

**Université du Droit et de la Santé – Lille II**  
**Ecole Doctorale Biologie – Santé de Lille**

**THESE**

pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université de Lille 2**

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Cancérologie

présentée et soutenue publiquement par

**Pierre GUERRESCHI**

le 11 Septembre 2013

**Place des modèles murins**  
**dans la compréhension et l'adaptation de la**  
**prise en charge thérapeutique du mélanome métastatique**

**Membres du Jury :**

Présidente : Madame le Professeur Véronique MARTINOT (Lille)

Rapporteurs : Monsieur le Professeur Marc REVOL (Paris)  
Madame le Professeur Marie-Thérèse LECCIA (Grenoble)

Examineur : Monsieur le Professeur Laurent MORTIER (Lille)

**Directeur de thèse :** Monsieur le Professeur Philippe MARCHETTI (Lille)

Ce travail a été réalisé au sein de :

Unité INSERM U837

Equipe 4

Faculté de Médecine, Pôle Recherche

1,Place de Verdun

59045 Lille Cedex

dirigée par Monsieur le Professeur Pierre FORMSTECHE

*Je remercie très sincèrement :*

*Monsieur le Professeur Philippe Marchetti qui m'a ouvert les portes du laboratoire et initié au monde de la recherche fondamentale sans jamais vouloir faire de moi un autre professionnel qu'un chirurgien. Merci pour la confiance que tu m'as accordée.*

*Madame le Professeur Véronique Martinot qui m'offre l'occasion unique de parcourir un chemin professionnel hors du commun fait de connaissances scientifiques, de rencontres humaines et d'aventures chirurgicales nombreuses.*

*Monsieur le Professeur Marc Revol qui me fait l'honneur de juger mon travail. Vous êtes pour moi un modèle de rigueur scientifique, de conscience professionnelle, d'énergie au travail, d'efficacité chirurgicale... de grande sagesse.*

*Madame le Professeur Marie-Thérèse Leccia pour avoir accepté d'expertiser ce travail.*

*Monsieur le Professeur Laurent Mortier qui m'a entraîné derrière lui avec beaucoup d'optimisme et de passion. C'est une belle équipe médico-chirurgicale que tu façones chaque jour autour de toi, guidée par la curiosité scientifique et le grand intérêt porté aux soins de nos patients.*

*Monsieur le Professeur Pierre Formstecher qui m'a donné l'accès à un monde nouveau pour moi : la recherche biologique fondamentale.*

*Tous les membres de l'Equipe 4 de l'Unité U837 pour leur généreuse collaboration.*

*Toutes les bonnes âmes qui ont à chaque fois partagé leur expérience, leurs connaissances et leurs « petits trucs » indispensables au travail d'expérimentation animale de qualité.*

*Tous les membres du Service de Chirurgie Plastique qui ont œuvré encore un peu plus auprès des patients pour permettre à l'un d'entre eux de se déplacer en d'incessants allers-retours « from bed to bench ».*

*Isabelle, Zoé et Enoch qui composent chaque jour avec moi une très belle symphonie familiale. Vous êtes le levier grâce auquel il est facile de lever toute charge. Merci à mes parents, mes proches, mes amis pour leur confiance et leur bienveillance.*

**PLACE DES MODELES MURINS**  
**DANS LA COMPREHENSION ET L'ADAPTATION DE LA**  
**PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DU MELANOME METASTATIQUE**

<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>7</b>
<b>RESUME</b>	<b>8</b>
<b>PREAMBULE</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>13</b>
<b>I. MELANOME METASTATIQUE : GENERALITES.....</b>	<b>13</b>
A. INCIDENCE.....	13
B. PRONOSTIC ET STAGING.....	16
C. MARQUEURS BIOLOGIQUES DE PROGRESSION DU MELANOME.....	19
a. Métabolites et précurseurs de la mélanomagenèse .....	20
b. Antigènes associés au mélanome .....	20
D. GENETIQUE DU MELANOME ET IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES .....	21
a. Les gènes de prédisposition.....	21
b. Mutations des voies de signalisation .....	23
E. DIAGNOSTIC MOLECULAIRE.....	27
<b>II. PRISE EN CHARGE MEDICALE DU MELANOME METASTATIQUE .....</b>	<b>30</b>
A. LES CHIMIOTHERAPIES CYTOTOXIQUES .....	31
B. LES IMMUNOTHERAPIES .....	34
a. Les cytokines .....	34
b. Les vaccins.....	36
c. Les anticorps monoclonaux.....	39
C. LES THERAPIES CIBLEES .....	41
<b>III. UNE PROPOSITION THERAPEUTIQUE NOVATRICE ETUDIEE DANS LE LABORATOIRE : L'APPROCHE METABOLIQUE.....</b>	<b>45</b>
<b>IV. LES MODELE ANIMAUX EN CANCEROLOGIE .....</b>	<b>52</b>
A. GENERALITES AU SUJET DES MODELES MURINS .....	53
B. LES TUMEURS IN SITU .....	54
a. Les tumeurs induites.....	54
b. Les GEMM .....	55
C. LES TUMEURS TRANSPLANTEES .....	57
a. Transplantation de tumeurs syngéniques.....	57
b. Xénotransplantations .....	57
c. L'Hôte : un animal immunodéficient.....	58
d. Hétérotopique vs Orthotopique.....	62
e. Xénogreffes de cellules issues de culture vs xénogreffes de fragments de tumeurs de patients. Intérêt d'une pseudo-membrane basale (BD Matrigel).....	66



