUIN Philippe        | Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication |
| MCU-PH | CLAVARINO Giovanna      | Immunologie   |
| PU-PH  | COHEN Olivier           | Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication |
| PU-PH  | COURVOISIER Aurélien    | Chirurgie infantile   |
| PU-PH  | COUTURIER Pascal        | Gériatrie et biologie du vieillissement                                 |
| PU-PH  | CRACOWSKI Jean-Luc      | Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique                      |
| PU-PH  | CURE Hervé              | Oncologie   |
| PU-PH  | DEBILLON Thierry        | Pédiatrie   |
| PU-PH  | DECAENS Thomas          | Gastro-entérologie, Hépatologie   |
| PU-PH  | DEMATTEIS Maurice       | Addictologie  |
| MCU-PH | DERANSART Colin         | Physiologie   |
| PU-PH  | DESCOTES Jean-Luc       | Urologie  |
| MCU-PH | DETANTE Olivier         | Neurologie  |
| MCU-PH | DIETERICH Klaus         | Génétique et procréation  |
| MCU-PH | DOUTRELEAU Stéphane     | Physiologie   |
| MCU-PH | DUMESTRE-PERARD Chantal | Immunologie   |
| PU-PH  | EPAULARD Olivier        | Maladies Infectieuses et Tropicales                                     |
| PU-PH  | ESTEVE François         | Biophysique et médecine nucléaire                                       |
| MCU-PH | EYSSERIC Hélène         | Médecine légale et droit de la santé                                    |
| PU-PH  | FAGRET Daniel           | Biophysique et médecine nucléaire                                       |
| PU-PH  | FAUCHERON Jean-Luc      | Chirurgie générale  |
| MCU-PH | FAURE Julien            | Biochimie et biologie moléculaire                                       |
| PU-PH  | FERRETTI Gilbert        | Radiologie et imagerie médicale   |
| PU-PH  | FEUERSTEIN Claude       | Physiologie   |
| PU-PH  | FONTAINE Éric           | Nutrition   |
| PU-PH  | FRANCOIS Patrice        | Epidémiologie, économie de la santé et prévention                       |
| MCU-MG | GABOREAU Yoann          | Médecine Générale   |
| PU-PH  | GARBAN Frédéric         | Hématologie, transfusion  |
| PU-PH  | GAUDIN Philippe         | Rhumatologie  |
| PU-PH  | GAVAZZI Gaëtan          | Gériatrie et biologie du vieillissement                                 |
| PU-PH  | GAY Emmanuel            | Neurochirurgie  |
| MCU-PH | GILLOIS Pierre          | Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication |
| MCU-PH | GRAND Sylvie            | Radiologie et imagerie médicale   |
| PU-PH  | GRIFFET Jacques         | Chirurgie infantile   |
| PU-PH  | GUEBRE-EGZLABHER Fitsum | Néphrologie   |
| MCU-PH | GUZUN Rita              | Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique        |
| PU-PH  | HAINAUT Pierre          | Biochimie, biologie moléculaire   |
| PU-PH  | HENNEBICQ Sylviane      | Génétique et procréation  |
| PU-PH  | HOFFMANN Pascale        | Gynécologie obstétrique   |
| PU-PH  | HOMMEL Marc             | Neurologie  |
| PU-MG  | IMBERT Patrick          | Médecine Générale   |
| PU-PH  | JOUK Pierre-Simon       | Génétique   |
| PU-PH  | JUVIN Robert            | Rhumatologie  |

|          |                                      |   |
|----------|--------------------------------------|---|
| PU-PH    | KAHANE Philippe                      | Physiologie   |
| MCU-PH   | KASTLER Adrian                       | Radiologie et imagerie médicale   |
| PU-PH    | KRACK Paul                           | Neurologie  |
| PU-PH    | KRAINIK Alexandre                    | Radiologie et imagerie médicale   |
| PU-PH    | LABARERE José                        | Epidémiologie ; Eco. de la Santé  |
| MCU-PH   | LABLANCHE Sandrine                   | Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques                        |
| MCU-PH   | LANDELLE Caroline                    | Bactériologie - virologie   |
| MCU-PH   | LAPORTE François                     | Biochimie et biologie moléculaire                                       |
| MCU-PH   | LARDY Bernard                        | Biochimie et biologie moléculaire                                       |
| MCU-PH   | LARRAT Sylvie                        | Bactériologie, virologie  |
| MCU - PH | LE PISSART Audrey                    | Biochimie et biologie moléculaire                                       |
| PU-PH    | LECCIA Marie-Thérèse                 | Dermato-vénérologie   |
| PU-PH    | LEROUX Dominique                     | Génétique   |
| PU-PH    | LEROY Vincent                        | Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie                           |
| PU-PH    | LEVY Patrick                         | Physiologie   |
| PU-PH    | LONG Jean-Alexandre                  | Urologie  |
| PU-PH    | MAGNE Jean-Luc                       | Chirurgie vasculaire  |
| MCU-PH   | MAIGNAN Maxime                       | Thérapeutique, médecine d'urgence                                       |
| PU-PH    | MAITRE Anne                          | Médecine et santé au travail  |
| MCU-PH   | MALLARET Marie-Reine                 | Epidémiologie, économie de la santé et prévention                       |
| MCU-PH   | MARLU Raphaël                        | Hématologie, transfusion  |
| MCU-PH   | MAUBON Danièle                       | Parasitologie et mycologie  |
| PU-PH    | MAURIN Max                           | Bactériologie - virologie   |
| MCU-PH   | MC LEER Anne                         | Cytologie et histologie   |
| PU-PH    | MERLOZ Philippe                      | Chirurgie orthopédique et traumatologie                                 |
| PU-PH    | MORAND Patrice                       | Bactériologie - virologie   |
| PU-PH    | MOREAU-GAUDRY Alexandre              | Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication |
| PU-PH    | MORO Elena                           | Neurologie  |
| PU-PH    | MORO-SIBILOT Denis                   | Pneumologie   |
| PU-PH    | MOUSSEAU Mireille                    | Cancérologie  |
| PU-PH    | MOUTET François                      | Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie         |
| MCU-PH   | PACLET Marie-Hélène                  | Biochimie et biologie moléculaire                                       |
| PU-PH    | PALOMBI Olivier                      | Anatomie  |
| PU-PH    | PARK Sophie                          | Hémato - transfusion  |
| PU-PH    | PASSAGGIA Jean-Guy                   | Anatomie  |
| PU-PH    | PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François | Anesthésiologie réanimation   |
| MCU-PH   | PAYSANT François                     | Médecine légale et droit de la santé                                    |
| MCU-PH   | PELLETIER Laurent                    | Biologie cellulaire   |
| PU-PH    | PELLOUX Hervé                        | Parasitologie et mycologie  |
| PU-PH    | PEPIN Jean-Louis                     | Physiologie   |
| PU-PH    | PERENNOU Dominique                   | Médecine physique et de réadaptation                                    |
| PU-PH    | PERNOD Gilles                        | Médecine vasculaire   |
| PU-PH    | PIOLAT Christian                     | Chirurgie infantile   |
| PU-PH    | PISON Christophe                     | Pneumologie   |

|        |                        |   |
|--------|------------------------|---|
| PU-PH  | PLANTAZ Dominique      | Pédiatrie   |
| PU-PH  | POIGNARD Pascal        | Virologie   |
| PU-PH  | POLACK Benoît          | Hématologie   |
| PU-PH  | POLOSAN Mircea         | Psychiatrie d'adultes                                       |
| PU-PH  | PONS Jean-Claude       | Gynécologie obstétrique                                     |
| PU-PH  | RAMBEAUD Jacques       | Urologie  |
| PU-PH  | RAY Pierre             | Biologie et médecine du développement et de la reproduction |
| PU-PH  | REYT Émile             | Oto-rhino-laryngologie                                      |
| PU-PH  | RIGHINI Christian      | Oto-rhino-laryngologie                                      |
| PU-PH  | ROMANET Jean Paul      | Ophthalmologie  |
| PU-PH  | ROSTAING Lionel        | Néphrologie   |
| MCU-PH | ROUSTIT Matthieu       | Pharmacologie fondamentale, pharmaco clinique, addictologie |
| MCU-PH | ROUX-BUISSON Nathalie  | Biochimie, toxicologie et pharmacologie                     |
| MCU-PH | RUBIO Amandine         | Pédiatrie   |
| PU-PH  | SARAGAGLIA Dominique   | Chirurgie orthopédique et traumatologie                     |
| MCU-PH | SATRE Véronique        | Génétique   |
| PU-PH  | SAUDOU Frédéric        | Biologie Cellulaire   |
| PU-PH  | SCHMERBER Sébastien    | Oto-rhino-laryngologie                                      |
| PU-PH  | SCHWEBEL-CANALI Carole | Réanimation médicale  |
| PU-PH  | SCOLAN Virginie        | Médecine légale et droit de la santé                        |
| MCU-PH | SEIGNEURIN Arnaud      | Epidémiologie, économie de la santé et prévention           |
| PU-PH  | STAHL Jean-Paul        | Maladies infectieuses, maladies tropicales                  |
| PU-PH  | STANKE Françoise       | Pharmacologie fondamentale                                  |
| MCU-PH | STASIA Marie-José      | Biochimie et biologie moléculaire                           |
| PU-PH  | STURM Nathalie         | Anatomie et cytologie pathologiques                         |
| PU-PH  | TAMISIER Renaud        | Physiologie   |
| PU-PH  | TERZI Nicolas          | Réanimation   |
| MCU-PH | TOFFART Anne-Claire    | Pneumologie   |
| PU-PH  | TONETTI Jérôme         | Chirurgie orthopédique et traumatologie                     |
| PU-PH  | TOUSSAINT Bertrand     | Biochimie et biologie moléculaire                           |
| PU-PH  | VANZETTO Gérald        | Cardiologie   |
| PU-PH  | VUILLEZ Jean-Philippe  | Biophysique et médecine nucléaire                           |
| PU-PH  | WEIL Georges           | Epidémiologie, économie de la santé et prévention           |
| PU-PH  | ZAOUI Philippe         | Néphrologie   |
| PU-PH  | ZARSKI Jean-Pierre     | Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie               |

**PU-PH** : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers

**MCU-PH** : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers

**PU-MG** : Professeur des Universités de Médecine Générale

**MCU-MG** : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

### Listes des Figures :

**Figure 1-** (d'après Mahabeleshwar et al. en 2007) - Schéma représentant la progression tumorale mélanocytaire.

**Figure 2-** (d'après Ghilsin et al en 2012) - Schéma représentant un modèle de transmigration des cellules tumorales de mélanome à travers l'endothélium vasculaire.

**Figure 3-** (d'après Margaret et al, en 2007) - Représentation schématique de la VE-cadhérine au niveau des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales.

**Figure 4-** (d'après Vilgrain et al, 2013) - Schéma représentant le clivage de la VE-cadhérine dans le mélanome.

**Figure 5-** Analyse de la survie sans progression en fonction de l'indice de Breslow (mm) selon la méthode de Kaplan-Meier.

**Figure 6-** Analyse de la survie sans progression en fonction de la présence ou non d'ulcération selon la méthode de Kaplan-Meier.

**Figure 7-** Analyse de la survie sans progression en fonction du taux de LDH (UI/l) selon la méthode de Kaplan-Meier.

**Figure 8-** Analyse de la survie sans progression en fonction du taux de sVE-cadhérine (ng/mL).

**Figure 9-** Analyse du taux de sVE-cadhérine (ng/mL) en fonction de l'indice de Breslow (mm), de la présence ou non d'une ulcération et du taux de LDH (UI/L).

**Figure 10-** Analyse du taux de sVE-cadhérine à T0 chez les patients répondeurs et non répondeurs à l'immunothérapie.

**Figure 11-** Analyse du taux de sVE-cadhérine à T1 chez les patients répondeurs et non répondeurs à l'immunothérapie ( $p=0,26$ ).

**Figure 12-** Représentation statistique de la variation de la sVE-cadhérine (ng/mL) au cours du temps chez les patients répondeurs ( $p=0,0195$ ) et les patients non répondeurs ( $p=0,03$ ).

**Figure 13-** Représentation du ratio T1/T0 du taux de sVE-cadhérine (ng/mL) par rapport à la réponse au traitement.

**Figure 14-** Représentation graphique du taux de sVE-cadhérine après une cure d'immunothérapie chez les patients répondeurs (en bleu) ou non (en rouge) au traitement.

**Figure 15-** Représentation de la survie sans progression calculée par la méthode de Kaplan-Meier selon la variation du taux de sVE-cadhérine après une cure d'immunothérapie.

**Figure 16-** Evaluation du taux de sVE-cadhérine au cours du temps.

**Figure 17-** Représentation statistique du taux moyen de sVE-cadhérine (ng/mL) dans chaque cohorte.

Listes des tableaux :

**Tableau 1 :** Caractéristiques cliniques et histologiques de la première population d'étude.

**Tableau 2 :** Caractéristiques cliniques de la deuxième population d'étude.



# RESUME

Clémentine ROJON-BROCHE

UFR MÉDECINE

FILIÈRE : Dermatologie

## VE-CADHERINE SOLUBLE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS D'UN MELANOME : RECHERCHE D'UN NOUVEAU BIOMARQUEUR.

### RÉSUMÉ :

Le mélanome est un cancer cutané à haut potentiel agressif pour lequel il n'existe pas de biomarqueur spécifique sérique validé en routine permettant de prédire la rechute ou la réponse au traitement. La compréhension de la physiopathologie du mélanome au sein de son micro environnement tumoral semble une étape essentielle dans le développement de nouveaux biomarqueurs. Nous avons ainsi étudié le taux de VE-cadhérine soluble (sVE-cadhérine) à partir de trois cohortes de patients : 28 patients atteints d'un mélanome localisé stade I-II, 27 patients atteints d'un mélanome métastatique inopérable stade III-IV sous immunothérapie et 24 sujets contrôles. Nous avons constaté un taux sVE-cadhérine plus élevé chez les patients atteints d'un mélanome que chez les volontaires sains et d'autant plus élevé que le stade du mélanome était avancé. De plus, nous avons constaté que la variation du taux de sVE-cadhérine après une cure d'immunothérapie était corrélée à la réponse au traitement avec respectivement une diminution du taux de sVE-cadhérine chez les répondeurs et une augmentation chez les non répondeurs. En enfin, nous avons démontré qu'il existe une corrélation significative entre la variation de la sVE-cadhérine après une cure d'immunothérapie et la survie sans progression des patients. L'ensemble de ces données suggère que la sVE-cadhérine pourrait être utilisée comme biomarqueur précoce de la

réponse à l'immunothérapie chez les patients atteints d'un mélanome métastatique inopérable. Ces résultats sont encourageants et devraient permettre dans un futur proche de proposer une prise en charge personnalisée pour les patients.

## MOTS CLES

Biomarqueurs, indice de Breslow, ulcération, immunothérapie, anti-PD-1, anti-CTLA-4  
angiogénèse, VE-cadhérine soluble, VEGF, Mélanome, métastases.

## ABREVIATIONS

**AJCC** : American Joint Committee on Cancer  
**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché  
**CTLA-4** : Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4  
**INCA** : Institut National du Cancer  
**LDH** : Lactate Deshydrogénase  
**LFA-1** : Leukocyte Function-Associated antigen-1  
**PD-1** : Programmed Death 1  
**PDGF** : Platelet Derived Growth Factor  
**RECIST** : Response Evaluation Criteria In Solid Tumors  
**sVE-cadhérine** : soluble Vascular Endothelial-cadherin  
**T0** : Temps 0 = Cure n°1  
**T1** : Temps 1= Cure n°2  
**T2** : Temps 2= Cure n°3  
**VE-cadhérine** : Vascular Endothelial-cadhérine  
**VEGF**: Vascular Endothelial Growth Factor.

# INTRODUCTION

## 1. Epidémiologie

Le mélanome cutané est le plus agressif des cancers de la peau engageant le pronostic vital par sa capacité à métastaser. Il représente entre 2 et 3 % de l'ensemble des cancers. Le mélanome se situe au 6<sup>ème</sup> rang des cancers les plus fréquents chez la femme et au 8<sup>ème</sup> rang chez l'homme (1,2). Il touche un peu plus de femmes (53 %) que d'hommes (47 %) et l'âge moyen au diagnostic est de 56 ans (1).

Il représente le cancer dont l'incidence augmente le plus (10 % par an depuis 50 ans). En effet, entre 1980 et 2012, l'incidence chez l'homme est passée de 2,5 à 10,8 pour 100 000 personnes et chez la femme, de 4,0 à 11,1 pour 100 000 personnes (2). En 2015 avec environ 14 325 cas estimés en France et 1 773 décès, le mélanome se situe au neuvième rang des cancers, tous sexes confondus. Le taux de survie nette à 5 ans est de 91 % (3).

## 2. Définitions

Le mélanome est la conséquence d'une prolifération cellulaire qui se développe à partir des mélanocytes, cellules responsables de la synthèse de mélanine (4). Les mélanocytes sont présents essentiellement dans la peau mais également dans l'œil, les méninges, les muqueuses de la cavité buccale, du rectum et des organes génitaux. Dans 90% des cas, le mélanome est cutané avec une topographie variable (le plus souvent sur le tronc chez les hommes et les jambes pour les femmes). 70% des mélanomes se développent de novo. Dans le reste des cas, il se développe à partir d'un nævus préexistant (5,6)

Dans le cadre du mélanome cutané, il existe plusieurs formes histologiques :

**Le mélanome superficiel extensif** est la forme la plus fréquente de mélanome (60%). Il est caractérisé par des cellules mélanocytaires atypiques envahissant l'épiderme et le derme.

**Le mélanome nodulaire** représente 10 à 20 % des mélanomes. C'est la forme la plus agressive, d'emblée invasive. Il est le résultat d'une prolifération dense de cellules mélanocytaires atypiques formant une nappe dans le derme.

**Le mélanome acrolentigineux** représente 2% des mélanomes cutanés : c'est un mélanome à extension superficielle extensive initiale qui se localise sur les régions palmo-plantaires. La lésion forme une prolifération intra-épidermique de mélanocytes atypiques d'abord alignés dans la couche basale et/ou regroupés en thèques, qui envahissent ensuite le derme.

**Le mélanome de Dubreuilh** est la forme qui évolue le moins rapidement et qui représente environ 10 % des cas. Il s'agit d'une lésion localisée sur le visage, en zone photo-exposée (malaire, temporale), qui forme une plaque brune souvent étendue. Histologiquement, la lésion est constituée d'une prolifération de mélanocytes atypiques alignés dans la couche basale, associée à une atrophie de l'épiderme.