D.	LES MODELES METASTATIQUES .....	69
E.	PROPOSITION D'UN ARBRE DECISIONNEL POUR LE CHOIX D'UN MODELE.....	71
<b>V.</b>	<b>SPECIFICITES DES MODELES ANIMAUX DE MELANOME .....</b>	<b>72</b>
A.	MODELES MURINS DE MELANOMES INDUITS .....	72
B.	MODELES MURINS DE MELANOMES SPONTANES.....	73
C.	MODELES METASTATIQUES DE MELANOMES .....	73
D.	MODELES DE MELANOME DEVELOPPES SUR D'AUTRES ESPECES QUE LES RONGEURS.....	74
a.	Les poissons .....	74
b.	Le Monodelphis domestica .....	78
c.	Le chien .....	79
d.	Le porc .....	81
<b>VI.</b>	<b>LES METHODES DE SUIVI ET D'EVALUATION DE LA REPONSE AUX TRAITEMENTS DES MODELES</b>	
	<b>MURINS .....</b>	<b>83</b>
A.	SUIVI CLINIQUE DE LA CROISSANCE TUMORALE .....	83
B.	HISTOLOGIE .....	84
C.	MARQUEURS SERIQUES .....	84
D.	IMAGERIE .....	86
	<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL .....</b>	<b>92</b>
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>94</b>
I.	ARTICLE 1 .....	94
	ARTICLE 2 .....	96
II.	ARTICLE 3.....	98
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>116</b>
I.	ORIGINALITE DES MODELES DE XENOGREFFES ISSUES DIRECTEMENT DE LA TUMEUR DU PATIENT.....	116
II.	LES PDTX POUR L'ETUDE ET LA PRISE EN CHARGE DU MELANOME .....	121
III.	LES LIMITES DES MODELES DE PDTX.....	124
IV.	LES LIMITES DES MODELES DEVELOPPES DANS CE TRAVAIL .....	128
V.	LES ALTERNATIVES A L'UTILISATION DE MODELES MURINS EN PRATIQUE CLINIQUE .....	130
VI.	PLACE ET INDICATION DES MODELES MURINS DANS LE TRAITEMENT DES MELANOMES	
	<b>METASTATIQUES .....</b>	<b>132</b>
	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>134</b>
	<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>135</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>136</b>

## **Liste des figures**

Figure 1 : Altérations moléculaires des voies de signalisation impliquées dans la mélanomagénèse .....	26
Figure 2 : Voies des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) .....	28
Figure 3 : Principe de la vaccination antitumorale thérapeutique .....	38
Figure 4 : Mécanisme d'action de l'ipilimumab .....	40
Figure 5 : Les inhibiteurs de c-KIT, BRAF et MEK sur la cascade des MAPK.....	42
Figure 6 : Utilisation du glucose pour tous les besoins de la cellule en précurseurs métaboliques .....	45
Figure 8 : Double rôle de l'Hexokinase 2 (HK2) .....	47
Figure 9 : Rôle de l'Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) dans l'induction vers la voie glycolytique.....	49
Figure 10 : Effet du DichloroAcétate (DCA) .....	51
Figure 11 : Larges possibilités pour établir un modèle animal .....	52
Figure 12 : Souris NMRI-nude (à gauche) – Rat nude (à droite).....	60
Figure 13 : Représentation schématique des inter-relations entre la tumeur mélanocytaire et son microenvironnement .....	64
Figure 13 : Le mélanome développé sur le poisson Xiphophorus .....	75
Figure 14 : Modèle transgénique chez le Zébrafish .....	77
Figure 15 : Monodelphis domestica .....	78
Figure 16 : Prédiposition raciale chez le chien aux différents types cliniques de mélanomes.	79
Figure 17 : Porcelet MeLiM (Melanoblastoma-bearing Libechov Minipig).....	81
Figure 18 : Profils des différentes isoenzymes de la LDH.....	85
Figure 19 : Acquisition d'images en Cell-Vizio.....	87
Figure 20 : Section schématique d'une tumeur sous-cutanée de mélanome .....	87
Figure 21 : Xénogreffes d'un mélanome exprimant HIF-1 $\alpha$ (Scr) et d'un clone knock-down HIF-1 $\alpha$ KD .....	88
Figure 22 : Baisse de la fixation de <sup>18</sup> F-FDG en microTEP après 3 jours de traitement par Vémurafénib .....	89
Figure 23 : Imagerie fonctionnelle par IRM dynamique (DCE-MRI).....	90

Figure 24 : Propositions commerciales pour la production industrielle de Patient-Derived Tumor Xenograft (PDTX) .....	140
Figure 25 : Amplification de la tumeur dans des générations successives de souris .....	146

## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Risques relatifs de développer un carcinome cutané en fonction de l'exposition solaire personnelle .....	14
Tableau 2 : Risques relatifs associés aux différents modes d'utilisation du bronzage en cabines UV .....	15
Tableau 3 : Classification TNM (AJCC, 2009).....	17
Tableau 4 : Staging des patients présentant un mélanome (AJCC, 2009).....	18
Tableau 5 : Prédications de survie à 5 et 10 ans en fonction du stade AJCC.....	19
Tableau 6 : Oncogènes et gènes supresseurs de tumeurs dans les voies de signalisation impactées par leurs mutations .....	27
Tableau 7 : Caractéristiques des souches de souris immunodéprimées les plus fréquentes.....	61
Tableau 8 : Principales caractéristiques des sites d'implantation hétérotopique et orthotopique.....	66
Tableau 9 : Principales caractéristiques des modèles établis selon l'origine de la tumeur .....	69
Tableau 10 : Techniques in vivo de monitoring de la progression tumorale et de l'efficacité des traitements.....	91

## **Résumé**

Le traitement du mélanome métastatique est longtemps resté cantonné à quelques chimiothérapies cytotoxiques à efficacité limitée. Récemment, le développement des immunothérapies et des thérapies ciblées a constitué une avancée majeure dans la prise en charge du mélanome. La découverte de mutations oncogéniques sur les voies de signalisation de la cellule tumorale a permis de définir de nouvelles cibles pour le développement d' inhibiteurs pharmacologiques. Parmi ces mutations, la mutation BRAF V600E est présente dans 50% des mélanomes. Une des molécules anti-BRAF développée est le Vémurafenib. L'efficacité de cette molécule a permis l'allongement de la durée de survie des patients en situation métastatique de 6 à 8 mois.

Malheureusement, malgré la réponse initiale, l'échappement est la règle. Les mécanismes moléculaires responsables de la résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF sont multiples et conduisent à l'activation de nombreuses voies de signalisation pour suppléer l'inhibition de BRAF. Actuellement la prise en charge des patients résistants aux inhibiteurs de BRAF n'est pas codifiée et s'avère complexe étant donné la multiplicité des mécanismes d'échappement. Dans le cadre de cette nouvelle approche de médecine personnalisée, de nouveaux outils doivent être développés dans le but (i) de tester l'efficacité de nouvelles molécules et (ii) de tenter de prédire l'efficacité/la résistance des différents traitements disponibles. L'un de ces outils sont les xénogreffes de tumeurs issues directement des patients (Patient Derived Tumor Xenograft ou PDTX) ou « avatars ».

Mon travail a consisté à mettre en place ce type d'outil pour répondre aux questions suivantes : Les modèles animaux développés sont-ils un bon modèle préclinique translationnel ? Permettent-ils d'étudier les modes d'action des nouvelles thérapies ciblées et d'explorer leurs mécanismes de résistance ? Si tel est le cas, peuvent-ils prédire une réponse clinique ?

Différents modèles murins de xénogreffes de mélanome ont été mis au point et exploités. Des cellules tumorales puis des fragments de tumeurs ont été greffés en sous-cutané chez la souris immunodéficiente SCID. Les tumeurs ont été caractérisées en histologie et en biologie moléculaire pour montrer leur stabilité dans le modèle. Après plusieurs passages dans différentes générations de souris, les tumeurs conservent leurs mutations particulières. Par ailleurs différents traitements ont été administrés et la réponse à différentes stratégies thérapeutiques a été évaluée. Ce modèle nous a permis de valider l'efficacité des thérapies ciblées antiBRAF (Vémurafenib) mais aussi d'autres approches visant les particularités métaboliques du mélanome. Le modèle avatar a servi pour tester in vivo une association thérapeutique innovante qui associe un accélérateur de la phosphorylation mitochondriale, le DCA, et une molécule pro-oxydante, l'elesclomol, confirmant l'effet synergique obtenu in vitro. En outre, le modèle avatar constitue un bon modèle préclinique guidant directement le clinicien dans ses choix thérapeutiques. En effet nous avons réalisé une PDTX tout au long de l'évolution métastatique d'une patiente. Cette PDTX a permis de tester l'efficacité du Vémurafenib et de réintroduire ce traitement à la patiente qui a pu bénéficier d'une amélioration clinique notable. 7 autres PDTX de patients ont été développées pour renforcer le modèle et suivre de manière personnalisée le traitement de ces patients.

Grâce à ce travail, nous définissons la place que peuvent prendre les PDTX dans la prise en charge actuelle du mélanome métastatique. Ces modèles donnent une réponse précoce quant à leur résistance et aux alternatives thérapeutiques de seconde ligne.

## **Abstract**

For a long time the standard treatment for metastatic melanoma has been confined to a few cytotoxic chemotherapies with limited efficacy. Recently, the development of immunotherapies and targeted therapies represents major headways in melanoma care management. The discovery of oncogenic mutations on the signaling pathways of the tumor cell allowed the definition of new targets for developing inhibitor drugs. Among these mutations, BRAF V600E is seen in 50% of all melanomas. Vemurafenib is one of the anti-BRAF molecules recently developed. It has shown its efficacy with metastatic patients showing a survival increased by 6 to 8 months.

Unfortunately, in spite of the initial positive reaction, the development of a resistance mechanism is ineluctable. There are numerous molecular mechanisms responsible for the acquired resistance to BRAF inhibitors which activate numerous signaling pathways to make up for the BRAF inhibition. Today, there are no standards of care for patients who become resistant to BRAF inhibitors. In the framework of this new personalized care approach, new tools must be developed to (i) test the efficacy of new molecules and (ii) try to predict the efficacy/resistance of the various treatments available. One of these tools is the Patient Derived Tumor Xenograft or PDTX, i.e. xenografts from tumors directly harvested on patients.

My work consisted in implementing this type of tool to try and bring an answer to the following questions: Are the developed animal models a good tool for preclinical cross-sectional studies? Can they help study the action modes of new targeted therapies and explore their resistance mechanisms? If this is the case, can they predict a clinical response?

Various murine models of melanoma xenografts have been designed and used. Tumor cells and later on tumor fragments were grafted subcutaneously in immunosuppressed SCID mice. Tumors were characterized in histology and molecular biology to show the stability of the model. After several passages in various generations of mice, the tumors retain their specific mutations. Furthermore, various treatments have been administered and the answers to the various therapeutic strategies have been evaluated. This model allowed us to validate the efficacy of antiBRAF targeted therapies (vemurafenib) but also other approaches targeting the metabolic characteristics of melanoma. This avatar model enabled to test *in vivo* an innovating therapeutic combination, associating an accelerator of oxidative phosphorylation, DCA, to a pre-oxidative molecule, elesclomol, validating the synergic effect obtained *in vitro*.

Furthermore, PDTX is a good preclinical tool to guide clinicians in their therapeutic choices. In fact we were able to develop a PDTX during the entire metastatic progression of a patient. This PDTX enabled us to test the efficacy of vemurafenib and reintroduce the treatment to the patient, who showed noticeable clinical improvements. Seven other PDTX were developed in order to reinforce the model and follow, in a personalized manner, the treatment of these seven patients.

Thanks to this work, we are able to define the role of PDTX in the care management of metastatic melanoma. These models give an early answer regarding tumor resistance and alternative second-line therapies.

## **Préambule**

Si le traitement du mélanome primitif par une chirurgie standardisée donne de bons espoirs de guérison, la prise en charge de la maladie métastatique pose encore beaucoup de questions fondamentales et de difficultés dans la pratique quotidienne. Les trente dernières années n'avaient vu que d'infimes avancées en terme d'allongement de durée de survie malgré des efforts considérables à la fois dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires et également dans l'évaluation de multiples associations de chimiothérapies ou biochimiothérapies. Depuis peu ce sont l'immunothérapie (anti-CTLA-4) et les thérapies ciblées (anti-BRAF comme le Vémurafénib) qui donnent un regain d'espoir. 50% des mélanomes possèdent une mutation activatrice sur le codon 600 de la protéine BRAF activatrice de la voie des Mitogen Activated Pathway Kinases (MAPK). En bloquant l'action de cette protéine par une thérapie ciblée (Vémurafénib), on obtient une amélioration des taux de réponse et de la survie jamais observée auparavant.

Toutefois les résistances sont encore inexorables et complexes. Une approche originale est développée au sein du laboratoire INSERM U837 : proposer de nouvelles cibles thérapeutiques en rapport avec le métabolisme particulier du mélanome. En effet les cellules de mélanome privilégient particulièrement la voie de la glycolyse même en situation normoxique. Le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  en est un des principaux chef d'orchestre. Contrairement à la cellule normale, la respiration mitochondriale est peu utilisée. Or si cette voie oxydative était relancée, la cellule tumorale serait alors plus vulnérable aux agents pro-oxydants par exemple. Par ailleurs ne pourrait-on pas expliquer les mécanismes de la résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF par une modification du métabolisme et tenter de resensibiliser les tumeurs devenues résistantes ?

Ces approches novatrices, très proches de la réalité clinique des patients en cours de traitement, nécessitent un outil plus élaboré que les lignées cellulaires établies de mélanome. Il est en outre impératif de travailler sur des mélanomes humains. La proximité clinique avec les patients nous a amené naturellement à mettre au point un modèle animal de xénogreffes de tumeurs humaines. Parmi les

nombreuses espèces couramment utilisées dans le champs de la recherche sur le mélanome, la souris immunodéficiente est la plus utilisée pour construire une Patient Derived Tumor Xenograft ou PDTX. Notre travail a consisté à construire le modèle le plus adapté pour répondre à la fois à des questions fondamentales et cliniques. Les PDTX développées ont été utilisées pour tester de nouvelles approches thérapeutiques novatrices. Elles ont également été au service d'une médecine personnalisée pour guider le choix d'alternatives thérapeutiques pour des patients particuliers.