### **3. Facteurs pronostiques histologiques**

Quel que soit le type du mélanome, le pronostic va dépendre de la précocité de la prise en charge et des critères anatomopathologiques utilisées actuellement qui sont l'indice de Breslow, l'index mitotique et l'ulcération.

#### **3.1 Indice de Breslow**

L'indice de Breslow est le principal critère pronostique dans le mélanome dont la valeur est corrélée avec l'épaisseur tumorale, le risque de récurrence et la mortalité. De plus, ce facteur conditionne les marges de sécurité lors de la reprise d'exérèse du mélanome primitif (2). L'indice de Breslow correspond à l'épaisseur tumorale maximale c'est-à-dire l'épaisseur entre la partie supérieure de la granuleuse épidermique et la cellule tumorale la plus profonde.

### 3.2 Index mitotique

L'index mitotique est défini histologiquement par le nombre de mitose ( $s/mm^2$ ) et représente un facteur pronostique puissant et indépendant de la survie, en particulier pour les mélanomes de moins de 1 mm d'épaisseur, et ce déjà à partir de seulement une mitose par  $mm^2$ . Il s'agit du deuxième plus puissant facteur pronostique de la survie après l'épaisseur tumorale chez les patients avec un mélanome cliniquement localisé (stades I et II) (7). Cet index est déterminé par le comptage du nombre total de mitoses sur quatre champs à fort grossissement (grossissement 400x). Cette mesure est remarquablement fiable et permet une faible variabilité entre les pathologistes (8). Elle doit être réalisée depuis le début de la composante tumorale dermique qui comporte le plus de mitoses (appelée hot spot) et se dérouler sur les champs adjacents jusqu'à ce qu'une surface totale de  $1\text{ mm}^2$  soit quantifiée (9).

### 3.3 Ulcération

La présence d'une ulcération est également un facteur de risque indépendant. Selon une étude de Balch et al, le taux de survie à 5 ans des patients porteurs de mélanome de stade I est de 80% pour les formes non ulcérées versus 53% pour les formes ulcérées. Pour les mélanomes de stade II, le taux de survie à 5 ans est de 53% pour les formes non ulcérées alors qu'il est de 12% pour les formes ulcérées ( $p < 0.001$ ) (10).

#### **4. Facteurs pronostiques sériques**

De nombreux marqueurs sériques ont été étudiés dans la recherche carcinologique à savoir les antigènes associés au mélanome ( mélanome inhibiting activity, neurone specific enolase, lipid-bouond sialic acid-P), les dérivés de la différenciation mélanocytaire ( tyrosinase), la protéine S100 $\beta$ , des cytokines, l'ADN circulant, PD-L1 etc, mais aucun de ces marqueurs n'a montré de supériorité par rapport au taux de LDH (11). En dépit de l'importance des recherches sur la détection de nouveaux biomarqueurs associé à la prédiction du caractère agressif des mélanomes, de la réponse au traitement chez les patients métastatiques inopérables, peu d'entre eux ont été promus et recommandés pour leur utilisation en pratique clinique.

En effet, le seul dosage sérique qui a été intégré dans la dernière classification AJCC est celui de la lactate déshydrogénase (LDH) sérique (4). La LDH est une enzyme intracellulaire ubiquitaire qui catalyse la transformation réversible du pyruvate en lactate qui entre dans la néoglucogénèse. En cas de lyse cellulaire ou altération tissulaire, cette enzyme est relarguée dans la circulation sanguine. Des études ont ainsi mis en évidence une corrélation entre le taux de LDH et la taille tumorale dans de nombreuses entités néoplasiques dont le mélanome (12). Cependant, la seule indication de la LDH se limite ce jour au pronostique des formes métastatiques de la maladie.

## **5. Voies de signalisation cellulaires activées dans le mélanome**

La compréhension de la genèse du mélanome et de son comportement dans le micro environnement sont des approches innovantes permettant de développer des biomarqueurs prédictifs de la réponse et du suivi des patients sous traitement. Plusieurs voies de signalisations sont identifiées dans le mélanome : la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), la voie de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et celles de l'AMPc.

Certaines d'entre elles sont affectées par des mutations oncogéniques, par exemple, NRAS, BRAF et KIT qui activent la voie des MAPKs et qui constituent l'altération la plus fréquemment retrouvée dans les mélanomes (13). Ces anomalies moléculaires sont appelées « drivers ». En effet, elles engendrent à elles seules l'orientation de la cellule vers un phénotype tumoral.

## **6. Traitement**

L'objectif de la prise en charge du mélanome est de proposer une stratégie thérapeutique standardisée afin d'obtenir des taux de réponse satisfaisants tout en préservant la qualité de vie des patients. Si les formes diagnostiquées à un stade peu avancé sont de bon pronostic, la rémission complète est généralement obtenue par la seule chirurgie, alors que les formes évoluées métastatiques ou non résécables sont de mauvais pronostics. L'arrivée récente de nouvelles thérapeutiques dans le mélanome de stade III inopérable et de stade IV a considérablement modifié la prise en charge thérapeutique de cette maladie. En effet, l'arsenal thérapeutique contre le mélanome métastatique s'est développé depuis ces dernières années avec l'apparition des thérapies ciblées et de l'immunothérapie. Par conséquent, les recommandations de l'Institut National du Cancer (INCA) publiées en 2017 positionnent les anticorps anti PD-1 (nivolumab OPDIVO ® , pembrolizumab KEYTRUDA ®) en traitement de première ligne pour les patients non porteurs de la mutation BRAF V600. L'association d'immunothérapie (nivolumab et ipilimumab) a obtenu l'autorisation de mise sur le marché du



fait d'une efficacité supérieure (taux de survie à 3 ans de 58% versus 52% sous nivolumab seul) (14). Cependant, l'association d'immunothérapies comprend de nombreux effets secondaires ce qui pourrait limiter leur utilisation à un groupe de patients répondant à certains critères (statut OMS 0 ou 1), absence de co-morbidité, absence de métastase leptoméningée ou cérébrale non contrôlée). Enfin, les recommandations de l'INCA proposent d'utiliser en première ligne les thérapies ciblées associant une molécule anti-BRAF et d'une molécule anti-MEK chez les patients porteurs de la mutation BRAF V600 hormis chez les patients avec une masse tumorale limitée et une maladie à évolution lente où l'utilisation des anti-PD1 peut être introduite en première ligne (2).

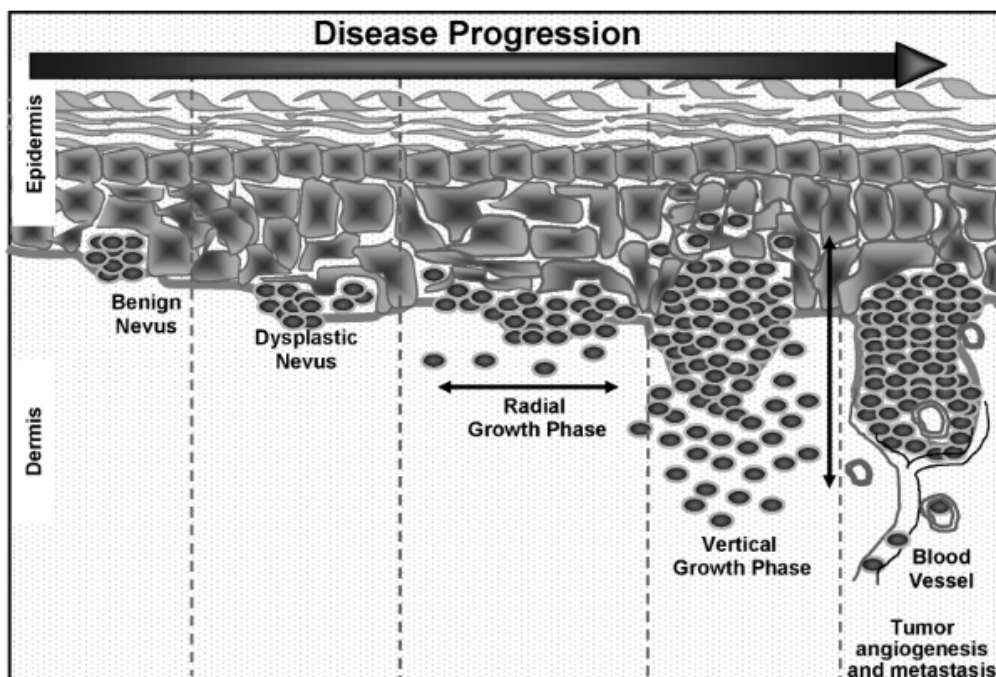
L'arrivée de ces nouvelles thérapeutiques a permis d'améliorer le pronostic des patients porteurs d'un mélanome métastatique avec une survie globale augmentée. Cependant, malgré ces avancées thérapeutiques, le taux de survie global reste faible de l'ordre de 50% à deux ans avec une durée médiane de 37,6 mois de la pathologie (15,16). Par ailleurs, ces traitements ont des profils de tolérance différents et la gestion précoce des effets indésirables (dysthyroïdie, colite, diarrhée, insuffisance surrénalienne, trouble de l'appétit, céphalées, asthénie, etc...) devrait permettre d'optimiser la compliance des patients et l'efficacité de ces traitements. Ces éléments nous imposent donc de développer des outils permettant de guider le développement de ces nouvelles thérapies mais aussi d'accompagner le clinicien dans sa décision quant à la thérapeutique la plus efficace pour chacun de ses patients.

La compréhension de la physiopathologie du mélanome au sein de son micro environnement tumoral semble un point clé dans le développement de nouveaux biomarqueurs prédictifs de réponse.

## 7. Histogénèse et vascularisation du mélanome

Comme les autres néoplasies cutanées, les mélanomes suivent des processus de transformation séquentielle dans lesquels le nævus acquiert sous l'action de facteurs génétiques et/ou physiques, des dysplasies au cours de l'extension « horizontale » intra épidermique (au-dessus de la membrane basale).

Dans une seconde phase, l'extension est « verticale » avec envahissement du derme superficiel (phase micro-invasive), puis du derme profond et de l'hypoderme (phase invasive) (*Figure 1*). Cette phase est associée à un développement de facteurs pro-angiogéniques permettant la formation d'une néo vascularisation et d'une dissémination tumorale à distance.



*Figure 1*- Schéma représentant la progression tumorale mélanocytaire (d'après Mahabeleshwar et al en 2007 (17)).

La progression métastatique vasculaire et lymphatique résulte d'étapes multiples, progressives appelées cascades métastatiques. En effet, durant ces dernières années, les connaissances sur le développement tumoral se sont enrichies avec la prise de conscience que les tumeurs sont composées de cellules transformées qui acquièrent au cours du temps des capacités d'invasion, et de différenciation parallèlement aux altérations moléculaires intra et extrinsèques. Au cours

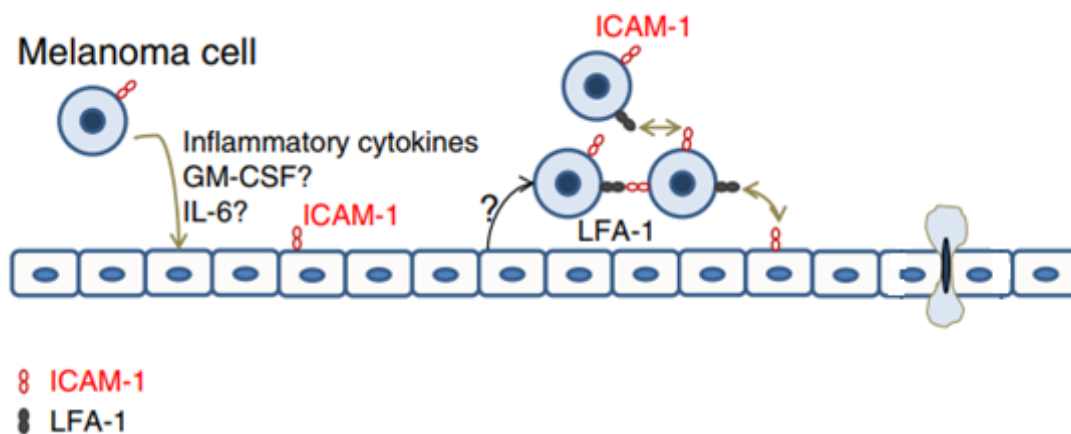
de la progression tumorale, particulièrement lors de la croissance verticale du mélanome, l'environnement hypoxique et pauvre en nutriments va entraîner la surexpression de facteurs pro angiogéniques tels que VEGF, PDGF, et aussi des enzymes protéolytiques comme les métalloprotéases, permettant ensemble un remodelage et une néovascularisation, au détriment des molécules anti angiogéniques (angiostatine, thrombospondine...) (18,19). Ce mécanisme appelé angiogenèse est un processus essentiel au développement tumoral et à sa dissémination. L'angiogenèse dans le mélanome a été décrite la première fois en 1966 par *Warren et Shubik* à la suite d'une transplantation de tissu tumoral de mélanome humain dans les joues de hamsters (20) puis a été confirmée par *Hubler et Wolf* avec la mise en évidence d'une prolifération vasculaire au sein du tissu tumoral mélanocytaire greffé (21). Par ailleurs, des études utilisant des modèles de xéno greffes de mélanome humain chez des souris « nudes » ont montré que les cellules tumorales mélanocytaires produisaient plusieurs facteurs de croissance dont le VEGF, mais aussi le  $\beta$ FGF (22). En effet, le VEGF (vascular endothelial growth factor) est le plus important médiateur de l'angiogenèse qui stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales (23,24). Il est surexprimé dans toutes les tumeurs solides dont le mélanome (25).

En effet, au cours de la transformation du mélanocyte en cellule tumorale, de nombreux changements phénotypiques ont lieu et ces cellules expriment et sécrètent des facteurs de croissance capables d'induire l'angiogenèse via l'activation de la voie des MAPK, de la PI3K etc). Ainsi, la surexpression du VEGF par les cellules de mélanome et son accumulation dans le stroma tumoral sont corrélées à la transition du mélanome de la phase horizontale à la phase verticale et donc à la progression tumorale (16, 22, 23). Des études en immunohistochimie ont permis de démontrer une dysrégulation de deux isoformes du VEGF A (VEGF 165 et VEGF 121) au cours de la transformation mélanocytaire avec en parallèle une augmentation de la microvascularisation tumorale (27). De plus, un taux élevé de VEGF serait retrouvé chez les patients ayant une masse tumorale importante. Toutes ces données suggèrent que le taux de VEGF est corrélé à la microvascularisation et à la croissance tumorale du mélanome.

Le VEGF agit par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires situés à la surface des cellules endothéliales mais aussi des cellules tumorales mélanocytaires (28). En effet, au cours de la transformation maligne des mélanocytes, de nombreux changements biochimiques et phénotypiques surviennent notamment une expression aberrante des récepteurs VEGF-2 et 1 à la surface des mélanocytes malins. Aucun récepteur VEGF similaire n'a été détecté à la surface des mélanocytes normaux (24). Ceci suggère que l'expression aberrante des récepteurs de VEGF est l'un des changements phénotypiques survenant dans les cellules de mélanome au cours de la transformation tumorale des mélanocytes. De plus, ces données suggèrent que VEGF est capable d'activer des voies de signalisation intracellulaire similaire à la fois dans les cellules endothéliales et dans les mélanocytes malins (17).

Une autre caractéristique de la progression tumorale repose sur la néovascularisation du tissu qui découle de l'action du VEGF et qui implique un remodelage des cellules endothéliales normalement quiescentes. Ce remodelage et cette mobilité des cellules endothéliales stimulées par VEGF ont un impact sur la régulation dynamique des cadhérines impliquées dans l'intégrité de l'endothélium vasculaire. Ce remodelage vasculaire fait aussi partie des éléments déterminants dans les processus métastatiques. En effet, des travaux réalisés en 2007 puis en 2014 ont démontré que la migration des cellules tumorales à travers l'endothélium était comparable à la transmigration des cellules immunitaires lorsqu'elles se dirigent vers des sites d'infection, ou d'inflammation. Toutefois, une étape supplémentaire appelée « incorporation dans l'endothélium » a été identifiée suggérant que les cellules de mélanome peuvent s'incorporer dans les capillaires tumoraux. Au cours de cette phase, les cellules cancéreuses et notamment les cellules de mélanome peuvent déplacer physiquement les cellules endothéliales entraînant la dislocation de la VE-cadhérine avec pour finalité la désorganisation des jonctions endothéliales. Ce processus se produit indépendamment de l'état d'activation de l'endothélium ou de la qualité du substrat sous endothélial, une différence notable par rapport au processus par lequel les leucocytes transmigrent (29,30). En effet, les cellules de mélanomes sécrètent de

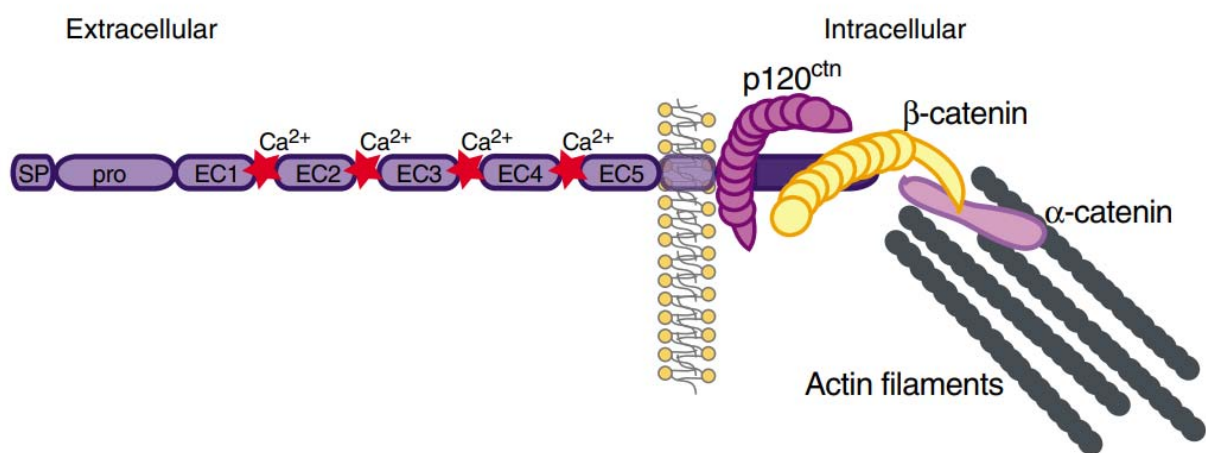
nombreuses cytokines dans le micro-environnement et induisent une expression du récepteur ICAM1 au niveau des cellules endothéliales et à leur surface. L'incorporation des cellules de mélanome au sein de l'endothélium vasculaire est ainsi permise par l'interaction entre le ligand LFA-1 (Leukocyte Function-Associated antigen-1) exprimé à leur surface et le récepteur ICAM1 (*Figure 2*), (31). L'incorporation dans l'endothélium représente donc une étape clé de l'extravasation des cellules tumorales. Elle est permise par la désorganisation des jonctions endothéliales composées de protéines adhésives dont la VE-cadhérine. L'ensemble de ces acteurs induisent une instabilité de l'endothélium vasculaire.