## **Introduction**

### **I. Mélanome métastatique : généralités**

#### **A. Incidence**

L'incidence du mélanome est en constante augmentation dans le monde entier pour les populations à peau claire, particulièrement si elles sont exposées au soleil (Armstrong, Kricger, 2001b). En France le taux d'augmentation a été estimé à 5,9% par an chez l'homme et 4,3% chez la femme de 1978 à 2000. Une collaboration multi-disciplinaire a réuni en 2012 l'European Dermatology Forum (EDF), l'European Association of Dermato-Oncology (EADO) et l'European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC) pour édicter des recommandations concernant le diagnostic et le traitement du Mélanome Cutané (Garbe et al., 2012). En Europe le taux d'incidence est d'environ 10 à 20 cas pour 100.000 habitants. Aux Etats-Unis ce taux s'élève à 20 à 30 cas pour 100.000 habitants (Garbe et al., 2012). En Australie il culmine à un taux record de 50 à 60 cas pour 100.000 habitants. En France la dernière estimation nationale de 2000 fait état de 7000 nouveaux cas par an, soit 9,5 nouveaux cas pour 100.000 habitants chez la femme et 7,6 chez les hommes (sex-ratio de 0,8), avec de grandes disparités géographiques et ethniques.

Certains facteurs de risque individuels sont reconnus : le nombre élevé de naevi (Grob et al., 1990), la présence de naevus congenital géant, la maladie des naevi dysplasiques. Il existe des facteurs de transmission génétique polygéniques. 5-10% des mélanomes surviennent dans des familles à risque (Bishop et al., 2007). Plusieurs gènes ont été identifiés : des gènes à forte pénétrance (CDKN2A et CDK4) dont les mutations sont rares mais confèrent un risque élevé et des gènes de susceptibilité dont les mutations confèrent un risque si elles sont cumulées entre elles ou à des facteurs environnementaux. Il s'agit des gènes MC1R, ECR2, BRAF ou encore PTEN. Une voie

indépendante des ultra-violet, la voie de la phéomélanine, médiée par le gène MC1R, a été identifiée récemment par Mitra et al. et permettrait d'expliquer le développement de mélanomes muqueux ou cutanés des zones non exposées aux UV (Mitra et al., 2012).

A ces facteurs génétiques et constitutifs il faut ajouter le principal facteur exogène : l'irradiation UV et plus particulièrement l'exposition solaire intermittente (Armstrong, Krickler, 2001b). En effet la notion de durée totale d'exposition aux UV peut être affinée. Il existe certains profils d'exposition représentant un plus grand facteur de risque. Lorsque l'intermittence de l'exposition augmente, le risque de développer un mélanome augmente. Par ailleurs c'est l'exposition au soleil durant les 10 premières années de vie qui est le plus déterminant. Ceci est suggéré par des études épidémiologiques réalisées sur des populations de migrants en Australie. Les migrants arrivés en Australie après l'âge de 10 ans ont un risque deux fois moins élevé que les individus arrivés plus jeunes ou nés sur le sol australien pour le même phototype cutané.

Type d'exposition	Carcinome Basocellulaire	Carcinome Epidermoïde	Mélanome
Permanente	0.98 (0.68-1.41)	1.53 (1.02-2.27)	1.20 (1.00-1.44)
Professionnelle	1.19 (1.07-1.32)	1.64 (1.26-2.13)	0.86 (0.77-0.96)
Intermittente (non professionnelle)	1.38 (1.24-1.54)	0.91 (0.68-1.22)	1.71 (1.54-1.90)
Coups de soleil (quelque soit l'âge)	1.40 (1.29-1.51)	1.23 (0.90-1.69)	1.91 (1.69-2.17)

Tableau 1 : Risques relatifs (intervalles de confiance entre parenthèses) de développer un carcinome cutané en fonction de l'exposition solaire personnelle ((Armstrong, Krickler, 2001a)

La revue et la méta-analyse de Boniol et al. publiées en 2012 soulignent le rôle important des cabines de bronzage comme facteur exogène de mélanomes cutanés (Boniol et al., 2012). Sur la base de 27 études publiées et plus de 11.000 cas de mélanomes, la méta-analyse peut conclure que le bronzage en cabines UV est associé à un risque relatif de 1,20. Le calcul de doses indiquent que pour chaque séance de bronzage en cabine par an, le risque de mélanome augmente de 1,8%. L'utilisation

précoce de ce type de bronzage, avant l'âge de 35 ans, est associée à un risque relatif de 1,87. La méta-analyse précédente de 2006 faisait déjà état d'une augmentation de 75% du risque de mélanome chez les adolescents et adultes jeunes exposés au bronzage en cabine (International Agency for Research on Cancer, 2006). A titre d'exemple, pour l'année 2008 et pour la population de 13 pays européens, 3428 cas de mélanomes ont été mis en relation avec l'utilisation de cabines UV. Depuis 2009, l'International Agency for Research on Cancer a classé la totalité du spectre ultraviolet et les cabines de bronzage comme carcinogène pour l'Homme (groupe 1) (Ghissassi et al., 2009).

Modes d'utilisation	Nombre d'études dans la méta-analyse de Boniol et al. 2012	Risque relatif global (intervalle de confiance 95%)
Tout type d'utilisation	27	<b>1.20</b> (1.08 à 1.34)
Première utilisation avant 35 ans	13	<b>1.87</b> (1.41 à 2.48)
Usage intensif	14	<b>1.42</b> (1.15 à 1.74)
Première utilisation récente	9	<b>1.18</b> (0.95 à 1.48)
Première utilisation ancienne	9	<b>1.49</b> (1.18 à 1.88)

Tableau 2 : Risques relatifs associés aux différents modes d'utilisation du bronzage en cabines UV publiés dans la méta-analyse de Boniol et al. en 2012 (Boniol et al., 2012)

## **B. Pronostic et staging**

Environ 90% des mélanomes sont diagnostiqués au stade de tumeur primaire isolée sans aucune métastase identifiable. Le pronostic est bon avec une survie à 10 ans de 75-85%. Les facteurs pronostiques retenus par les études les plus récentes (Balch et al., 2009) sont l'indice de Breslow, la présence d'ulcération identifiée à l'histopathologie, l'index mitotique et le niveau d'invasion de Clark.

Les voies lymphatiques et hématogènes sont toutes les deux impliquées dans la dissémination métastatique du mélanome. Une métastase peut se présenter comme :

- une micrométastase dans le premier ganglion lymphatique de la chaîne de drainage identifié par la technique du ganglion sentinelle.
- un envahissement cliniquement décelable d'un ganglion régional
- une métastase en transit (localisée au sein de la peau entre le site de la tumeur primitive et le premier relai ganglionnaire)
- une métastase satellite (localisée dans la peau à plus de 2 cm du site de la tumeur primitive)
- une métastase à distance (localisée soit à la peau et dans ce cas en aval du premier relai ganglionnaire, soit à un autre organe).

L'American Joint Committee for Cancer (AJCC) a proposé en 2009 une classification TNM et de staging reconnue internationalement. Les tableaux 1 et 2 résument cette classification.

<b>Stadification TNM du Mélanome Cutané</b>		
<b>T</b>	<b>Epaisseur (mm)</b>	<b>Ulcération / nombre de mitoses</b>
Tis	NQ	NQ
T1	≤ 1,00	a. pas d'ulcération et mitose < 1/mm <sup>2</sup> b. avec ulcération ou mitoses ≥ 1/mm <sup>2</sup>
T2	1,01 - 2,00	a. sans ulcération b. avec ulcération
T3	2,01 - 4,00	a. sans ulcération b. avec ulcération
T4	> 4,00	a. sans ulcération b. avec ulcération
<b>N</b>	<b>Nombre de ganglions métastatiques</b>	<b>Degré d'envahissement du ganglion métastatique</b>
N0	0	NQ
N1	1	a. micrométastase b. macrométastase
N2	2-3	a. micrométastase b. macrométastase c. métastase en transit / satellites sans ganglion envahi
N3	4 ou plus ou métastases en transit / satellites sans ganglion envahi	
<b>M</b>	<b>Site</b>	<b>LDH sérique</b>
M0	Pas de métastase à distance	NQ
M1a	Métastases cutanées, sous-cutanée ou ganglionnaire	Normal
M1b	Métastase pulmonaire	Normal
M1c	Toute autre métastase viscérale	Normal Ou Elevé
Abbréviations : NQ, non quantifié ; LDH, lactate déshydrogénase ; les micrométastases sont définies sur ganglion sentinelle		

Tableau 3 : Classification TNM proposée par l'AJCC en 2009 (Balch et al., 2009)

<b>Stadification Anatomique pour le Mélanome Cutané</b>							
	<i>Stadification clinique</i>				<i>Stadification anatomo - pathologique</i>		
	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>		<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0	<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1a	N0	M0	<b>IA</b>	T1a	N0	M0
<b>IB</b>	T1b	N0	M0	<b>IB</b>	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
<b>IIA</b>	T2b	N0	M0	<b>IIA</b>	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
<b>IIB</b>	T3b	N0	M0	<b>IIB</b>	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0	<b>IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>III</b>	tout T	N > N0	M0	<b>IIIA</b>	T1 à T4a	N1a	M0
					T1 à T4a	N2a	M0
				<b>IIIB</b>	T1 à T4b	N1a	M0
					T1 à T4b	N2a	M0
					T1 à T4a	N1b	M0
					T1 à T4a	N2b	M0
					T1 à T4a	N2c	M0
				<b>IIIC</b>	T1 à T4b	N1b	M0
					T1 à T4b	N2b	M0
					T1 à T4b	N2c	M0
					T1 à T4b	N3	M0
<b>IV</b>	tout T	tout N	M1	<b>IV</b>	tout T	tout N	M1

Tableau 4 : Staging des patients présentant un mélanome proposé par l'AJCC en 2009 (Balch et al., 2009)

La survie à 10 ans est de 30-70% pour les patients atteints d'une micrométastase. Elle baisse à 30-50% en cas de métastases en transit ou satellite. La survie à 10 ans chute à 20-40% pour les patients présentant une adénopathie métastatique. Enfin le pronostic des patients atteints d'une métastase à distance est dramatique : la médiane de survie est d'environ 6 à 9 mois malgré une grande variation en fonction de l'organe affecté et du taux sérique de Lactate DésHydrogénase (LDH).

	<b>Survie à 5 ans</b>	<b>Survie à 10 ans</b>
Stade I	93 %	85 %
Stade II	68 %	55 %
Stade III	45 %	36 %
Stade IV	11 %	6 %

Tableau 5 : Prédications de survie à 5 et 10 ans en fonction du stade AJCC (Balch et al., 2001)

### **C. Marqueurs biologiques de progression du mélanome**

La progression du mélanome se fait rapidement vers une diffusion métastatique qui met alors directement en jeu le pronostic vital. Malheureusement les examens d'imagerie permettent difficilement d'identifier de manière suffisamment précoce le processus métastatique du mélanome. Il est alors intéressant de se tourner vers des marqueurs biologiques circulants . Il est toutefois difficile de trouver un seul marqueur de progression de la maladie qui soit à la fois corrélé au stade et au pronostic du patient. Parmi les marqueurs sériques candidats on distingue les métabolites et précurseurs de la mélanomagénèse, les antigènes associés au mélanome, les molécules d'adhésion, cytokines et facteurs de croissance, la LDH. Une autre voie est celle de la

détection de cellules métastatiques circulantes (détection de l'ARNm de la tyrosinase en RT-PCR).

### ***a. Métabolites et précurseurs de la mélanomagenèse***

Les mélanomes sont constitués de mélanocytes anormaux dont le principal composant est la mélanine produite dans les mélanosomes. L'enzyme tyrosinase est au centre des premières étapes de la mélanomagenèse. L'activité tyrosinase, les métabolites intermédiaires et les enzymes de la biosynthèse de la mélanine peuvent être des marqueurs tumoraux. Il s'agit de la 5-S-cystéinyldopa (5-S-CD), de la L-dopa ou encore de la L-tyrosine, précurseur de la L-dopa. Les techniques de dosage sont cependant assez complexes et ne se font pas en routine clinique. Le marqueur biologique le plus intéressant semble toutefois être le rapport L-dopa / L-tyrosine qui est plus sensible que la mesure de la L-dopa seule.

### ***b. Antigènes associés au mélanome***

La protéine S-100 (PS-100) est une protéine spécifique du système nerveux central. Elle a été cependant retrouvée dans les mélanocytes, les mélanomes et leurs métastases. La PS-100 est composée de 2 sous-unités alpha et beta qui se combinent sous 3 formes différentes. Dans les mélanocytes normaux, elle est composée seulement de sous-unités alpha, tandis que dans les mélanomes les 2 sous-unités sont présentes.