**Figure 2-** Schéma représentant un modèle de transmigration des cellules tumorales de mélanome à travers l'endothélium vasculaire (d'après Ghilsin et al en 2012) (31).

## 8. VE-Cadhérine

Un composant majeur et spécifique des jonctions intercellulaires endothéliales est la VE cadhérine (Vascular Endothelial-cadherin), qui réalise des liaisons homotypiques entre les cellules par son domaine extracellulaire et qui maintient une forte stabilité de ces structures. Cette protéine est une glycoprotéine transmembranaire de type I de 125kDA, de 784 acides aminés, dont le domaine extracellulaire comporte 592 acides aminés et est formé de cinq ectodomains (EC1 à 5) d'environ 100 acides aminés (*Figure 3*). Les domaines EC1 à EC4 sont composés de structures en feuillet  $\beta$  comme ses homologues, la E et la N- cadhérines. Le domaine EC5, le plus proche de la membrane, comprend quatre résidus cystéine à l'origine de deux ponts disulfures. Les sites de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sont situés au niveau des régions inter-modulaires du domaine extracellulaire et la saturation de ces sites pourrait être à l'origine de la rigidité du domaine extra cellulaire (*Figure 2*) (32). Elle présente également un court segment transmembranaire de 27 AA et un domaine cytoplasmiques de 163 AA très homologue qui possède la propriété unique de lier à la fois des protéines partenaires des filaments d'actine et des filaments intermédiaires. Ce domaine comporte également plusieurs sites potentiels de phosphorylation (Serine, Thréonine, Tyrosine) pouvant modifier la conformation de la protéine et son interaction avec les différentes molécules cytoplasmiques.

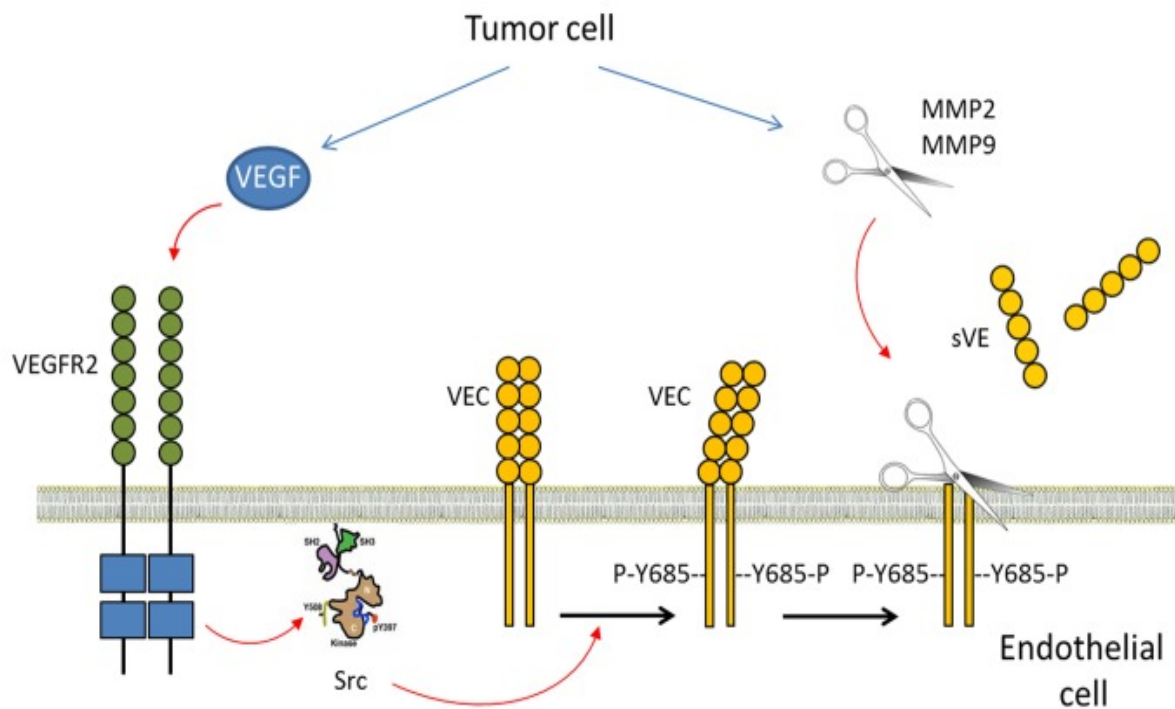


**Figure 3-** Représentation schématique de la VE cadhérine au niveau de la jonction intercellulaire (d'après Margaret et al, 2007) (33).

Par son extrémité C terminale, le domaine intracellulaire lie la  $\beta$  caténine et la plakoglobine ( $\gamma$ -caténine). Ces deux protéines se lient à l' $\alpha$  caténine qui s'ancree aux filaments d'actine permettant ainsi une forte stabilité intercellulaire. D'autre part, la partie juxta membranaire du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine est capable de lier la caténine p120. Cette protéine est impliquée dans la régulation du taux de VE-cadhérine en contrôlant son internalisation (34,35).

### **9. Interaction VEGF/VE-cadhérine**

La sécrétion de VEGF via la cellule tumorale va induire l'autophosphorylation de son récepteur de type 2 sur plusieurs résidus tyrosine qui deviennent des partenaires cytoplasmiques pour des éléments de la signalisation cellulaire tels que Ras, PLC $\gamma$  qui vont ensuite activer des kinases en aval et plus particulièrement Raf-Mek-ERK et PI3K/p70 S6K conduisant ainsi à une prolifération accrue des cellules endothéliales (23). La tyrosine kinase SRC est également activée par le VEGF et elle est responsable de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine sur le site 685 (Y685). Par ailleurs, la serine-thréonine kinase PAK est responsable de la phosphorylation de la VE-cadhérine sur le site serine 665. Ces modifications covalentes de la protéine dans son domaine cytoplasmique induisent des modifications conformationnelles qui rendent la protéine plus susceptible à la protéolyse dans son domaine extracellulaire. Ces événements participent ainsi à la déstabilisation des jonctions intercellulaires endothéliales. Le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine après clivage peut être retrouvé dans la circulation sanguine de patients porteurs de cancer (forme soluble appelée VE-cadhérine soluble plasmatique) (*Figure 4*) (33,36).



**Figure 4-** Schéma représentant le clivage de la VE-cadhérine dans le mélanome (d'après Vilgrain and al, 2013 (33).

La VE-cadhérine est donc une molécule essentielle dans le processus d'angiogenèse (35). Une étude en 1999 avait démontré son rôle majeur par invalidation génique. En effet, les souris dont les cellules endothéliales étaient dépourvues de VE-cadhérine développaient un plexus vasculaire primitif sans remodelage vasculaire au cours du développement embryonnaire conduisant à une létalité à 9,5j de gestation. Ces données ont donc permis de mettre en évidence un rôle primordial de la VE-cadhérine dans la morphogenèse vasculaire et l'intégrité de l'endothélium. (37). Une étude en 2001 a permis de montrer que des anticorps dirigés contre la VE-cadhérine étaient capables de bloquer l'angiogenèse tumorale suggérant son rôle essentiel dans l'angiogenèse tumorale (38).

Plus récemment, en 2011-2013, une forme soluble de VE-cadhérine correspondant à son domaine extracellulaire aux propriétés adhésives, a été détectée dans la circulation sanguine de patients porteurs de différentes pathologies dont certains cancers. Une étude publiée en 2013



par l'équipe d'Isabelle Vilgrain a montré que chez les patients atteints de tumeurs cérébrales, le taux circulant de VE-cadhérine soluble avant tout traitement, était prédictif de la survie globale à trois ans (HR 0,13 [0,04; 0,40]  $p \leq 0,001$ ), et ceci quel que soit le grade histopathologique de la tumeur. En effet, un taux faible de sVE-cadhérine était associé à une récurrence tumorale plus précoce (33). D'autres études récentes réalisées chez des patients atteints de cancer du sein métastatique ou d'un carcinome rénal métastatique ont permis d'établir que cette forme soluble de VE-cadhérine était un biomarqueur pronostique indépendant pour la survie sans progression et la survie globale (39,40). Dans ces deux types de cancer métastatiques, les diminutions du taux de sVE-cadhérine après le 1<sup>er</sup> mois de traitement sont prédictifs de la réponse au traitement. Une discordance de résultats peut être expliquée par la topographie de ces différentes tumeurs. En effet, dans le cas de tumeurs cérébrales, l'œdème cérébral identifié chez les patients à meilleur pronostic peut expliquer le taux élevé de sVE-cadhérine systémique comparativement aux tumeurs de mauvais pronostic qui présentent souvent un processus de nécrose ne permettant pas la diffusion systémique de potentiels biomarqueurs. Des études complémentaires sur la variation du taux de sVE-cadhérine semblent nécessaires et intéressantes à réaliser afin de confirmer l'utilisation des variations de ce nouveau biomarqueur pour des applications prometteuses en oncologie.

En effet, des travaux réalisés en 2017 ont montré que la VE-cadhérine jouait un rôle majeur dans l'angiogenèse (41). L'expression tissulaire de la VE-cadhérine dans des cellules non endothéliales a été mise en évidence dans le cas du mélanome avec une corrélation étroite entre son taux et la survie des patients ; un taux élevé de VE-cadhérine tissulaire était corrélé à une diminution de la survie des patients ( $p=0.049$ ). Selon ces données, la VE-cadhérine est exprimée principalement dans les mélanomes agressifs permettant à la tumeur de s'engager vers un mimétisme vasculogénique, entraînant une modification phénotypique de la tumeur et permettant la formation de néo-vaisseaux (42). Par conséquent, le taux de VE-cadhérine pourrait être un facteur lié à la néo vascularisation et donc à la croissance tumorale.

Au total, le mélanome constitue un enjeu de santé publique. Les progrès thérapeutiques de ces dernières années ont considérablement modifié le paysage thérapeutique mais sans changer fondamentalement le pronostic. Le mélanome a un fort potentiel métastatique avec une néovascularisation marquée. L'angiogenèse dans le mélanome est un processus cellulaire mettant en jeu de nombreux paramètres comme l'expression aberrante du récepteur VEGF, la surexpression du VEGF permettant une désorganisation de l'endothélium et également la capacité des cellules tumorales mélanocytaires à acquérir un phénotype permettant de s'engager vers un mimétisme vasculogénique. La désorganisation architecturale de l'endothélium vasculaire reste une étape clé de l'angiogenèse.

L'objectif de ce travail a été de déterminer l'intérêt potentiel de sVE-cadhérine en tant que biomarqueur pronostique et/ou prédictif chez les patients atteints d'un mélanome. Dans ce but, nous avons étudié si le taux de sVE-cadhérine plasmatique est corrélé à la progression tumorale et/ou associé à un facteur pronostique déjà connu du mélanome (indice de Breslow, ulcération) et/ou à la réponse au traitement par immunothérapie. L'idée étant de mettre en place un nouveau marqueur biologique afin d'assurer les meilleures garanties de prise en charge des patients au plan diagnostique, pronostique et de suivi thérapeutique.

**Soluble VE-cadherin is an early biomarker of response to immunotherapy  
in metastatic melanoma**

En cours de soumission BJC (British Journal of Cancer)

Clémentine BROCHE<sup>1,2</sup>, Isabelle VILGRAIN<sup>3,4</sup>, Marie-Thérèse LECCIA<sup>1,2,5</sup>, Arnaud SEIGNEURIN<sup>6,7</sup>, Laurence BOUILLET<sup>2,9</sup>, Marie MONCOURIER<sup>1,2</sup>, Aude SALOMON<sup>3,4</sup>, Caroline ASPORD<sup>5</sup>, Khémary UM<sup>2,5,8</sup>, Laurence CHAPEROT<sup>2,5,8</sup>, and Julie CHARLES<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Dermatology, allergology and photobiology Department, Grenoble-Alpes University Hospital, France.

<sup>2</sup> University Grenoble-Alpes, Grenoble, France.

<sup>3</sup> INSERM, UMR-S 1036, Grenoble, France.

<sup>4</sup> CEA, DRF, Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble (BIG), Laboratory of Biology of Cancer and Infection, Grenoble, France.

<sup>5</sup> Institute for Advanced Biosciences UGA/ INSERM U1209/ CNRS UMR5309 Grenoble, France

<sup>6</sup> Public Health Department, Grenoble-Alpes University Hospital, Grenoble, France.

<sup>7</sup> Laboratory TIMC, UMR 5525, CNRS, Grenoble-Alpes University, Grenoble, France.

<sup>8</sup> R&D Laboratory, Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes, Grenoble, France.

<sup>9</sup> Department of Internal Medicine, Grenoble-Alpes University Hospital, France.

Corresponding authors : [cbroche@chu-grenoble.fr](mailto:cbroche@chu-grenoble.fr), [jcharles@chu-grenoble.fr](mailto:jcharles@chu-grenoble.fr), [isabelle.vilgrain@cea.fr](mailto:isabelle.vilgrain@cea.fr)

Total word count of manuscript : 1199 words

Conflicts of interest : The authors declare no conflicts of interest in relation to this presentation.

Keywords : soluble VE-cadherin, melanoma, biomarker, immunotherapy

## SUMMARY

Cutaneous melanoma is characterized by its high metastatic potential. The soluble form of VE-cadherin (sVE) is increased in several cancers and sVE is a biomarker of response to tyrosine kinase inhibitors in kidney cancer. Because neoangiogenesis and the immune system play a central role in melanoma, we wondered whether sVE was a marker of immunotherapy efficacy. 24 healthy donors and 55 melanoma patients were enrolled between September 2016 and May 2018. 28 patients had localized disease (I-II) and 27 patients had metastatic disease (III-IV). 21 patients over the 27 had unresectable metastatic melanoma and were treated with immunotherapy. sVE level was determined by ELISA in patients' plasma collected at the diagnosis. The level of sVE was significantly higher in metastatic melanoma patients than in localized melanoma patients and healthy donors. A decrease in sVE level after immunotherapy was correlated with progression free survival. These results suggest a potential use of sVE for optimal immunotherapy follow-up.

## INTRODUCTION

Cutaneous melanoma is the most aggressive skin cancer due to its high metastatic potential (1). Immunotherapy has dramatically improved the prognosis of patients with advanced melanoma, nonetheless, only 35 at 45% of treated patients exhibit objective response, and overall survival after two years is 50% (2,3). Besides the immune system, neoangiogenesis plays a central role in melanoma. Indeed, during the vertical tumor growth phase, angiogenesis is stimulated by growth factors such as VEGF (1,4), which is not expressed by normal melanocytes but is upregulated in malignant melanoma cells (5). By interacting with its receptor (VEGF-R2), VEGF induces endothelial cell proliferation and vascular remodeling through targeting an endothelial specific cadherin (VE-cadherin) leading to the opening of the endothelial junctions, facilitating neoangiogenesis. VE-cadherin is an adhesive protein expressed at adherent intercellular junctions of vascular endothelial cells, which has a key role in the maintenance of vascular integrity. VEGF and other cytokines are known to induce the tyrosine phosphorylation of VE-cadherin in its cytoplasmic domain, leading to the cleavage of its extracellular domain, which is then released as a soluble form of the protein called sVE (6). We previously showed

that elevated sVE level was associated with worse clinical outcomes in both metastatic breast cancer and that a decrease in sVE level was associated the positive response to tyrosine kinase inhibitors in metastatic kidney cancer (6,7).

In this study, our goal was to determine whether sVE-cadherin was a potential new early biomarker of response to immunotherapy.

## **PATIENTS AND METHODS**

*Patients.* This study was a monocentric prospective study designed to identify biological prognostic factors in melanoma patients (MP). Patients were enrolled in the study between September 2016 and May 2018, including 28 patients with localized melanoma (LM, stage Ia to Iib) and 27 patients with metastatic melanoma (MM). Among MM, 21 received immunotherapy (14 patients were treated with pembrolizumab every 3 weeks, 6 patients were treated with nivolumab every 2 weeks, and one patient received a combination of nivolumab and ipilimumab for 4 cycles and then nivolumab every 2 weeks in first line). Patients' characteristics are described in Supplementary Table 1. Written informed consent was obtained from each patient before enrolment, with authorization of local ethic committee. Blood heparinized samples from patients were collected in the department of dermatology in Grenoble-Alpes University Hospital at the time of diagnosis for LM, and just before the first and second cycle of immunotherapy for MM. As controls, blood samples were obtained from 24 healthy donors (HD) on "Etablissement Français du Sang" (EFS, Grenoble) approved protocols.

*Methods:* Plasma sVE level was determined by ELISA (8). Clinical, biological and radiological evaluations were performed at inclusion, and at 12 weeks. Analysis of response to the treatment was done according to the criteria of Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST), patients with stable or regressing target lesions were considered as responders, while patients with progressive disease were considered as non-responders.

*Statistical analysis.* Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. The non-parametric Mann-Whitney U-test was used to compare sVE levels between melanoma patients and the HD group. Wilcoxon and Fisher Exact tests were used to evaluate the relationship between sVE levels

and clinical response to treatment. Progression-free survival was defined as the time from inclusion to the date of first documentation of progression or the date of death or date of last follow-up. Survival rates at 12 months were obtained using the Kaplan–Meier method, with the STATA software. For all tests, p values <0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

We compared sVE levels in the HD and MP. MP had higher levels of sVE than HD (281ng/mL [min-max : 126-952]). The median level of sVE was significantly higher in metastatic patients (564.9 ng/mL [min-max : 330-864] ) than in patients with LM (462.2 ng/mL [min-max : 130-885],  $p < 0.05$ ) (Fig 1 A).