La concentration sérique de la PS-100 est souvent corrélée à la survie des patients et au stade de la maladie. Son dosage permet de mieux sélectionner les patients à haut risque qui nécessitent une surveillance plus rapprochée. Il complète le pouvoir pronostique de l'histologie, de l'existence de ganglions envahis et de la présence de métastase. La PS-100 pourrait être utile pour le suivi des patients métastatiques traités pour évaluer la réponse au traitement.

Un autre antigène associé au mélanome semble intéressant : il s'agit du Melanoma Inhibiting Activity (MIA). C'est une protéine plus petite que la PS-100 qui est sécrétée spécifiquement par le mélanome et non par le mélanocyte normal.



Il n'existe actuellement pas de consensus quant à la primauté de chacun de ses marqueurs. De nombreuses études tentent d'associer ces différents marqueurs pour en faire un outil biologique sensible et spécifique (Gelineau et al., 2002). Ils ne présentent que peu d'intérêt dans le diagnostic et ne sont pas utilisables pour le dépistage précoce du mélanome. En revanche ils présentent un intérêt pour le pronostic afin d'identifier les patients à haut risque. La spécificité des marqueurs PS-100 et MIA est excellente (100% pour la PS-100 et 95% pour la MIA dans certaines études (H B Guo et al., 1995 ; Bosserhoff et al., 1997)). Malheureusement la sensibilité est très faible pour la PS-100 comme pour la MIA quel que soit le stade de la maladie. Ces deux tests sont complémentaires et leur utilisation conjointe est intéressante pour identifier les patients à haut risque de progression.

## **D. Génétique du mélanome et implications thérapeutiques**

De nombreuses études ont exploré les différents gènes impliqués dans les lésions bénignes naeviques et dans les mélanomes. Certains gènes confèrent une prédisposition à ce type de lésions, d'autres sont d'emblée des altérations structurelles somatiques de l'ADN des cellules de mélanome. Il peut s'agir de translocations, d'amplifications/délétions ou de mutations ponctuelles (Futreal et al., 2004).

### ***a. Les gènes de prédisposition***

Lorsqu'ils sont mutés, ces gènes confèrent une forte prédisposition aux mélanomes. Ces sont des facteurs de risques endogènes. Leur dépistage dans certaines familles à risque ont un rôle prédictif. A ce jour CDKN2A et MITF ont été identifiés comme des gènes de prédisposition

## ***CDKN2A, le locus des formes familiales de mélanome***

Les plus récentes méta-analyses au sujet des formes familiales de mélanomes ont montré que la présence d'un antécédent de mélanome chez un apparenté au premier degré multiplie le risque relatif d'appartenance de la maladie par 2,24 (Gandini et al., 2005). Les études génétiques de ce trait héréditaire sur les familles prédisposées ont permis d'identifier le gène CDKN2A situé sur le chromosome 9p21. Pour confirmer le rôle majeur de ce gène, un modèle de souris transgénique a été créé en ciblant ce gène et en induisant une délétion sur les exons 2 et 3 de ce gène CDKN2A (Serrano et al., 1996). Ces souris transgéniques développent rapidement des lymphomes et des fibrosarcomes. Des mélanomes apparaissent spontanément si ces souris portent une mutation activatrice de H-RAS dans leur mélanocytes (Chin et al., 1997).

CDKN2A code pour 2 protéines : INK4A (également appelée p16<sup>INK4A</sup>) et ARF.

INK4A fait partie de la famille des INK4 (Inhibitor of Cycline-Dependant Kinase 4). Cette protéine inhibe les kinases CDK (Cycline-Dependant Kinase) qui phosphorylent et inactivent la protéine RB (rétinoblastome), donnant ainsi accès à l'entrée en phase S du cycle cellulaire. Ainsi la perte de cette protéine INK4A entraîne une levée du frein des CDK sur la protéine RB. Ceci a pour conséquence un emballement du cycle cellulaire dont l'entrée en phase S n'est plus contrôlée.

ARF, également appelée p14<sup>ARF</sup> inhibe l'ubiquitination et donc la dégradation de la protéine p53. La voie de ARF-p53, suppresseur de tumeur, semble donc inactivée au niveau de ARF dans un grand nombre de mélanomes. Ceci explique une idée fautive et répandue selon laquelle p53 n'interviendrait pas dans la mélanomagenèse contrairement à la plupart des cancers.

## ***MITF, un régulateur majeur du développement du mélanocyte et un oncogène important pour le mélanome***

Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF) est un facteur de transcription dimérique qui joue un rôle central dans la régulation du développement du mélanocyte (Levy et al., 2006). Chez l'Homme, la mutation du gène *Mitf* est responsable du syndrome de Waardenburg (Waardenburg Syndrom ou WS) qui comprend notamment une surdité profonde. L'hypothèse étiopathogénique repose sur le rôle des mélanocytes se trouvant dans la stria vascularis de la cochlée. Ces mélanocytes auraient pour fonction le maintien du K<sup>+</sup> extracellulaire dans le liquide endolymphatique. Le phénotype d'une souris portant une mutation non fonctionnelle de *Mitf* (*Mitf<sup>mi/mi</sup>*) regroupe une surdité, une hyperdensité osseuse, une microphthalmie et l'absence de pigmentation des yeux et de la peau (Silvers, 1979).

Une amplification de MITF a été retrouvée dans 10% des tumeurs primitives de mélanome et dans 20% des mélanomes métastatiques. Ces trop nombreuses copies du gène *Mitf* dans les lignées cellulaires de mélanome ont été mises en évidence par des études en SNP (Single Nucleotid Polymorphism) (Garraway et al., 2005).

### ***b. Mutations des voies de signalisation***

De nombreuses altérations génétiques ont été mises en évidence dans les cellules de mélanomes. Il peut s'agir de translocations, d'amplifications/délétions ou de mutations ponctuelles (Futreal et al., 2004). Elles impliquent les gènes clés de la régulation des voies de signalisation, principalement la voie des Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) et la voie de la phosphatidylinositol3-kinase - AKT (PI3K-AKT). Leurs mutations en font parfois des cibles thérapeutiques.

## ***Activation des récepteurs à tyrosine kinase***

De nombreux travaux ont souligné la forte implication de l'hyperactivation de récepteurs à tyrosine kinase (RTK) dans les mélanomes.

Dans le modèle animal de poisson *Xiphophorus*, l'homologue de l'EGFR, le *Xmrk* porte une mutation activatrice, augmentant la susceptibilité du *Xiphophorus* au mélanome (Wittbrodt et al., 1992). L'hyperactivation de l'EGFR, retrouvée dans de nombreux cancers, notamment dans le cancer du poumon (Laisney et al., 2013), n'est pas identifiée à ce jour dans le mélanome.