We next determined sVE level in metastatic MP after the first cycle of immunotherapy. It is noteworthy that responders had a statistically significant decrease of sVE level after one cycle ( $p = 0.02$ ) (Fig1 B), whereas non-responders had an increase of sVE level ( $p = 0.03$ ) (Fig1 C), while sVE level at diagnosis was not discriminating the two groups ( $p = 0.36$ ) (Fig1 D). We next compared sVE level variation in responders or patients who relapsed. The variation of sVE level was calculated for each patient after one cycle of immunotherapy as the percentage of baseline (sVE level before the second cycle/level of sVE level before the first cycle at  $\times 100$ ). Patients with a stable or decrease tumor mass had a decreased level of sVE after one cycle of immunotherapy (20% of decrease) whereas sVE level continued to increase in patients who relapse after treatment (10% of increase) ( $p = 0,0017$ ) (Fig1 E).

Progression-free-survival was assessed according to the variation of the sVE level between the first and second cycle of immunotherapy. Patients exhibiting a positive variation of of sVE level after immunotherapy had a poorer outcome (median PFS : 4,2 months) than patients with a decrease of sVE- (median PFS : 9,3 months) ( $p < 0.001$ )(Fig1 F).

## DISCUSSION

Immunotherapy with immune checkpoint blockers has revolutionized the treatment for unresectable or advanced malignant melanoma. Nonetheless, only a subset of patients responds to these treatment,. Several studies have tried to identify soluble (circulating DNA, sPD-L1, monocytes) or tumor-associated biomarkers (immune infiltrating cells), but none is already validated as a routine test. Thus, there is a need to identify easily implementable and robust biomarkers of early response to treatment to help clinicians in adapting their therapeutic strategies.

Studying melanoma, here we report elevated sVE level in plasma from both localized and metastatic melanoma patients when compared to healthy donors. As the processes for tumor cell invasion and spreading require mediators of angiogenesis, it can be suggested that the modifications of VE-cadherin such as phosphorylation and clivage at the tumor site affect the sVE level in peripheral blood from melanoma patients. It can also be suggested that VE-cadherin can reflect the tumor burden which is lower in localized melanoma than in metastatic melanoma. Indeed, VE-cadherin was shown to be expressed at higher level in aggressive melanoma than in localized melanoma, allowing vasculogenic mimicry that was described in human melanoma (9).

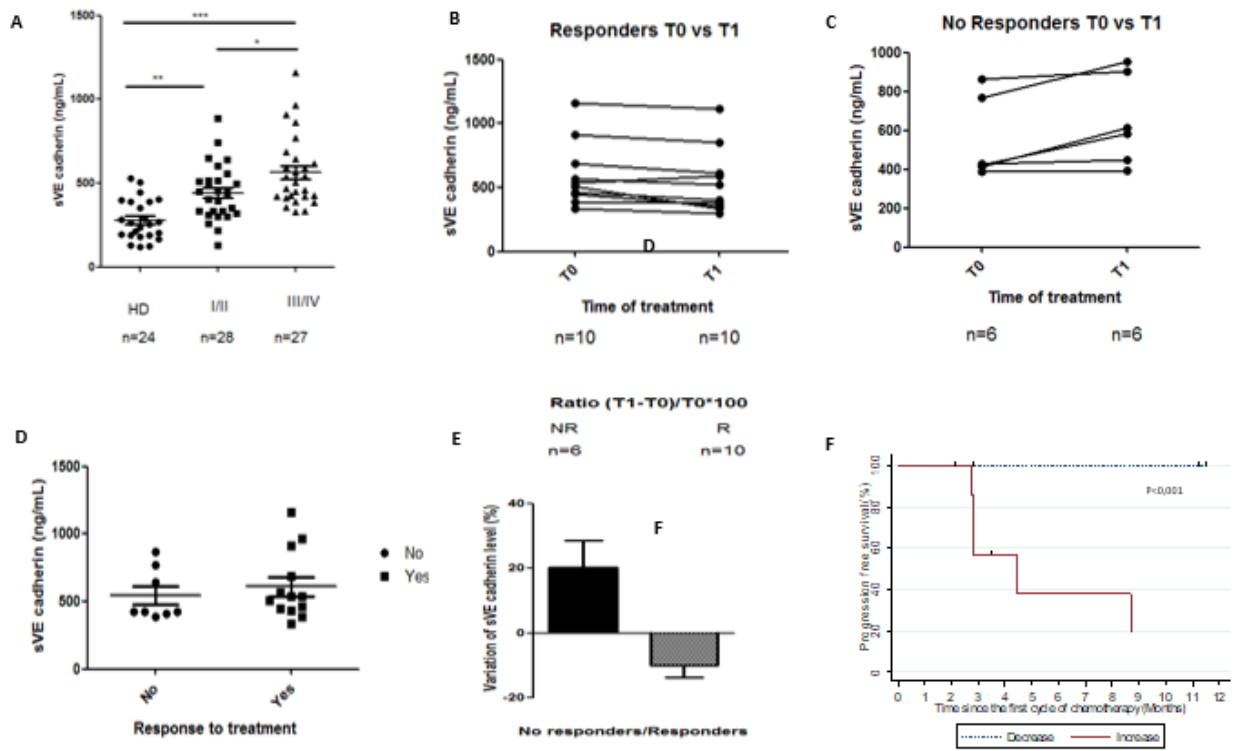
In this study, we also demonstrate for the first time that the variation of sVE level in patient treated by the first cycle of immunotherapy could discriminate responders and non-responders patients. This is in agreement with our hypothesis of VE-cadherin being a marker of the tumor mass as immunotherapy reduces melanoma progression as well as the contact between tumor cells and endothelial junctions. Interestingly, it has been observed that  $\beta$ -catenin was activated in melanoma leading to defective immune cell recruitment, and escape to immunotherapy (10). Because  $\beta$ -catenin is the cytoplasmic partner of VE-Cadherin. It can be suggested that activation of  $\beta$ -catenin induced instability of cytoskeleton leading to the disruption of VE-cadherin, and its release at higher levels in non-responders in our study Further studies are required to provide support to this hypothesis.

Finally, we demonstrate that favorable clinical outcomes was observed in patients with negative variation of sVE level after the first cycle of immunotherapy suggesting that sVE might be an early biomarker of clinical interest for the prediction of response to immunotherapy.

## BIBLIOGRAPHY

1. Mahabeleshwar GH, Byzova TV. Angiogenesis in Melanoma. *Semin Oncol.* déc 2007;34(6):555-65.
2. Kaufman HL, Margolin K, Sullivan R. Management of Metastatic Melanoma in 2018. *JAMA Oncol.* 1 juin 2018;4(6):857.
3. Schachter J, Ribas A, Long GV, Arance A, Grob J-J, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet Lond Engl.* 21 oct 2017;390 (10105):1853-62.
4. Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Bröcker EB, Ruiters DJ, de Waal RM. Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res.* août 1997;7 Suppl 2:S19-26.
5. Dewing D, Emmett M, Pritchard Jones R. The Roles of Angiogenesis in Malignant Melanoma: Trends in Basic Science Research over the Last 100 Years. *ISRN Oncol.* 2012;2012:546927.
6. Rochefort P, Chabaud S, Pierga J-Y, Tredan O, Brain E, Bidard F-C, et al. Soluble VE-cadherin in metastatic breast cancer: an independent prognostic factor for both progression-free survival and overall survival. *Br J Cancer.* janv 2017;116(3):356-61.
7. Polena H, Creuzet J, Dufies M, Sidibé A, Khalil-Mgharbel A, Salomon A, et al. The tyrosine-kinase inhibitor sunitinib targets vascular endothelial (VE)-cadherin: a marker of response to antitumoural treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* mai 2018;118(9):1179-88.
8. Vilgrain I, Sidibé A, Polena H, Cand F, Mannic T, Arboleas M, et al. Evidence for Post-Translational Processing of Vascular Endothelial (VE)-Cadherin in Brain Tumors: Towards a Candidate Biomarker. *Boulton ME, éditeur. PLoS ONE.* 16 déc 2013;8(12):e80056.
9. Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma: Angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* juin 2003;3(6):411-21.
10. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature.* juill 2015;523(7559):231-5.





**Figure 1:** A, sVE-cadherin level according to group stage melanoma and healthy donors (HD). B, sVE-cadherin level according to response immunotherapy at T0. C, Variation of sVE-cadherin level over time in responders after one cycle of immunotherapy. D, Variation of sVE-cadherin level over time in non responder to immunotherapy after one cycle of immunotherapy. E, Variation of sVE-cadherin (T1/T0) according to response to immunotherapy. F, Impact of variation of VE-cadherin after one cycle of immunotherapy on progression-free survival, assessed by the Kaplan-Meier

# DONNEES SUPPLEMENTAIRES

L'article est en cours de soumission dans le Journal BJC.

Les résultats de notre article ont été synthétisés permettant d'illustrer les principales données de notre étude. En effet, notre travail a été réalisé sur 3 cohortes avec un effectif plus important permettant d'identifier des résultats supplémentaires que nous détaillerons ci-dessous.

## 1. MATERIEL ET METHODES :

### 1.1 Patients

Nous avons étudié trois cohortes de patients suivis dans le service de dermatologie du CHU de Grenoble.

#### 1.1.1 Première cohorte :

Notre première cohorte était constituée de 34 patients pour lesquels une exérèse récente de mélanome avait été réalisée. Chacun des patients était admis dans le service de dermatologie entre Avril 2015 et Juillet 2017 pour poursuivre la prise en charge selon les recommandations de l'AJCC (bilan d'extension clinique et paraclinique suivi d'une reprise chirurgicale du mélanome). Notre étude comportait 15 femmes et 18 hommes, les caractéristiques de notre cohorte sont détaillées dans le tableau suivant (tableau 1). L'âge médian était de 63 ans et 6 mois. L'indice de Breslow médian était de 2.64 mm. Le délai moyen entre l'exérèse millimétrique du mélanome et le dosage de la VE-cadhérine soluble était de 27 jours. 28 mélanomes au stade localisé (IA à IIC) versus 6 mélanomes au stade métastatique (IIIA à IV) avaient été diagnostiqués dans cette première cohorte de patients.

| <b>Table 1. Caractéristiques cliniques de la population d'étude ( N= 34)</b>                      |          |             |
|---|----------|-------------|
|   | nombre   | pourcentage |
| <b>Age (années)</b>   |          |             |
| médiane   | 63,5     |             |
| valeurs extrêmes  | (42-85)  |             |
| <b>Indice de Breslow (mm)</b>   |          |             |
| <1  | 2        | 6%          |
| 1 à 2   | 18       | 53%         |
| 2 à 4   | 10       | 29%         |
| > 4   | 4        | 11%         |
| médiane   | 2,64     |             |
| valeurs extrêmes  | (0,1-13) |             |
| <b>Présence ou non d'une ulcération</b>   |          |             |
| oui   | 13       | 38%         |
| non   | 21       | 61%         |
| <b>Taux de LDH (UI/L)</b>   |          |             |
| <215  | 17       | 50%         |
| >215  | 17       | 50%         |
| <b>Présence ou non d'emboles vasculaires</b>  |          |             |
| oui   | 2        | 6%          |
| non   | 23       | 67%         |
| pas d'information   | 9        | 26%         |
| <b>Présence ou non d'un envahissement du ganglion sentinelle</b>                                  |          |             |
| oui   | 6        | 18%         |
| non   | 23       | 67%         |
| pas d'information   | 5        | 14%         |
| <b>Délai (jours) entre l'exérèse initiale du mélanome et le dosage de la VE-cadhérine soluble</b> |          |             |
| médiane   | 27       |             |
| valeurs extrêmes  | (6-58)   |             |
| <b>Présence ou non de cellules tumorales après la reprise chirurgicale de mélanome</b>            |          |             |
| oui   | 4        | 12%         |
| non   | 30       | 88%         |
| <b>Classification AJCC du mélanome</b>  |          |             |
| Stade AJCC compris entre IA à IIC   | 28       | 82%         |
| Stade AJCC compris entre IIIA à IV  | 6        | 18%         |

**Tableau 1-** Caractéristiques cliniques et histologiques de la première population d'étude.

### 1.1.2 Deuxième cohorte :

Notre deuxième cohorte était constituée de 21 patients dont 9 femmes et 12 hommes atteints de mélanome métastatique stade IIIC et IV traités au CHU de Grenoble dans le service de dermatologie et suivis de Décembre 2015 à Juin 2018. Les caractéristiques de notre cohorte sont détaillées dans le tableau suivant (tableau 2). L'âge médian était de 70 ans.

| Table 2 . Patients characteristics ( N= 21) |          |              |                          |
|---|----------|--------------|--------------------------|
| Patients                                    | Sexe     | Age (années) | Traitement               |
| 17MEL064                                    | Féminin  | 56           | pembrolizumab            |
| 17MEL070                                    | Masculin | 64           | nivolumab                |
| 17MEL144                                    | Féminin  | 54           | pembrolizumab            |
| 16MEL040                                    | Masculin | 63           | nivolumab                |
| 16MEL041                                    | Féminin  | 77           | pembrolizumab            |
| 17MEL061                                    | Féminin  | 73           | pembrolizumab            |
| 17MEL066                                    | Masculin | 51           | pembrolizumab            |
| 16MEL058                                    | Masculin | 77           | nivolumab-<br>icilimumab |
| 16MEL042                                    | Féminin  | 56           | nivolumab                |
| 16MEL056                                    | Masculin | 70           | nivolumab                |
| 17MEL072                                    | Masculin | 73           | pembrolizumab            |
| 17MEL089                                    | Masculin | 63           | pembrolizumab            |
| 17MEL134                                    | Masculin | 78           | nivolumab                |
| 17MEL086                                    | Masculin | 82           | pembrolizumab            |
| 17MEL107                                    | Masculin | 66           | pembrolizumab            |
| 17MEL125                                    | Masculin | 60           | pembrolizumab            |
| 17MEL135                                    | Féminin  | 82           | pembrolizumab            |
| 17MEL110                                    | Féminin  | 84           | nivolumab                |
| 18MEL 27                                    | Féminin  | 61           | pembrolizumab            |
| 18MEL33                                     | Masculin | 76           | pembrolizumab            |
| 18MEL 29                                    | Masculin | 74           | pembrolizumab            |

**Tableau 2-** Caractéristiques cliniques de la deuxième population d'étude.

Les critères d'inclusion étaient un âge supérieur à 18 ans, la présence de métastases de mélanomes inopérables, l'absence préalable de traitement systémique dans le cadre de la prise en charge du mélanome, l'absence de comorbidité contre-indiquant l'introduction d'une immunothérapie.

L'ensemble des patients ont été traités par immunothérapie (nivolumab OPDIVO ® ou pembrolizumab KEYTRUDA ®). 14 patients ont été traités par pembrolizumab à la posologie de 2 mg/kg toutes les 3 semaines, 6 patients ont été traités par nivolumab à 3 mg/kg toutes les 2 semaines, un patient a été traité par l'association nivolumab (1 mg/kg toutes les 3 semaines) combiné à l'ipilimumab (3 mg/kg toutes les 3 semaines) pendant 4 cures puis en relai par nivolumab 3 mg/kg toutes les 2 semaines.

Les évaluations cliniques et paracliniques des patients étaient réalisées à trois mois après le début du traitement. Ces évaluations ont permis de classer les patients en deux groupes par rapport à la réponse à trois mois : 13 patients répondeurs et 8 patients non répondeurs.

Le groupe « répondeur » correspondait au groupe de patients n'ayant pas présenté de signes de progression clinique ou scannographique. La réponse scannographique était réalisée selon les critères du RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors). Les critères de réponse complète (RC), réponse partielle (RP) ou stabilité de la maladie (SD) ont permis de placer les patients dans le groupe répondeur. Une réponse complète correspondait à une disparition de toutes les lésions cibles et une dimension inférieure à 10 mm de petit axe pour tous les ganglions. En revanche, une réponse partielle était définie comme la diminution d'au moins 30 % de la somme des diamètres des lésions cibles par rapport à la somme initiale des diamètres (39).

Le groupe « non répondeur » correspondait au groupe de patients ayant présenté une progression clinique ou scannographique selon les critères RECIST, ou un décès lié à la maladie en cours de traitement (43). Une progression clinique correspondait à une augmentation supérieure ou égale à 20 % de la somme des diamètres des lésions cibles par rapport à la plus petite somme des diamètres observée durant l'étude. L'apparition d'une ou plusieurs nouvelles cibles tumorales était également considérée comme une progression.

L'ensemble des patients inclus dans les deux cohortes ont donné leur consentement oral et écrit après information claire loyale et appropriée, avant le début de l'étude.

### 1.1.3 Troisième population d'étude :

Notre troisième cohorte constituée de 24 donneurs sains a été recueillie à l'Etablissement Français du Sang à Grenoble. L'ensemble de cette cohorte était anonymisée. L'étude a été approuvée par l'EFS et chaque participant a remis un consentement éclairé et écrit.

### 1.2 Prélèvements biologiques

Des prélèvements de sang périphérique sur tubes héparinés ont été pratiqués sur chaque patient. Un seul prélèvement a été effectué pour les patients de notre première cohorte lors de leur venu en Hôpital de jour pour la réalisation de leur bilan d'extension.

Dans le cadre de notre deuxième cohorte, un prélèvement sanguin a été réalisé avant la première cure d'immunothérapie puis avant chaque cure d'immunothérapie sur une période de 3 mois. Seulement 16 patients ont bénéficié d'un deuxième prélèvement sanguin avant leur 2<sup>ème</sup> cure et 11 patients d'un troisième prélèvement sanguin avant leur 3<sup>ème</sup> cure d'immunothérapie.

Ces prélèvements étaient acheminés au laboratoire de recherche et développement (EFS RA INSERM 1209, CNRS UMR 5309) pour être traités le jour même ou au plus tard dans les vingt-quatre heures après le prélèvement. Chaque plasma a été obtenu après centrifugation pendant 10 minutes à température ambiante et conservé congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

### 1.3 Technique par ELISA

Le dosage de la VE-cadhérine soluble a été réalisé dans le service du Dr Vilgrain. Une technique ELISA sandwich associant un anticorps monoclonal de capture de l'antigène et un anticorps polyclonal de révélation a été utilisé. L'anticorps monoclonal de capture a été pré absorbé sur une microplaque de 96 puits pendant une nuit à 4°C. Après une heure d'incubation à température ambiante avec 100µL de tampon de saturation, 3 séries de lavages et la réalisation d'une gamme d'étalonnage (2,5 à 40,0 ng/mL), l'ajout de 100µL d'échantillon de sérum humain a été réalisé. Après une incubation de 2 heures, les substances non liées ont été éliminées par lavage. 100 µL d'anticorps de révélation (IgG anti-Cad3) ont été ajoutés pendant 1 heure. Après un lavage, 100 µL d'une immunoglobuline de chèvre anti-lapin marquée à la biotine ont été ajoutés. Après 1 heure d'incubation suivie d'un lavage, 100 µL de streptavidin-alkaline phosphatase ont été rajoutés pendant 30 minutes. Après lavage, 200 µL du substrat (pNPP) ont été ajoutés. La réaction d'hydrolyse du substrat s'est développée de manière proportionnelle au taux de sVE-cadhérine pendant 30 minutes et la réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout de NaOH 3N. L'absorbance est lue à 405 nm par un lecteur de microplaques (Benchmark, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californie) et un logiciel compatible (Microplate Manager 5.2, Bio-Rad). Toutes les analyses ont été effectuées en duplicat.

#### 1.4 Traitement analytique des données

Les calculs ont été effectués indépendamment. Les données brutes (DO) mesurées par le lecteur de plaques ont été représentées en fonction de la concentration standard nominale pour construire les courbes d'étalonnage standard. Ces valeurs ont été interpolées à partir de ces courbes en utilisant une régression linéaire non pondérée des données. Tout au long de l'étude, les CV des normes ont été de 1% à 20%. Aucune réactivité croisée entre la sVE-cadhérine et d'autres molécules d'adhésion n'a été trouvée en utilisant ce test. Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires. Le plasma du patient (5 µL) a été dilué à une dilution de 1:50 dans du PBS contenant 0,5% de Triton X100. Les concentrations sériques individuelles de sVE-cadhérine sont rapportées en ng/mL. Ce test ELISA a été validé par SANOFI en terme de critères de répétabilité, reproductibilité, sensibilité et spécificité.

#### 1.5 Analyses statistiques des données

Les caractéristiques de chaque population d'études sont décrites ci-dessus. Les variables quantitatives étaient décrites par leur médiane (extrêmes).

Les tableaux de données ont été générés sous Excel après le dosage de la sVE-cadhérine. Les calculs ont été effectués indépendamment. Les analyses statistiques ont été effectuées sous le logiciel Graphpad Prism en utilisant un test statistique de Mann-Whitney (non paramétrique, non appariés ou non paramétrique, appariés) avec une p-value < 0.05. Pour les comparaisons groupées, un test statistique de Kruskal-Wallis (non paramétrique, non appariés) a été utilisé avec p-value : < 0.05 (\*), < 0.01 (\*\*), et < 0.001 (\*\*\*). Enfin, pour déterminer le taux de survie sans progression en fonction des différents facteurs pronostiques, du taux de sVE-cadhérine, une méthode par Kaplan-Meier a été réalisée.



## 2. **RESULTATS :**

Dans ce travail, nous avons étudié les corrélations potentielles entre le taux de sVE-cadhérine et les facteurs pronostiques du mélanome à savoir l'indice de Breslow, l'ulcération et le taux de LDH, afin de déterminer si la sVE-cadhérine était un facteur pronostique indépendant.

Nous avons également examiné si le taux de sVE-cadhérine était un biomarqueur prédictif de réponse au traitement par immunothérapie en analysant les groupes des patients répondeurs et non répondeurs. Plusieurs analyses statistiques ont été réalisées et décrites ci-dessous.

### 2.1 Analyses statistiques de la première cohorte

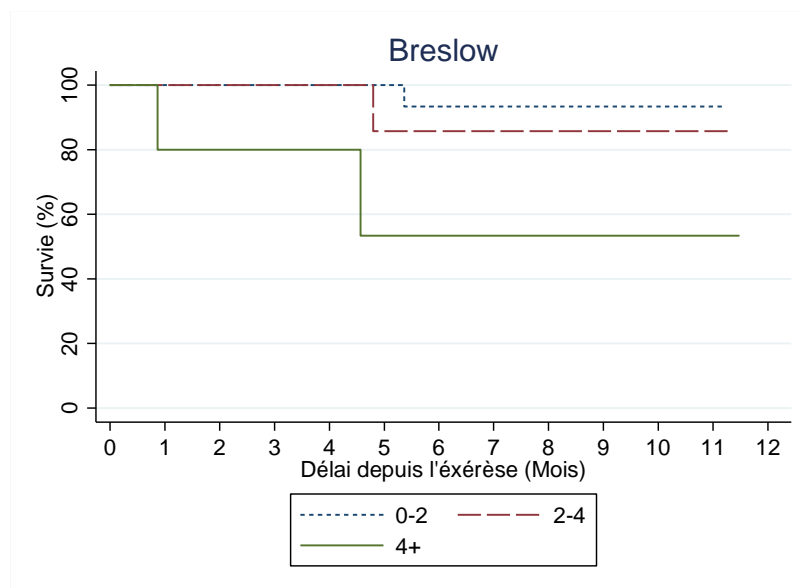
#### 2.1.1 Analyse de la survie sans progression en fonction des critères pronostiques du mélanome

Nous avons dans un premier temps étudié la survie sans progression en fonction des facteurs pronostiques connus du mélanome à savoir l'indice de Breslow, l'ulcération et le taux de LDH.

La survie sans progression a été définie comme le temps écoulé entre l'inclusion et la date de tout premier événement observé par patient : soit la première documentation de la progression du mélanome, soit la date du décès ou la date du dernier suivi. Les données de survie ont été évaluées par la méthode de Kaplan-Meier.

### 2.1.1.1 Indice de Breslow

Selon les recommandations de l'AJCC, trois sous-groupes de taille comparable en termes de valeur de Breslow ont été comparés à la survie sans progression : un groupe dont l'indice de Breslow était compris entre 0 et 2 mm, un groupe avec un indice de Breslow compris entre 2,1 et 4 mm et un dernier groupe avec un indice de Breslow strictement supérieur à 4 mm.

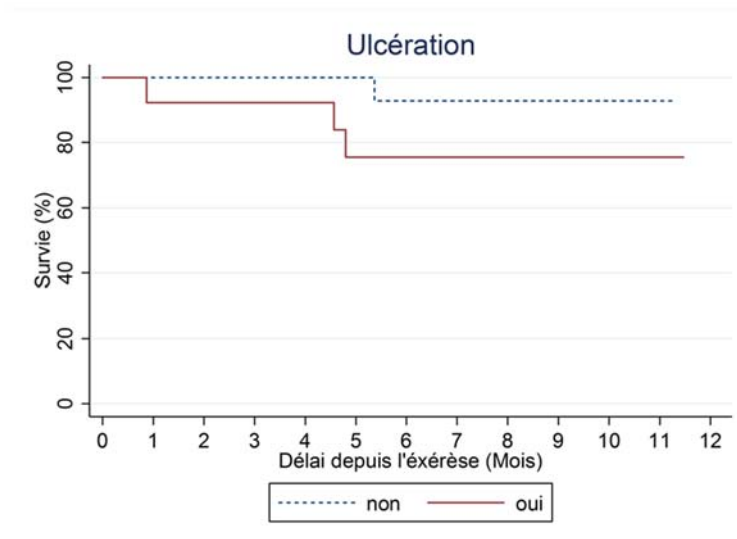


**Figure 5-** Analyse de la survie sans progression en fonction de l'indice de Breslow (mm) selon la méthode de Kaplan-Meier.

Nous constatons sur ce graphique que le taux de survie sans progression est corrélé de manière significative à l'indice de Breslow ; plus l'indice de Breslow est élevé, plus le risque de survenue d'une récurrence du mélanome ou d'un décès est élevé.

### 2.1.1.2 Ulcération

Nous avons effectué deux groupes : un groupe de 13 patients ne présentant pas de signe d'ulcération sur l'examen histopathologique de la pièce de mélanome et un groupe de 21 patients avec la présence de signes d'ulcération histologiques.



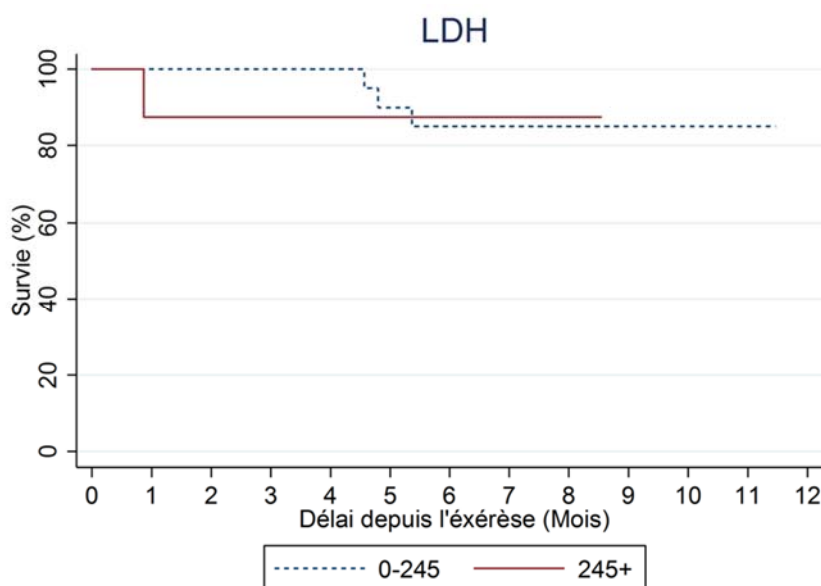
**Figure 6-** Analyse de la survie sans progression en fonction de la présence ou non d'ulcération selon la méthode de Kaplan-Meier.

Nous constatons sur ce graphique que le taux de survie sans progression est corrélé de manière significative à la présence ou non d'une ulcération ; en présence d'une ulcération, la survie sans progression des patients est réduite.

Ces informations sont concordantes avec les données de la littérature.

### 2.1.1.3 Taux de LDH

En l'absence d'hypothèses concernant un seuil hypothétique du taux de LDH, deux groupes de patients ont été identifiés selon la valeur de la normale supérieure de LDH lors de leur première venue au CHU de Grenoble dans le service de Dermatologie. La valeur de la normale supérieure de LDH était de 245 UI/L.



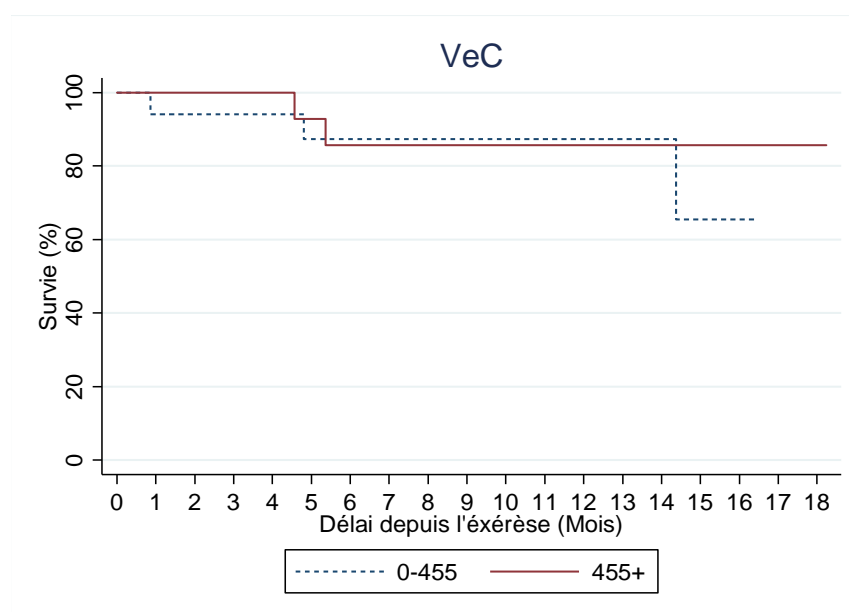
**Figure 7-** Analyse de la survie sans progression en fonction du taux de LDH (UI/l) selon la méthode de Kaplan-Meier.

L'étude du graphique ne met pas en évidence de différence statistiquement significative entre le taux de LDH et la survie sans progression des patients atteints de mélanome.

### 2.1.2 Analyse de la survie sans progression en fonction du taux de VE-cadhérine soluble

Le taux de sVE-cadhérine a été comparé aux différents paramètres pronostiques décrits comme étant pertinents dans le mélanome et confirmés dans notre étude ci-dessus.

En l'absence d'hypothèses concernant un seuil hypothétique du taux de sVE-cadhérine, nous avons réalisé deux groupes de taille comparable utilisant la médiane de la sVE-cadhérine soit un cut-off égal à 455 ng/mL. Les courbes de survie ont été établies en fonction du niveau initial de sVE-cadhérine et comparées en utilisant un test de Log-rank.

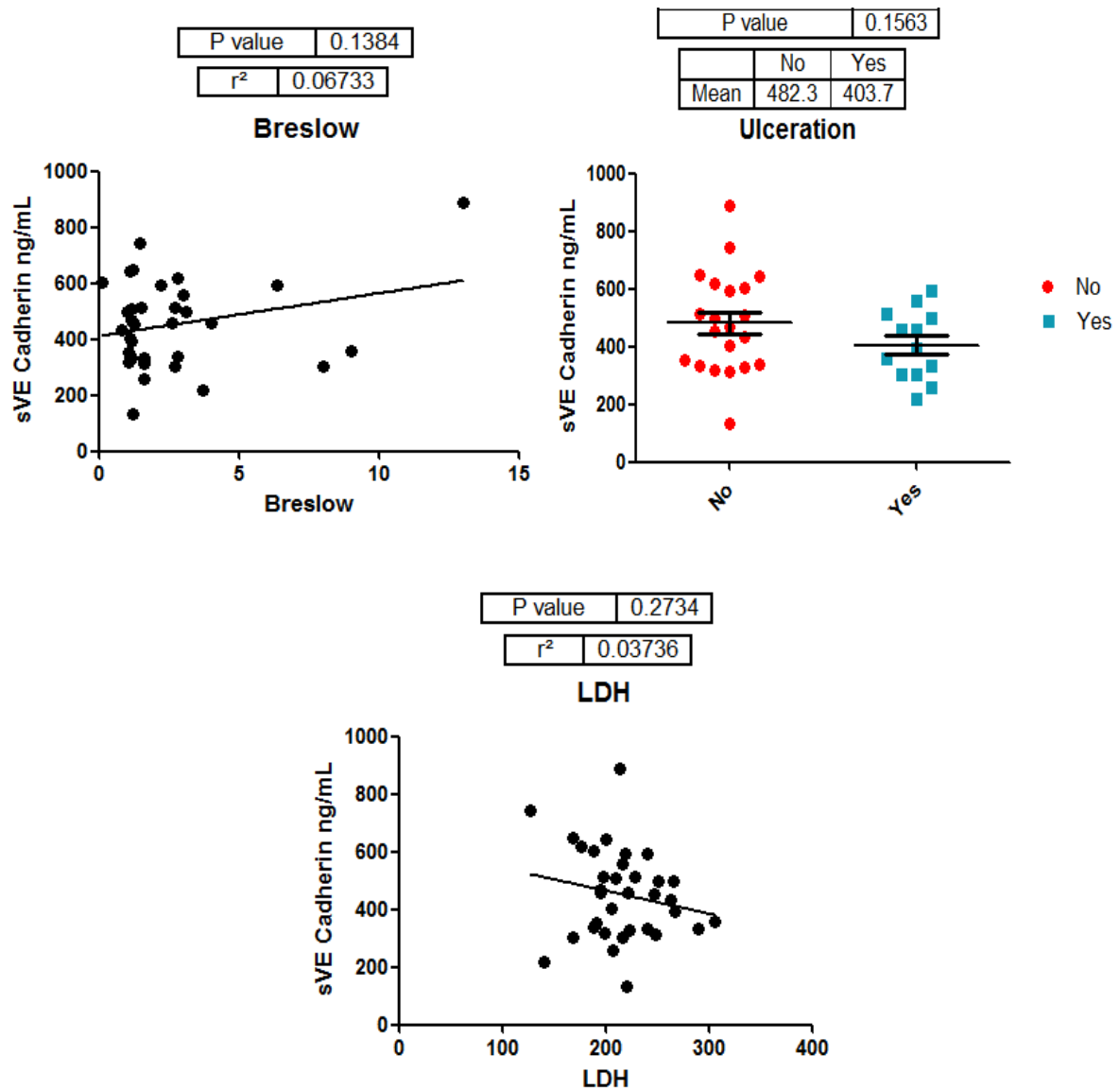


**Figure 8-** Analyse de la survie sans progression en fonction du taux de sVE-cadhérine (ng/mL).

Sur ces deux graphiques, nous n'identifions pas de corrélation entre le taux de sVE-cadhérine et la survie sans progression. Le taux de sVE-cadhérine initial ne semble pas être un facteur pronostique indépendant dans la survie globale chez les patients atteints d'un mélanome.

### 2.1.3 Corrélation du taux de VE-cadhérine soluble avec l'indice de Breslow, l'ulcération et le taux de LDH

Nous avons étudié l'existence ou non d'une corrélation entre le taux de sVE-cadhérine et les différents facteurs pronostiques connus du mélanome à savoir l'indice de Breslow, la présence ou non d'une ulcération et le taux de LDH.



**Figure 9-** Analyse du taux de sVE-cadhérine (ng/mL) en fonction de l'indice de Breslow (mm), de la présence ou non d'une ulcération et du taux de LDH (UI/L).

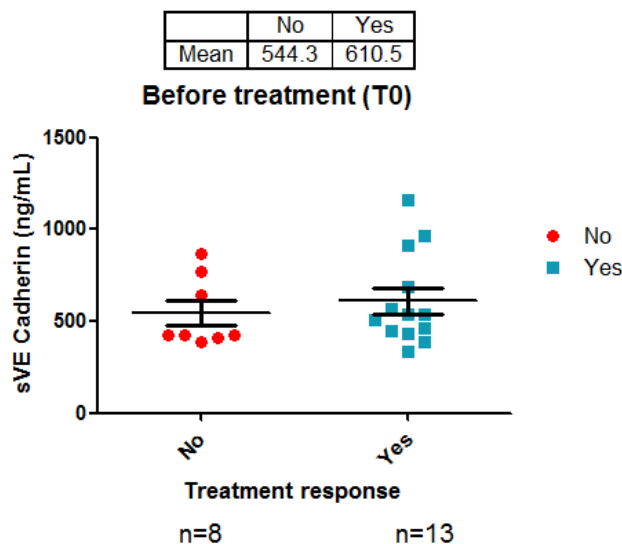
Le taux de sVE-cadhérine n'est pas significativement corrélé à l'indice de Breslow ( $p = 0,138$ ), à la présence ou non d'une ulcération ( $p = 0,156$ ) et au taux de LDH ( $p = 0,84$ ).