On peut également citer le RTK c-MET dont la surexpression est également retrouvée dans le mélanome métastatique (Natali et al., 1993). Par ailleurs c-MET a récemment été impliqué comme facteur de transcription de MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor), le facteur de transcription des lignées mélanocytaires et qui est activé par amplification focale dans le mélanome (McGill et al., 2006).

Enfin le gène c-KIT code pour un RTK qui sert de récepteur au SCF (Stem Cell Factor). De nombreuses études basées sur l'immunohistochimie ont montré la perte progressive de l'expression de c-KIT dans la transition de la lésion naevique au mélanome primitif puis au mélanome métastatique. Toutefois les mutations de c-KIT dans le mélanome restent rares et atteignent le plus souvent les mélanomes muqueux.

## ***RAS et RAF, des activateurs de la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases)***

Une des voies principales de transmission des Récepteurs à Tyrosine Kinase (RTK) est la voie des MAPK et son hyperactivité est impliquée dans un grand nombre de cancers dont le mélanome (Takata et al., 2005).

La famille des proto-oncogènes RAS : H-RAS, N-RAS et K-RAS ne semble pas être impliquée dans plus de 10 à 15 % des mélanomes. Les mutations des proto-oncogènes RAS sont les plus fréquemment rencontrées dans le sous-type de mélanome nodulaire achromique.

Au contraire les mutations activatrices de BRAF sont les plus fréquentes des mutations génétiques somatiques du mélanome humain. Les travaux de Davies et al. ont estimé à 50 à 70 % l'incidence des mutations BRAF dans le mélanome (Davies et al., 2002). La plus répandue de ces mutations est une substitution phosphomimétique dans le domaine d'activation V600E qui confère à la cellule une activation constitutive (Garnett, Marais, 2004). Une transversion T -> A convertit une valine en acide glutamique sur l'acide aminé V600. Cette mutation est plus fréquemment rencontrée dans les sous-types de mélanomes survenant après une exposition solaire intermittente du tronc ou des membres (59%). Son incidence est plus faible dans les mélanomes acro-lentigineux (23%) ou muqueux (11%). Enfin cette mutation n'est pas retrouvée dans les mélanomes uvéaux. Malgré ces observations le lien entre la mutation BRAF et les radiations UV semble indirect et encore débattu (Chin et al., 2006).

### ***PTEN, régulateur négatif de la voie PI3-kinase - AKT***

La voie de la phosphatidylinositol3-kinase (PI3K) - AKT est souvent hyperactivée dans le mélanome. Certains facteurs de croissance comme HGF ou IGF-1 sont promoteurs de la progression tumorale du mélanome via l'activation de PI3K-AKT. De plus d'après Dai et al. une corrélation peut être établie entre des taux élevés de phospho-AKT et la survie des patients (Dai et al., 2005).

PTEN code pour une phosphatase qui régule les signaux extracellulaires des facteurs de croissance en utilisant le PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol Phosphate) comme messenger intracellulaire. En présence de facteurs de croissance, le taux intracellulaire de PIP<sub>3</sub> augmente et permet la phosphorylation de AKT qui favorise le cycle cellulaire et inhibe l'apoptose. L'inactivation de PTEN conduit à une accumulation de PIP<sub>3</sub> et d'AKT phosphorylé ce qui favorise la prolifération et la survie cellulaire. Une altération ou une perte de PTEN sont retrouvées dans 20 à 40% des mélanomes. Des modèles de souris transgéniques porteurs d'une inactivation de PTEN sont disponibles. Cette caractéristique génétique leur confère une forte prédisposition aux mélanomes (You et

al., 2002). PTEN peut être considéré comme un gène suppresseur de tumeurs dont le mélanome.