Dans ce modèle, le taux de sVE-cadhérine soluble n'a pas démontré être un facteur pronostique indépendant. Il n'existe pas de corrélation entre la sVE-cadhérine et les différents marqueurs pronostiques du mélanome.

## 2.2 Analyses statistiques de la deuxième cohorte

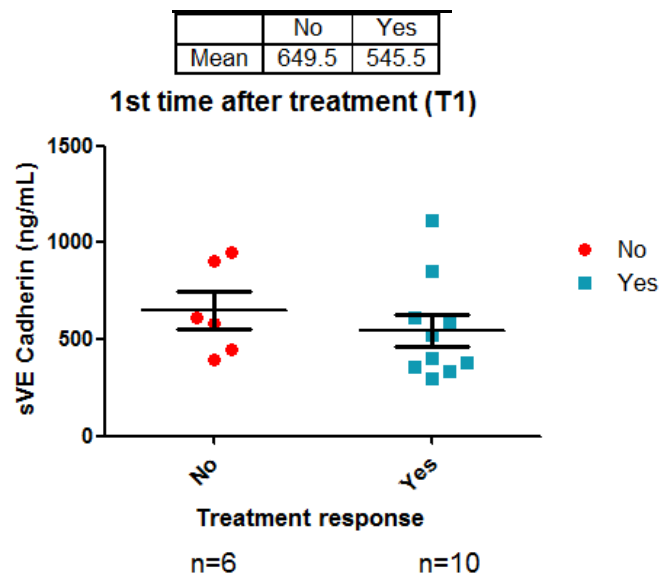
### 2.2.1 Taux de sVE-cadhérine à T0 et T1 par rapport à la réponse au traitement

Notre deuxième cohorte était composée de 21 patients pour lesquels un prélèvement sanguin avait été réalisé avant la 1ère perfusion d'immunothérapie (à T0). 8 patients étaient répondeurs et 13 patients étaient non répondeurs au traitement à l'évaluation paraclinique après 3 mois d'immunothérapie. Le taux moyen de sVE-cadhérine était respectivement de 544.3 ng/mL et de 610.5 ng/mL chez les patients non répondeurs et répondeurs au traitement. Les analyses statistiques n'ont pas mis en évidence de différence statistiquement significative entre le taux de sVE-cadhérine à T0 chez les patients répondeurs et non répondeurs ( $p=0.36$ ) (Figure 10).



**Figure 10-** Analyse du taux de sVE-cadhérine à T0 chez les patients répondeurs et non répondeurs à l'immunothérapie ( $p=0,36$ ).

Le prélèvement sanguin avant la 2ème cure d'immunothérapie (T1) a pu être réalisé chez 16 patients. 6 patients se sont avérés répondeurs et 10 patients non répondeurs au traitement après 3 mois d'immunothérapie. Le taux moyen de sVE-cadhérine était de 649.5 ng/mL chez les patients non répondeurs et de 545.5 ng/mL chez les patients répondeurs au traitement. Les analyses statistiques n'ont également pas mis en évidence de différence statistiquement significative entre le taux de sVE-cadhérine à T1 chez les patients répondeurs et non répondeurs ( $p=0.26$ ) (Figure 11).



**Figure 11-** Analyse du taux de sVE-cadhérine à T1 chez les patients répondeurs et non répondeurs à l'immunothérapie ( $p=0,26$ ).

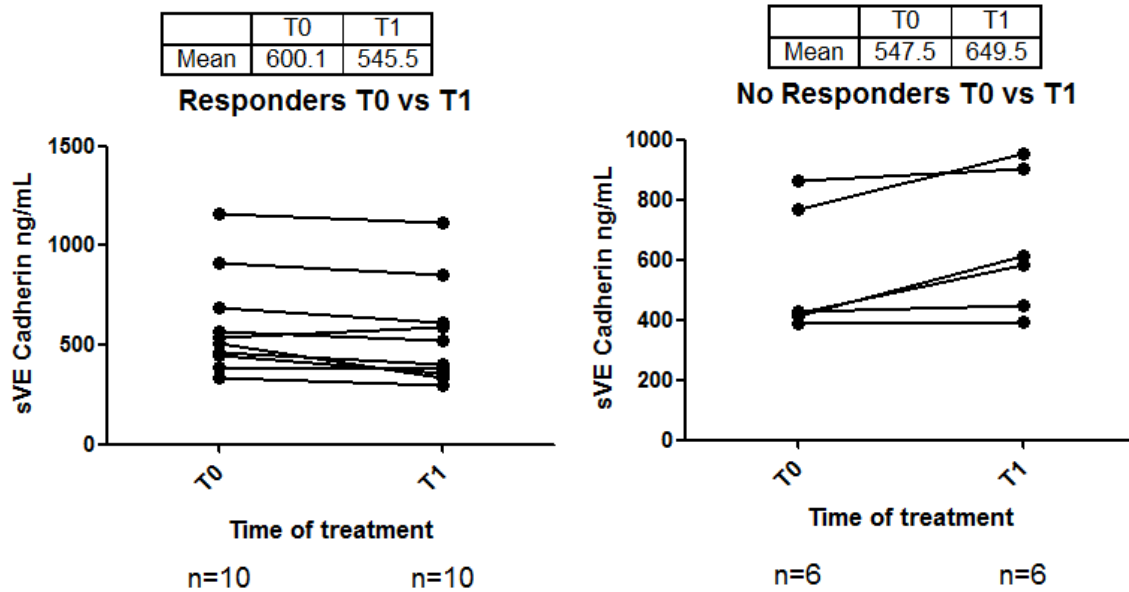
Au total, ces données ne montrent pas de différence statistiquement significative entre le taux de sVE-cadhérine à T0 et à T1 chez les patients répondeurs ou non au traitement par immunothérapie à 3 mois. A un temps donné, le dosage de la sVE-cadhérine ne semble pas être un marqueur prédictif de réponse au traitement. Aucune différence n'est constatée à T0 et à T1 entre les deux groupes de patients répondeurs ou non à l'immunothérapie.

Ces données nous ont amener à étudier la variation du taux de sVE-cadhérine au cours du traitement par immunothérapie.



### 2.2.2 Evolution du taux de sVE-cadhérine à court terme après un cycle d'immunothérapie

La variation du taux de sVE-cadhérine a été étudiée entre les deux premières cures d'immunothérapie chez 16 patients dont 10 patients étaient répondeurs et 6 patients étaient non répondeurs aux traitements.



**Figure 12-** Représentation statistique de la variation de la sVE-cadhérine (ng/mL) au cours du temps chez les patients répondeurs ( $p=0,0195$ ) et les patients non répondeurs ( $p=0,03$ ).

Nous constatons une variation significative du taux de sVE-cadhérine entre les deux groupes de patients après une cure d'immunothérapie ; le taux de sVE-cadhérine a diminué ( $p=0.01$ ) chez les patients répondeurs et augmenté chez les patients non répondeurs au traitement ( $p=0.03$ ) (Figure 12).

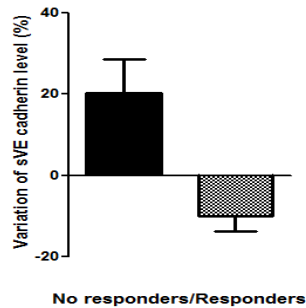
La variation du taux de sVE-cadhérine chez les patients répondeurs correspond à une diminution de 10.11% versus une augmentation de 20.34% chez les patients non répondeurs comme indiqué sur les analyses statistiques ci-après (Figure 13).

|      | No    | Yes    |
|------|-------|--------|
| Mean | 20.34 | -10.11 |

**Ratio (T1-T0)/T0\*100**

NR                      R

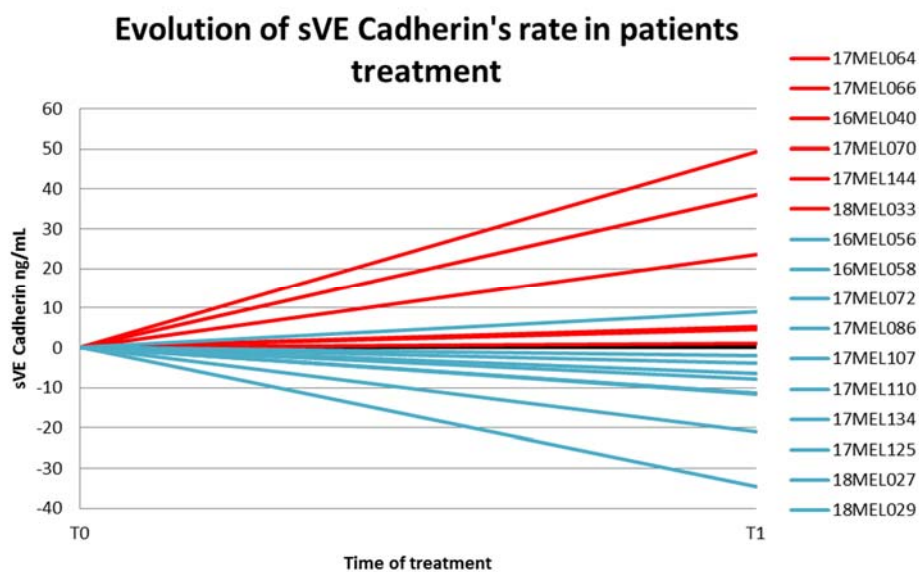
n=6                      n=10



**Figure 13-** Représentation du ratio T1/T0 du taux de sVE-cadhérine (ng/mL) par rapport à la réponse au traitement (p=0,0017).

La variation du taux de sVE-cadhérine a également été représentée sur la Figure 14. Nous constatons une augmentation du taux de sVE-cadhérine après un cycle d'immunothérapie chez les 6 patients non répondeurs au traitement à 3 mois ( courbes en rouge) et une diminution de ce taux chez 8 patients sur 10 répondeurs au traitement (courbes en bleu).

L'ensemble de ces données démontrent que la variation du taux de sVE-cadhérine après une cure d'immunothérapie est statiquement corrélée à la réponse au traitement à 3 mois.

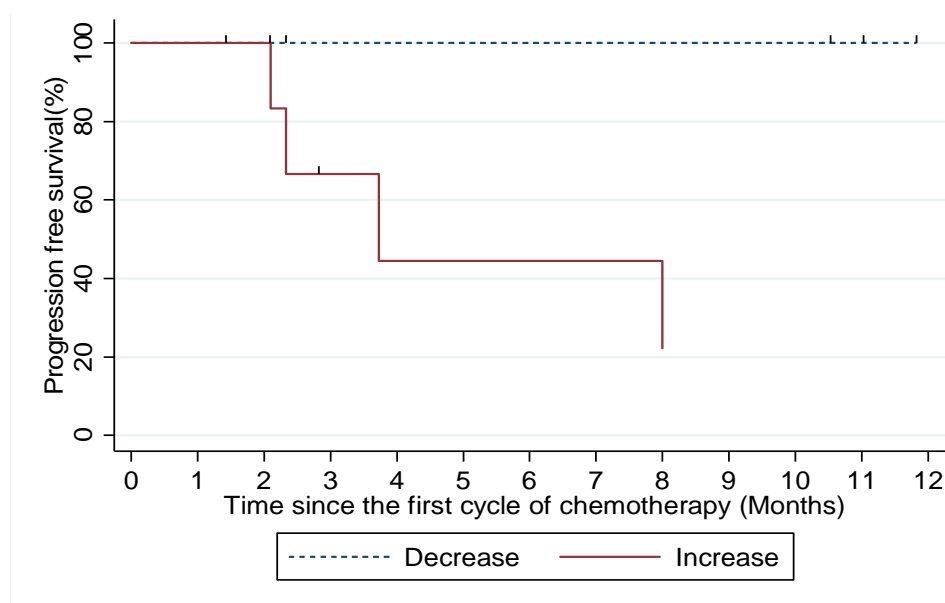


**Figure 14-** Représentation graphique du taux de sVE-cadhérine après une cure d'immunothérapie chez les patients répondeurs (en bleu) et non répondeurs (en rouge).

### 2.2.3 Survie sans progression en fonction de la variation du taux de sVE-cadhérine après un cycle d'immunothérapie

Nous avons ensuite analysé la corrélation potentielle entre la variation des taux de sVE-cadhérine entre les deux cures et la survie sans progression. Comme précédemment, la survie sans progression a été définie comme le temps écoulé entre l'inclusion et la date de la première documentation de la progression du mélanome ou la date du décès ou la date du dernier suivi. Les données de survie ont été évaluées par la méthode de Kaplan-Meier.

Deux groupes de patients ont été identifiés selon la variation du taux de sVE-cadhérine au cours des deux premières cures d'immunothérapie : un groupe de 6 patients présentant une diminution du taux et un second groupe de 10 patients présentant une augmentation du taux de sVE-cadhérine. Chaque nouvel évènement de progression ou date de décès ou date du dernier suivi a été identifié par un trait vertical. Le délai moyen de suivi des deux groupes a été de 6 mois et demi.

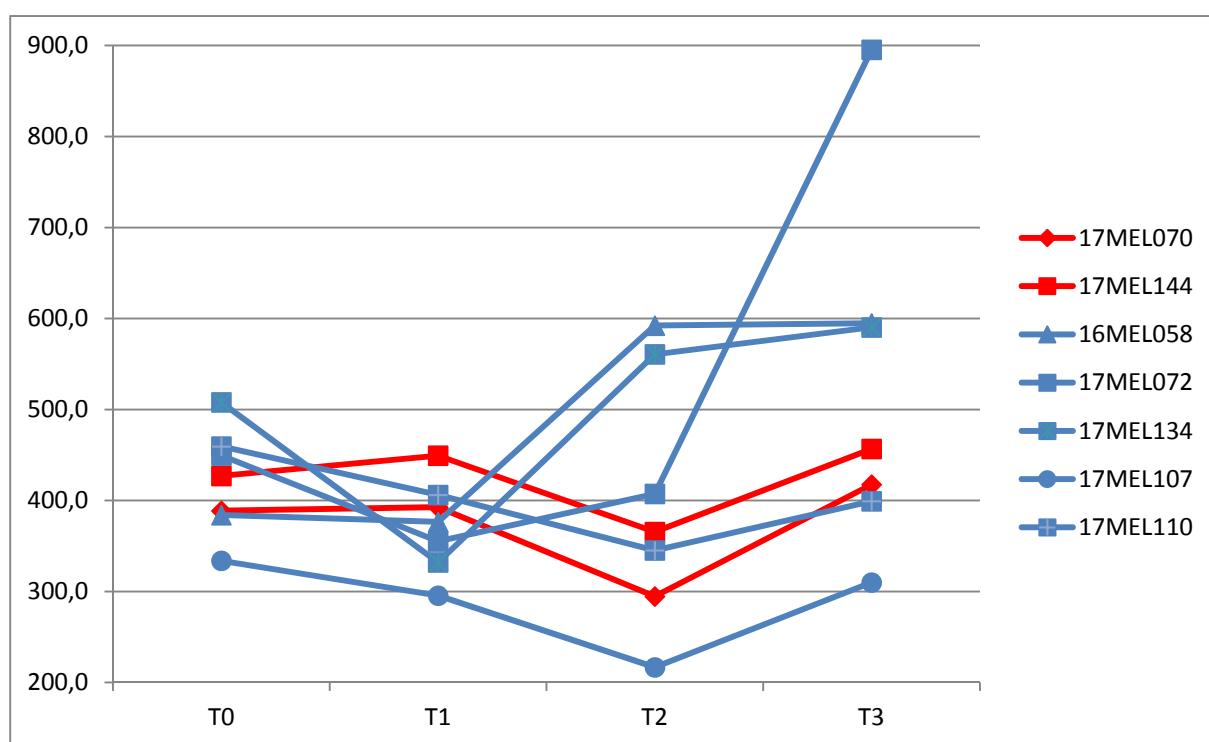


**Figure 15-** Représentation de la survie sans progression calculée par la méthode de Kaplan Meier selon la variation du taux de sVE-cadhérine après une cure d'immunothérapie.

Nous constatons sur la figure 14 que le taux de survie sans progression est corrélé de manière significative à la variation du taux de sVE-cadhérine. En effet, une diminution du taux de sVE-cadhérine entre la cure 1 et la cure 2 est corrélé à une progression plus lente de la maladie alors qu'une augmentation de sVE-cadhérine est de mauvais pronostique.

#### 2.2.4 Evolution du taux de sVE-cadhérine à long terme

Nous avons étudié l'évolution du taux de sVE-cadhérine après 3 cures d'immunothérapie. Le dosage de la sVE-cadhérine a été réalisé chez 7 patients avant les 3 premières cures et un 4<sup>ème</sup> prélèvement avant la réalisation de la 4<sup>ème</sup> cure d'immunothérapie. 2 patients (courbes rouges) étaient non répondeurs et 5 patients (courbes bleues) étaient répondeurs au traitement.



**Figure 16-** Evaluation du taux de sVE-cadhérine au cours du temps.

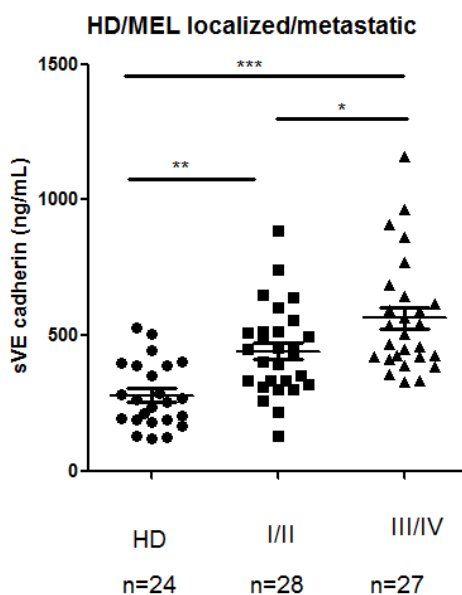
Nous constatons une variabilité du taux de sVE-cadhérine au cours des 3 cures d'immunothérapie dans les deux cohortes de patients.

L'analyse du taux de sVE-cadhérine à plus long terme ne semble pas être un biomarqueur prédictif de réponse à l'immunothérapie.

### 2.2.5 Etude du taux de sVE-cadhérine selon le stade du mélanome, comparés aux donneurs sains

Notre travail a été réalisé sur trois cohortes de patients avec au total 24 donneurs sains, 28 patients atteints de mélanome au stade localisé et 27 patients atteints de mélanome au stade métastatique selon l'AJCC.

Nous avons cherché à identifier et comparer le taux de sVE-cadhérine dans chacun de ces groupes.



**Figure 17-** Représentation statistique du taux moyen de sVE-cadhérine (ng/mL) dans chaque cohorte.

Comme illustré sur la figure 16, le taux de sVE-cadhérine des patients atteints de mélanome est significativement plus élevé que celui des donneurs sains et d'autant plus élevé que le stade du mélanome est avancé. En effet, le taux moyen de sVE-cadhérine est de 564.9 ng/mL chez les patients atteints d'un mélanome métastatique avant le début de l'immunothérapie versus 462.2 ng/mL chez les patients atteints d'un mélanome localisé versus 281 ng/mL chez les volontaires sains ( $p=0.0001$ ).

## DISCUSSION

Le mélanome métastatique est une maladie hétérogène au comportement clinique et biologique différent selon chaque patient. La prise en charge thérapeutique du mélanome à un stade précoce (stade I et II de l’AJCC) est essentiellement chirurgicale, avec un taux de guérison à 10 ans proche des 90%. Dans les formes plus avancées, le taux de guérison chute avec un taux de survie moyen à cinq ans à 30 % pour les stade III AJCC (44). Malgré l’avancée de nouvelles thérapies dans la prise en charge des patients atteints de mélanome métastatique inopérable, seule une partie des patients présente une bonne réponse au traitement par immunothérapie avec une survie globale augmentée. La mise en évidence d’un nouveau biomarqueur au niveau du sang périphérique semble être un défi dans la prise en charge du mélanome et permettrait d’anticiper la stratégie thérapeutique pour chaque patient. En effet, le sang représente une source probablement non négligeable de biomarqueurs dont la présence peut être le reflet du processus néoplasique chez un individu. Durant les différentes phases de la cancérogénèse, de nombreuses molécules sont sécrétées soit par les cellules tumorales soit par le micro environnement tumoral, soit par le système immunitaire ou l’action des traitements tels l’immunothérapie. Ces molécules sont ainsi libérées et peuvent diffuser jusqu’à la circulation sanguine où elles y sont potentiellement détectables. Le dosage de marqueurs sanguins circulants a pour principal avantage d’être une méthode peu invasive pour le patient, fiable et réalise sur un petit volume d’échantillon biologique. Le dosage de la sVE-cadhérine est réalisable en pratique quotidienne par un ELISA de type sandwich. La connaissance du micro environnement tumoral, de l’interaction des cellules tumorales, avec le réseau vasculaire de la tumeur sont des considérations fondamentales afin d’identifier un biomarqueur. La déstabilisation de la barrière endothéliale est une étape essentielle dans l’extravasation et la dissémination des cellules tumorales. Dans ce contexte, bien que non investiguée en onco-dermatologie, nous avons analysé le taux de VE-cadhérine soluble sérique chez les patients atteints de mélanome en

émettant l'hypothèse qu'elle pourrait être un biomarqueur potentiel prédictif et pronostique lié à l'angiogenèse tumorale. Très peu de publications rapportent la détection de la VE-cadhérine soluble sérique en tant que biomarqueur dans les tumeurs. Comme mentionné dans l'introduction, l'équipe d'Isabelle Vilgrain a mis en évidence un taux de VE-cadhérine soluble circulant comme biomarqueur dans le cadre du suivi des patients atteints de carcinome rénal métastatique sous sunitinib et de cancer du sein métastatique (39,40). Aucun travail sur la détection de la VE-cadhérine soluble n'a été réalisé dans le cadre du mélanome, tumeur richement vascularisée pour laquelle un nouveau biomarqueur semble nécessaire afin d'optimiser la prise en charge des patients.

L'ensemble de notre travail a été réalisé sur 3 cohortes de patients : un groupe constitué de 24 patients volontaires sains, un groupe constitué de 34 patients suivis au CHU de Grenoble dans le service de dermatologie dans le cadre d'une prise en charge initiale d'un mélanome (dont 6 patients d'emblée métastatiques) et un dernier groupe constitué de 21 patients atteints d'un mélanome métastatique inopérable sous immunothérapie.

- **Facteurs pronostiques**

Dans cette étude, nous avons confirmé les données de la littérature en mettant en évidence une corrélation entre l'indice de Breslow, l'ulcération et la survie sans progression des patients atteint d'un mélanome au stade localisé. En revanche, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre le taux de sVE-cadhérine sérique et les facteurs pronostiques connus dans le mélanome à savoir l'indice de Breslow, l'ulcération et le taux de LDH. Le taux de sVE-cadhérine n'est également pas corrélé à la survie sans progression chez les patients atteints d'un mélanome. Ainsi le taux de sVE-cadhérine semble donc être un facteur indépendant. Ces résultats sont en accord avec certaines données récentes de la littérature qui ont démontré que les cellules de mélanome non métastatique n'avaient pas la capacité phénotypique de perturber l'endothélium vasculaire après un contact direct avec celui-ci contrairement aux cellules de

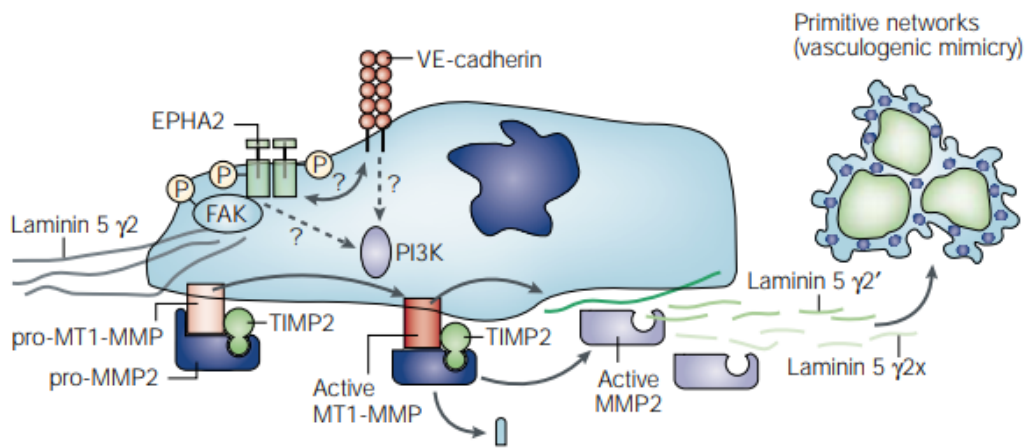


mélanome métastatique (45). Ces résultats suggèrent que les cellules de mélanome au stade localisé et les cellules de mélanome métastatiques interagissent avec l'endothélium par des mécanismes différents que nous détaillerons.

- **Mélanome métastatique**

Notre travail nous a permis de mettre en évidence des résultats intéressants chez les patients atteints de mélanome métastatique.

Premièrement, le taux de sVE-cadhérine chez les patients atteints de mélanome métastatique était plus élevé que chez les patients atteints d'un mélanome localisé (p-value <0.05). Ces résultats sont en accord avec l'étude de *Hendrix and al. (2001)* mettant en évidence une expression accrue de VE-cadhérine chez les patients atteints de mélanomes agressifs métastatiques. De plus, cette étude a démontré que les cellules de mélanome agressives avaient la capacité d'exprimer la VE-cadhérine, jusqu'alors connue pour n'être exprimée que par les cellules endothéliales. Les cellules de mélanomes agressives seraient donc capables de réaliser un mimétisme vasculogénique permettant le développement de néovaisseaux (46). Cette entité décrit la capacité des cellules de mélanome agressives à exprimer des gènes associés à l'endothélium et à former des réseaux vasculogéniques riches en matrice extracellulaire. Il implique plusieurs molécules de signalisation en cascade comprenant la VE cadhérine, l'EPHA2, la phosphatidylinositol3-kinase, la kinase d'adhésion focale, des métalloprotéinases matricielles et la chaîne laminine 5 $\gamma$ 2 (*Figure 17*).



**Figure 17-** Schéma représentatif de la cascade de signalisation du mimétisme vasculogénique dans les cellules de mélanome agressifs (46).

Par ailleurs, *Peng et al.* (2005) ont montré que les cellules de mélanome métastatique mises en contact direct avec une monocouche de cellules endothéliales étaient capables d'induire la phosphorylation de la VE-cadhérine après 45 minutes d'interaction entre les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales (47). Cette étude a été récemment confirmée en 2014 par *Zhang et al.* qui ont également démontré la capacité des cellules de mélanomes métastatiques à induire la phosphorylation de la VE-cadhérine et déstabiliser les jonctions endothéliales (48). Les cellules cancéreuses métastatiques utilisent ainsi une combinaison de cytokines (IL8, IL-1 $\beta$ , TIMP 2, etc.), de facteurs pro-oncogènes et des voies de signalisation des récepteurs (VLA-4/VCAM-1) pour perturber la barrière endothéliale (48). L'activation des cytokines (IL8) et des voies de signalisation de leurs récepteurs conduit ainsi à l'activation de la protéine kinase Src qui a son tour phosphoryle la VE-cadhérine conduisant à la déstabilisation du complexe cadhérine/caténine et la dissociation des jonctions intercellulaires. Cependant, des études récentes ont démontré que la phosphorylation de la VE-cadhérine était nécessaire mais non suffisante à l'instabilité des jonctions intercellulaires (49). En effet, la contraction des cellules endothéliales et le remodelage du cytosquelette via la contraction de l'actomyosine sont également des étapes clés dans l'extravasation des cellules de mélanome.

L'ensemble de ces résultats montre la capacité du mélanome métastatique à acquérir un phénotype particulier lui permettant de réaliser un mimétisme vasculogénique et de former de

nombreuses jonctions intercellulaires via l'activation de nombreuses cascades de signalisation intracellulaires au sein des cellules endothéliales.

Dans ce travail, nous avons également constaté une variation du taux de sVE-cadhérine statistiquement significative entre les patients répondeurs ou non au traitement par immunothérapie au cours des 3 premiers mois. En effet, le taux de sVE-cadhérine diminue chez les patients répondeurs au traitement de manière significative ( $p=0.01$ ) et augmente de manière significative chez les patients non répondeurs ( $p=0.03$ ). Il existe deux principales hypothèses à ces résultats :

***- le taux de sVE-cadhérine reflète la masse tumorale***

L'hypothèse que nous avançons est que l'immunothérapie chez les patients répondeurs au traitement a permis de réduire la masse tumorale aboutissant à la réduction des contacts entre les cellules tumorales et les jonctions endothéliales. Par conséquent, ces changements biochimiques précoces détectés dans le sang périphérique pourraient être un indicateur dans la réduction ou non de la charge tumorale au cours des premières semaines de traitement. Si nous considérons que le taux de sVE-cadhérine reflète la masse tumorale, l'analyse de son taux précoce pourrait être utile pour identifier une pseudo progression qui correspond à une augmentation de l'infiltration de la tumeur par les cellules immunitaires avec un impact sur le volume global de la lésion tumorale sans augmentation cependant de la prolifération tumorale. Actuellement, l'analyse scannographique ne permet pas de différencier la pseudo progression d'une véritable progression tumorale. Ces résultats suggèrent l'hypothèse que des modifications du taux de sVE-cadhérine pourraient devenir un outil utile pour diagnostiquer et suivre la pseudo progression. Aucun cas de pseudo progression n'a été identifié dans notre cohorte de patients métastatiques sous immunothérapie. L'analyse d'une cohorte avec un effectif plus important semble nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

*- le microenvironnement immunitaire tumoral modifie la réceptivité à l'immunothérapie*

L'hypothèse que nous pouvons faire d'une part est que le microenvironnement tumoral a une influence sur la barrière endothéliale mais également sur l'efficacité de l'immunothérapie.

En effet, le développement des thérapeutiques anti tumorales dans le mélanome n'a cessé de croître et a permis de modifier considérablement le paysage thérapeutique avec l'arrivée des bloqueurs de point de contrôle immunitaire ou « immune checkpoints inhibitors » : les anti-PD-1 et anti-PD-L1. L'immunothérapie a permis d'améliorer le pronostic des patients mais on sait que certains patients n'ont pas de bénéfice durable voire ne tirent aucun bénéfice du traitement.

Des études ont démontré que les cellules de mélanome métastatique avaient la capacité de sécréter divers cytokines et récepteurs dans le microenvironnement tumoral avec pour finalité la phosphorylation de la VE-cadhérine, la disjonction des cellules endothéliales aboutissant à la dissémination des cellules tumorales par voie vasculaire. En effet, la composition du microenvironnement tumoral semble être un élément clé de la régulation de la barrière endothéliale mais également aurait un rôle dans la réceptivité à l'immunothérapie. Au cours de la progression tumorale, de nombreuses modifications du microenvironnement se font dont la sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires. Une étude publiée en 2015 a démontré que la modification intrinsèque de la  $\beta$ -caténine via un environnement tumoral inflammatoire a pour conséquence une diminution du recrutement des cellules dendritiques et donc une baisse de l'infiltration tumorale par les lymphocytes T (50). Par conséquent, la deuxième hypothèse que nous avançons est que la sVE-cadhérine via la modification intrinsèque de la  $\beta$ -caténine peut-être un marqueur de réponse au traitement. Comme précisé dans l'introduction, la  $\beta$ -caténine est une molécule du complexe d'adhésion permettant une forte interaction de la VE-cadhérine avec le cytosquelette d'actine donc participant à l'intégrité de l'endothélium vasculaire. En cas d'activation de la  $\beta$ -caténine, une instabilité du cytosquelette va se créer aboutissant à la

disjonction de la VE-cadhérine par les protéases de l'environnement, à la baisse de l'infiltration tumorale avec pour finalité une diminution de la réponse à l'immunothérapie.

- **Limites de l'étude**

- *Puissance de l'étude*

Dans notre étude, nous montrons que le dosage de la sVE-cadhérine pourrait être un marqueur pronostique précoce de réponse à l'immunothérapie chez les patients atteints d'un mélanome métastatique. Cependant, cette étude devra être complétée par d'autres travaux afin d'augmenter sa puissance pour une validation prospective. En effet, notre travail a porté sur une cohorte monocentrique de faible effectif avec tout de même des résultats très prometteurs.

- *Variabilité de la VE-cadhérine : hétérogénéité individuelle*

Enfin, nous avons remarqué une variabilité du taux de sVE-cadhérine à plus long terme chez les patients atteints de mélanome métastatique sous immunothérapie. Cette variation du taux de VE-cadhérine soluble peut être expliquée par la susceptibilité de cette protéine aux différentes protéases présentes dans l'environnement. En effet, il est connu que la protéine est sensible à la protéolyse sous l'action de protéase comme l'élastase, la cathepsine G dans des cellules en cultures (51). Au cours du développement tumoral et de sa vascularisation, de grandes quantités d'enzymes sont sécrétées ce qui pourrait induire le clivage de la VE-cadhérine et de la variation du taux sérique à plus long terme. De plus, la VE-cadhérine est une protéine qui peut être clivée dans d'autres pathologies telles que l'angioedème (52), la polyarthrite rhumatoïde (53) et probablement aussi dans d'autres situations cliniques comme le stress. Enfin, de nombreux traitements ont des actions directes sur les cellules endothéliales comme par exemple les traitements antihypertenseurs, les hypolipémiants de type statines (54). Ces traitements peuvent également interférer dans la variabilité du taux de la VE-cadhérine plasmatique.

L'hétérogénéité chez chaque individu rend donc la mesure du taux de VE-cadhérine soluble complexe.

Au total, la complexité intrinsèque de l'angiogenèse tumorale et les multiples mécanismes de régulation et d'adaptation de l'angiogenèse durant les thérapies suggèrent que plusieurs biomarqueurs seront nécessaires pour obtenir une compréhension globale de l'angiogenèse.

Aujourd'hui, il n'existe à ce jour aucun biomarqueur prédictif validé pour le suivi des patients atteints de mélanome au stade localisé et les recommandations d'experts français ne préconisent pas l'utilisation de marqueurs biologiques spécifiques en dehors du taux de LDH dans le bilan initial ou dans les bilans de suivi d'un patient atteint de mélanome non métastatique.

Concernant les patients atteints de mélanome métastatique inopérable sous immunothérapie, le dosage de la VE-cadhérine pourrait être un test non invasif de détection précoce de la réponse à l'immunothérapie. Au vu des résultats de notre étude, nous avons pu démontrer que le patient est le seul témoin de sa réponse à l'immunothérapie ce qui renforce notre biomarqueur.

# Conclusion de la thèse

THESE SOUTENUE PAR Clémentine BROCHE-ROJON

TITRE : VE-CADHERINE SOLUBLE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE MELANOME : RECHERCHE D'UN NOUVEAU BIOMARQUEUR

## CONCLUSION :

Le mélanome est le cancer cutané le plus grave du fait de sa capacité à métastaser. La recherche de biomarqueurs prédictifs de rechute et de réponse au traitement par immunothérapie, robustes et facilement accessibles est un objectif essentiel afin d'optimiser la prise en charge du patient.

Ce travail a été conduit sur trois cohortes de patients, deux cohortes de 55 patients au total suivies dans le cadre d'un mélanome dans le service de dermatologie au CHU de Grenoble et une cohorte de 24 sujets sains recueillie à l'EFS de Grenoble.

Les résultats de notre travail sont encourageants. Nous avons pu mettre en évidence un taux de sVE-cadhérine plus élevé chez les patients atteints de mélanome que les volontaires sains et d'autant plus élevé que le stade du mélanome est avancé. De plus, nous avons constaté une variation du taux de sVE-cadhérine plasmatique statistiquement significative chez les patients répondeurs ou non à l'immunothérapie après une cure d'immunothérapie. En effet, nos résultats montrent une augmentation du taux de sVE-cadhérine chez les patients non répondeurs au traitement ( $p=0.03$ ) et une diminution du taux chez les patients répondeurs au traitement ( $p=0.01$ ). Enfin, nous avons mis en évidence une corrélation entre la variation du taux de sVE-cadhérine à un stade précoce au cours du traitement par immunothérapie et la survie sans progression. Nos résultats montrent qu'une diminution du taux de sVE-cadhérine après une cure d'immunothérapie est corrélée à une survie sans progression plus longue de la

maladie alors qu'une augmentation du taux de sVE-cadhérine est de mauvais pronostic avec une récurrence précoce de la maladie. Il sera intéressant de poursuivre ce travail afin de confirmer ces résultats et d'ouvrir de nouvelles perspectives pour le suivi des patients sous immunothérapie.

Au vu de la complexité de l'angiogenèse tumorale et des multiples mécanismes de régulation, ces résultats devront être confirmés par une étude prospective, multicentrique et de plus grande envergure.

Enfin, la compréhension de l'angiogenèse tumorale du mélanome nous donne l'espoir d'ouvrir de nouvelles voies au développement de thérapies innovantes permettant de personnaliser le traitement anti tumoral pour chaque patient.

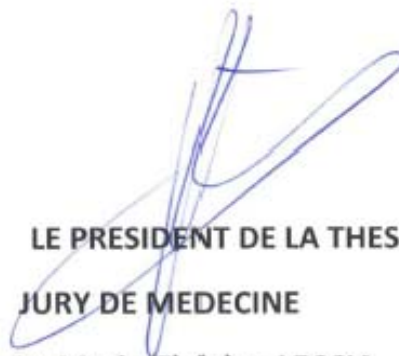
**VU ET PERMIS D'IMPRIMER**

Grenoble, le : 31/10/2018.

**LE DOYEN  
DE L'UFR DE MEDECINE  
Pr. Patrice MORAND**



**LE PRESIDENT DE LA THESE  
JURY DE MEDECINE  
Pr. Marie-Thérèse LECCIA**





# ANNEXES

## ELISA VE-Cadhérine

MAJ Abir 10/10/2016

### Réactifs :

**TBS=Tampon de dilution Tris 50mM, 100mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, triton 0.5% pH 7.5**

Préparation de 20 litres

121.14 g de Tris

+ 116.88 g de NaCl

+ 14.20 g de CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O

Ajouter toutes les poudres puis homogénéiser la solution pour ajuster le pH à 7.5 avec du HCl. Ajuster l'eau qsp 2 litres.

Ajouter ensuite à 18 litres d'eau

**TBS 1X tween 0.05% :**

1000 mL de TBS

+ 0,5mL tween 20

**Blocking buffer Pierce :**

à 4°C

**TBS 1X tween 1% :**

50 mL de TBS

+ 0.5mL tween 20

**BV9** (à tester à chaque nouveau lot en comparant avec l'ancien)

A diluer dans le tampon carbonate

à 4°C ou -80°C

**VE1-Sglycosylée** : -80°C; boîte VE1-5 glycosylée; aliquoté par 2µL

Solution mère à 430 µg/mL

**Polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulins biotinylated :**

**Dako E0432** à 4°C

A diluer au 1/10000ème

**Anti Cad 3 IgG** : à 4°C dans frigo;

**réserve** : congélo -20 °C

Solution à 2.7 mg/mL à diluer au 1/20000

**p-Nitrophenyl Phosphate (p-NPP) Liquide Substrate System :**

**Sigma Product number P7998** à 4°C

Ne pas diluer

**NaOH 3M (soude)** RT (à coté du lecteur ELISA)

**Tampon 0.1M carbonate de sodium pH 9.6 :**

8 mL de 0.2M sodium carbonate

(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)(0.2M = 21.2 g/L)

+ 17 mL de 0.2M sodium bicarbonate

(NaHCO<sub>3</sub>)(0.2M = 16.8g/L)

+ 25 mL eau

Vérifier pH à 9.6

**Streptavidin-Alkaline Phosphatase :**

**Sigma Product number S2890**

congélo -20 °C aliquoté à 1 mg/ml

A diluer au 1/500ème

**Plaques ELISA : Plaque pour screening standard 96 puits MAXISORP Nunc (ref dutcher : 55266)** réserve au sous sol

Annexe 1 : Protocole technique de la technique par Elisa en sandwich (d'après Vilgrain et al.)

**Protocole : (EVITER les bords de la plaque et surtout les 3 puits aux 4 angles !!)**

- ◆ Coater les puits d'une plaque ELISA (maxisorp) avec une solution de **BV9** à 10 µg/mL, 100 µL par puit, **ON** à 4°C. **BV9** est dilué dans du **tampon carbonate**.
- ◆ Laver 3 x 300 µL TBS tween 0.05% (programme MEL)
- ◆ Incuber 200 µL/puit avec **Pierce Blocking buffer** 1h RT
- ◆ Laver 3 x 300 µL TBS tween 0.05% (programme MEL)
- ◆ Préparer la gamme étalon **VE1-5g et les dilutions de sérums** dans le tampon TBS + triton 0.5%  
Préparation de la gamme de **VE1-5glycosilée** à partir d'une solution à **430 µg/mL** :  
(Chaque tube de VE1-5g est aliquoté PRECISEMENT par 2 µL pour éviter les congélations/décongelations)

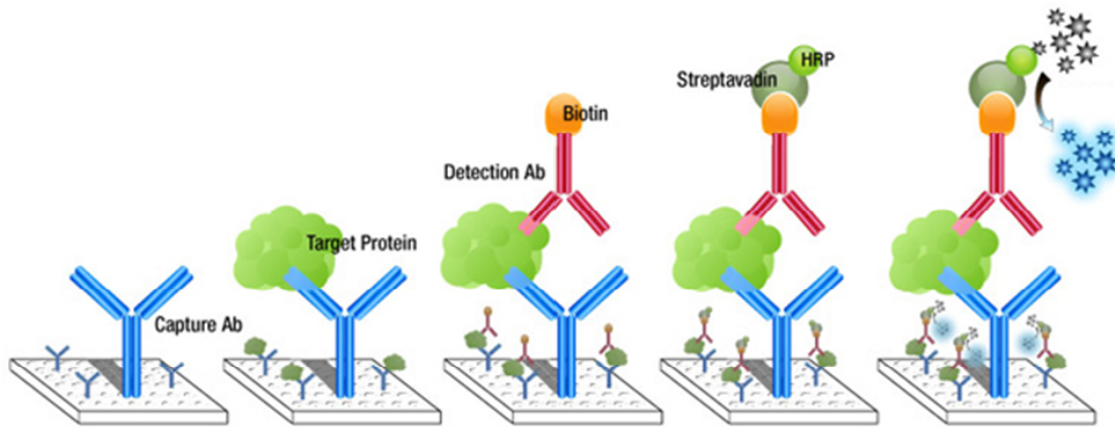
| 20000     | 2.0 µL of 430 µg/mL + 41 µL of TBS-- tween 1% |
|-----------|---|
| ST8 40.00 | 5 µL of 20 µg/mL + 2495 µL of TBS-tween 1%    |
| ST7 20.00 | 600.0 µL of ST8 + 600 µL of TBS-tween 1%      |
| ST5 10.00 | 600.0 µL of ST6 + 600 µL of TBS-- tween 1%    |
| ST3 5.00  | 600.0 µL of ST4 + 600 µL of TBS-tween 1%      |
| 0         | 400.0 µL TBS-- tween 1%                       |

Les **sérums** sont vortexés puis dilués dans le tampon « TBS tween » au 1/100 ou 1/50. Vortexer pendant 10 secondes. Déposer 100 µL par puit en duplicate (bien mélanger avant dépôt. Incuber **2h à 37°C**. Ne pas oublier le « 0 » (TBS + tween).

- ◆ Laver 3 x 300 µL TBS tween 0.05% (programme MEL)
- ◆ Incuber **anti-Cad 3 (à 2, 7 mg/mL)** dilué au 1/20 000 dans TBS-tween 0.05%, 100 µL/puit, **1h 37°C** (1<sup>ère</sup> dilution au 1/10 : 1 µL dans 19 µL ; puis 2<sup>ème</sup> dilution au 1/1000 : 10 µL dans 10 mL)
- ◆ Laver 3 x 300 µL TBS tween 0.05% (programme MEL)
- ◆ Incuber avec **l'anti-Rabbit IgG biotinylé** dilué au 1/10 000 dans TBS-tween 0.05%, 100 µL/puit, **1h à RT** (1<sup>ère</sup> dil 1/10 : 2 µL dans 18 µL ; puis 2<sup>ème</sup> dil 1/1000 : 10 µL dans 10 mL)
- ◆ Laver 3 x 300 µL TBS tween 0.05% (programme MEL)
- ◆ Incuber la streptavidine alcaline phosphatase diluée dans TBS Tween 20 0.05%, 100 µL/puits, **30min à RT** (14 µL dans 7 mL)
- ◆ Laver 3 x 300 µL TBS tween 0.05%
- ◆ Ajouter 200 µL/puits de **pNPP** et incuber environ **30min à 25°C** à l'obscurité (dans lecteur de plaques)
- ◆ Ajouter 50 µL de NaOH 3M puis lire 3 minutes après à 405nm. (Attention aux bulles !!)

Annexe 2 : Représentation schématique Protocole technique de la technique par Elisa en sandwich (d'après Vilgrain et al.)

## ELISA sandwich



## BIBLIOGRAPHIE

1. ald\_30\_guide\_melanome\_web.pdf mai 2018. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-03/ald\\_30\\_guide\\_melanome\\_web.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-03/ald_30_guide_melanome_web.pdf)
2. Recommandations, scores, échelles, fiches patients - Recommandations - Société Française de Dermatologie, mai 2018. Disponible sur: <http://www.sfdermato.org/recommandations-scores-et-echelles/recommandations.html>
3. Arnold M, Holterhues C, Hollestein LM, Coebergh JWW, Nijsten T, Pukkala E, et al. Trends in incidence and predictions of cutaneous melanoma across Europe up to 2015. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. sept 2014;28(9):1170-8.
4. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. nov 2017;67(6):472-92.
5. Duman N, Erkin G, Gököz Ö, Karahan S, Kayıkçıoğlu AU, Çelik İ. Nevus-Associated versus de novo Melanoma: Do They Have Different Characteristics and Prognoses? *Dermatopathol Basel Switz*. mars 2015;2(1):46-51.
6. Lin WM, Luo S, Muzikansky A, Lobo AZC, Tanabe KK, Sober AJ, et al. Outcome of patients with de novo versus nevus-associated melanoma. *J Am Acad Dermatol*. janv 2015;72(1):54-8.
7. On behalf of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Melanoma Staging Committee, Gershenwald JE, Soong S, Balch CM. 2010 TNM Staging System for Cutaneous Melanoma...and Beyond. *Ann Surg Oncol*. juin 2010;17(6):1475-7.
8. Taylor L, Hood K, Reisch L, Elmore J, Piepkorn M, Barnhill R, et al. Influence of variability in assessment of Breslow thickness, mitotic rate and ulceration among US pathologists interpreting invasive melanoma, for the purpose of AJCC staging. *J Cutan Pathol*. 2 mai 2018.
9. Netgen. Diagnostic histopathologique du mélanome primaire en 2011, et après ? *Revue Médicale Suisse*.
10. Balch CM, Wilkerson JA, Murad TM, Soong SJ, Ingalls AL, Maddox WA. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer*. 15 juin 1980;45(12):3012-7.
11. Mouawad R, Spano J-P, Khayat D. Old and new serological biomarkers in melanoma: where we are in 2009. *Melanoma Res*. avr 2010;20(2):67.
12. Agarwala SS, Keilholz U, Gilles E, Bedikian AY, Wu J, Kay R, et al. LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951). *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. juill 2009;45(10):1807-14.
13. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 14 mai 2007;26(22):3279-90.

14. Menshawy A, Eltonob AA, Barkat SA, Ghanem A, Mniesy MM, Mohamed I, et al. Nivolumab monotherapy or in combination with ipilimumab for metastatic melanoma: systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. *Melanoma Res.* 27 juin 2018.
15. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 22 janv 2015;372(4):320-30.
16. Schachter J, Ribas A, Long GV, Arance A, Grob J-J, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet Lond Engl.* 21 oct 2017;390(10105):1853-62.
17. Mahabeleshwar GH, Byzova TV. Angiogenesis in Melanoma. *Semin Oncol.* déc 2007;34(6):555-65.
18. Méjean A, Leuret T. La cascade métastatique : angiogenèse et nouveaux concepts. *Prog En Urol.* nov 2008;18:S156-66.
19. Streit M, Detmar M. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene.* mai 2003;22(20):3172-9.
20. Warren BA, Shubik P. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* févr 1966;15(2):464-78.
21. Hubler WR, Wolf JE. Melanoma. Tumor angiogenesis and human neoplasia. *Cancer.* 38(1):187-92.
22. Wanebo HJ, Argiris A, Bergsland E, Agarwala S, Rugo H. Targeting growth factors and angiogenesis; using small molecules in malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* juin 2006;25(2):279-92.
23. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci.* sept 2003;28(9):488-94.
24. Gitay-Goren H, Halaban R, Neufeld G. Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 15 févr 1993;190(3):702-8.
25. Pastushenko I, Vermeulen PB, Van den Eynden GG, Rutten A, Carapeto FJ, Dirix LY, et al. Mechanisms of tumour vascularization in cutaneous malignant melanoma: clinical implications. *Br J Dermatol.* août 2014;171(2):220-33.
26. Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Bröcker EB, Ruiters DJ, de Waal RM. Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Melanoma Res.* août 1997;7 Suppl 2:S19-26.
27. Gorski DH, Leal AD, Goydos JS. Differential expression of vascular endothelial growth factor-A isoforms at different stages of melanoma progression. *J Am Coll Surg.* sept 2003;197(3):408-18.
28. Fenton SE, Sosman JA, Chandra S. Emerging growth factor receptor antagonists for the treatment of advanced melanoma. *Expert Opin Emerg Drugs.* 3 avr 2017;22(2):165-74.
29. De Wever O, Derycke L, Hendrix A, De Meerleer G, Godeau F, Depypere H, et al. Soluble cadherins as cancer biomarkers. *Clin Exp Metastasis.* 2007;24(8):685-97.

30. Hamilla SM, Stroka KM, Aranda-Espinoza H. VE-cadherin-independent cancer cell incorporation into the vascular endothelium precedes transmigration. *PLoS One*. 2014;9(10):e109748.
31. Ghislin, Obino, Middendorp. LFA-1 and ICAM-1 expression induced during melanoma-endothelial cell co-culture favors the transendothelial migration of melanoma cell lines in vitro. *BMC Cancer* 2012, 12:455
32. Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*. 28 mars 1996;380(6572):360-4.
33. Vilgrain I, Sidibé A, Polena H, Cand F, Mannic T, Arboleas M, et al. Evidence for post-translational processing of vascular endothelial (VE)-cadherin in brain tumors: towards a candidate biomarker. *PLoS One*. 2013;8(12):e80056.
34. Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci*. févr 2001;114(Pt 4):629-41.
35. Wallez Y, Vilgrain I, Huber P. Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med*. févr 2006;16(2):55-9.
36. Wallez Y, Cand F, Cruzalegui F, Wernstedt C, Souchelnytskyi S, Vilgrain I, et al. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene*. 15 févr 2007;26(7):1067-77.
37. Gory-Fauré S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, Vernet M, et al. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Dev Camb Engl*. mai 1999;126(10):2093-102.
38. Corada M, Zanetta L, Orsenigo F, Breviario F, Lampugnani MG, Bernasconi S, et al. A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood*. 1 août 2002;100(3):905-11.
39. Rochefort P, Chabaud S, Pierga J-Y, Tredan O, Brain E, Bidard F-C, et al. Soluble VE-cadherin in metastatic breast cancer: an independent prognostic factor for both progression-free survival and overall survival. *Br J Cancer*. janv 2017;116(3):356-61.
40. Polena H, Creuzet J, Dufies M, Sidibé A, Khalil-Mgharbel A, Salomon A, et al. The tyrosine-kinase inhibitor sunitinib targets vascular endothelial (VE)-cadherin: a marker of response to antitumoural treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. mai 2018;118(9):1179-88.
41. Bartolomé RA, Torres S, Isern de Val S, Escudero-Paniagua B, Calviño E, Teixidó J, et al. VE-cadherin RGD motifs promote metastasis and constitute a potential therapeutic target in melanoma and breast cancers. *Oncotarget*. 3 janv 2017;8(1):215-27.
42. Hendrix MJ, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA, et al. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3 juill 2001;98(14):8018-23.
43. Fournier LS, Ammari S, Thiam R, Cuénod C-A. Critères de la réponse tumorale en imagerie : RECIST, mRECIST, Cheson. *J Radiol Diagn Interv*. 1 juill 2014;95(7):678-92.

44. Gershenwald JE, Scolyer RA. Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Ann Surg Oncol.* août 2018;25(8):2105-2110.
45. Aragon-Sanabria V, Pohler SE, Eswar VJ, Bierowski M, Gomez EW, Dong C. VE-Cadherin Disassembly and Cell Contractility in the Endothelium are Necessary for Barrier Disruption Induced by Tumor Cells. *Sci Rep.* 10 avr 2017;7:45835.
46. Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma: Angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* juin 2003;3(6):411-421.
47. Peng H-H, Hodgson L, Henderson AJ, Dong C. Involvement of phospholipase C signaling in melanoma cell-induced endothelial junction disassembly. *Front Biosci J Virtual Libr.* 1 mai 2005;10:1597-1606.
48. Zhang P, Fu C, Bai H, Song E, Dong C, Song Y. CD44 variant, but not standard CD44 isoforms, mediate disassembly of endothelial VE-cadherin junction on metastatic melanoma cells. *FEBS Lett.* 20 déc 2014;588(24):4573-4582.
49. Adam AP, Sharenko AL, Pumiglia K, Vincent PA. Src-induced tyrosine phosphorylation of VE-cadherin is not sufficient to decrease barrier function of endothelial monolayers. *J Biol Chem.* 5 mars 2010;285(10):7045-7055.
50. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature.* juill 2015;523(7559):231-235.
51. Hermant B, Bibert S, Concord E, Dublet B, Weidenhaupt M, Vernet T, et al. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J Biol Chem.* 18 avr 2003;278(16):14002-14012.
52. Bouillet L, Vilgrain I. VE-cadherin, a potential marker for endothelial cell activation during hereditary angioedema attacks. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2014;134(1):241.
53. Sidibé A, Mannic T, Arboleas M, Subileau M, Gulino-Debrac D, Bouillet L, et al. Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: evidence for tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum.* janv 2012;64(1):77-87.
54. Khaidakov M, Wang W, Khan JA, Kang B-Y, Hermonat PL, Mehta JL. Statins and angiogenesis: Is it about connections? *Biochem Biophys Res Commun.* sept 2009;387(3):543-547.