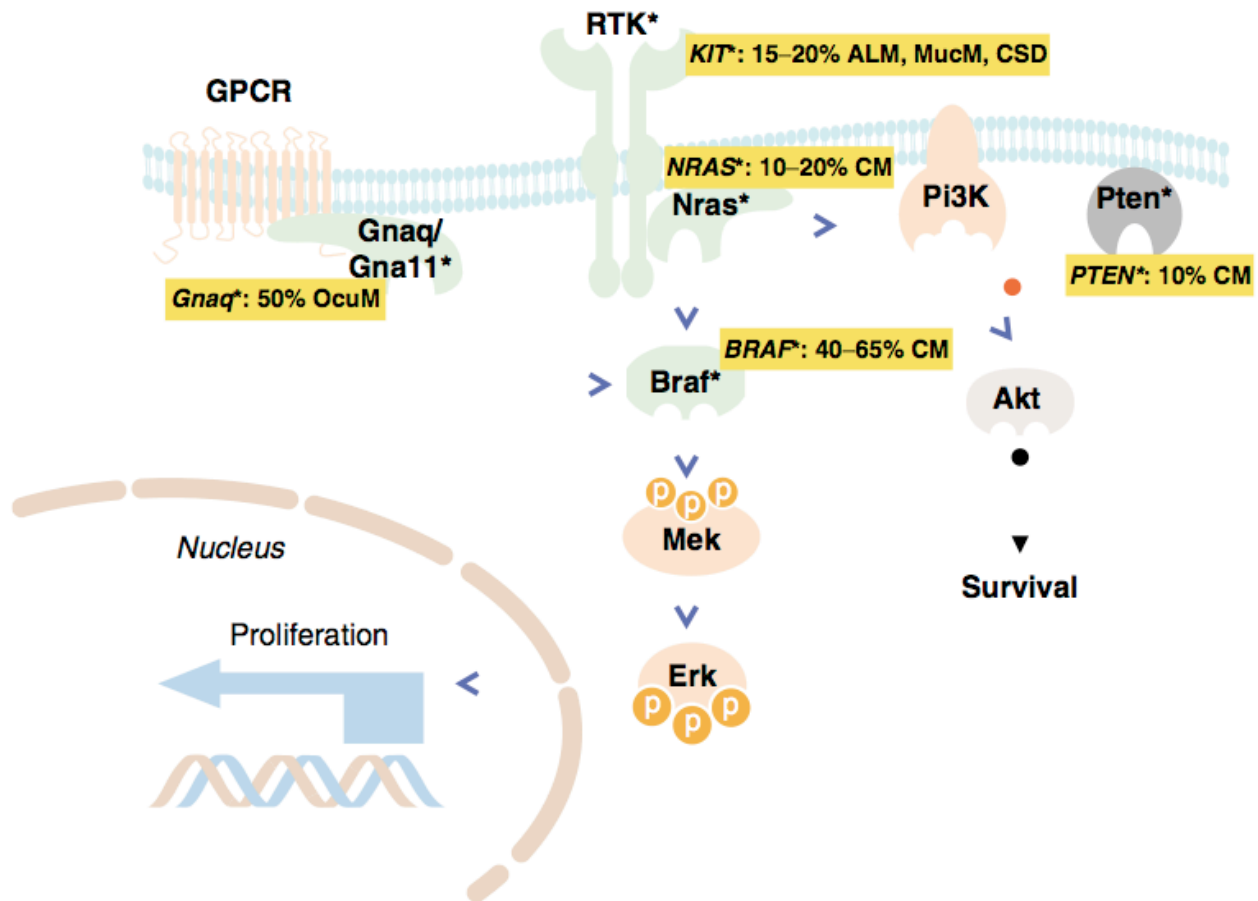


Figure 1 : Altérations moléculaires des voies de signalisation impliquées dans la mélanomagenèse. De nombreux acteurs de la cascade de la mélanomagenèse peuvent être mutés et activés. Les gènes sont notés en italique, les mutations activatrices sont ombrées en vert, les mutations inactivatrices en gris. La prévalence de ces différentes mutation apparaît en encadré jaune (RTK : Récepteur Tyrosine Kinase ; GPCR : Récepteur couplé aux protéines G ; ALM : Mélanome lentigineux acral ; MucM : Mélanome muqueux ; CSD : Mélanome lié à l'exposition solaire chronique ; OcuM : Mélanome oculaire ; CM : Mélanome cutané ((Bossert, 2011))

Oncogène	Voie de signalisation
C-KIT	RAS
NRAS	RAS
BRAF	MAP kinase
AKT	PI3 kinase
CDK4	p16/RB
Cycline D	p16/RB
MITF	Différenciation mélanocytaire
GNAQ/GNA11	Récepteurs couplés aux protéines G

Gène supresseur de tumeur	Voie de signalisation
PTEN	PI3 kinase
p16	p16/RB

Tableau 6 : Oncogènes et gènes supresseurs de tumeurs dans les voies de signalisation impactées par leurs mutations

## E. Diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire est réalisé pour les patients en situation métastatique afin d'adapter au mieux le traitement médical systémique. Ce diagnostic est réalisé soit sur l'analyse d'un ganglion lymphatique envahi, soit sur une métastase régionale, soit, si les deux cas de figure précédents sont impossibles, sur la tumeur primitive. En routine, le test principal est la recherche du statut mutational BRAF V600 permettant d'identifier les patients éligibles au traitement par inhibiteur antiBRAF ou antiMEK.

La **mutation BRAF** est retrouvée dans plus de 50% des cas de mélanomes (Davies et al., 2002). Les mutations du codon 600 représentent à elles-seules 90% des mutations observées. Ces mutations induisent une activation constitutionnelle de la protéine kinase BRAF, membre de la famille Raf qui régule les protéines MEK et ERK. Elle est située en aval des voies de signalisation des récepteurs à tyrosine kinase et des protéines Ras. Par ailleurs on estime à 7% les cancers, tout types confondus, qui portent une mutation du gène BRAF (Davies et al., 2002). Par ailleurs la mutation BRAF est aussi retrouvée dans certains naevi (Yeh et al., 2013). BRAF apparaît donc comme un véritable gène de prédisposition (Wan et al., 2004). Même si c'est un facteur de mauvais pronostic, il donne accès à une thérapie ciblée efficace : les molécules inhibitrices anti-BRAF comme le Vémurafénib ou le Dabrafénib. L'essai clinique de phase III BRIM3 (Chapman et al., 2011) a montré que 84% des patients avec une mutation BRAF V600E traités par Vémurafénib étaient vivants 6 mois après le début de l'étude contre 64% pour les patients traités par Dacarbazine. L'échappement est malheureusement la règle après quelques mois de traitement.

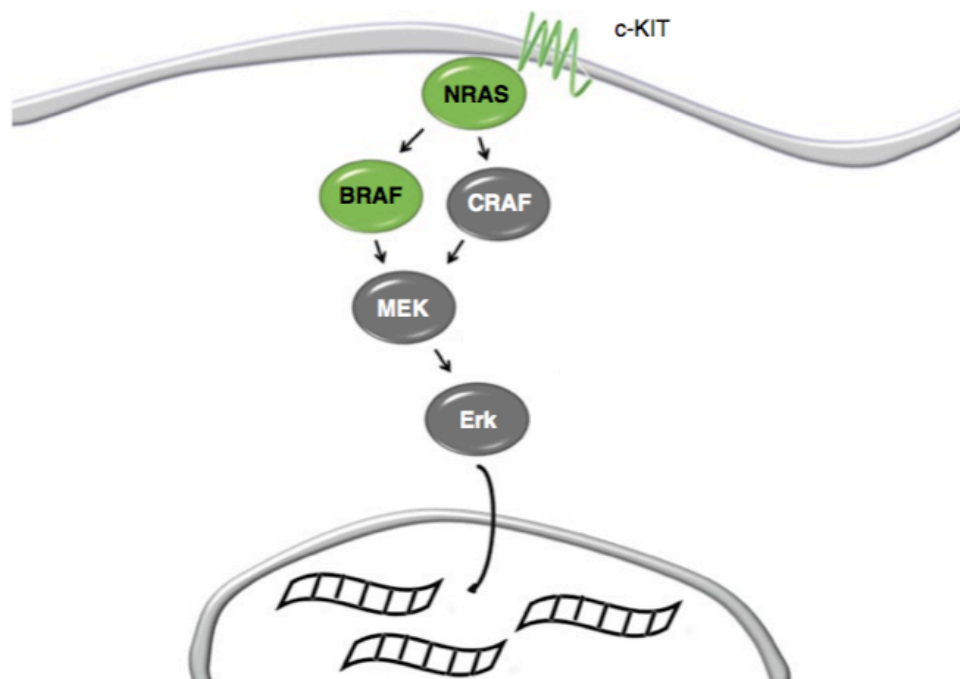


Figure 2 : Voie des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) (Chin et al., 2006)



Les **mutations NRAS** peuvent être retrouvées dans environ 15 à 20% des prélèvements. Or les mutations NRAS et BRAF sont mutuellement exclusives. La présence d'une mutation NRAS permet donc de confirmer le statut négatif vis à vis de la mutation BRAF. Actuellement les inhibiteurs de NRAS sont en cours de développement (Colombino et al., 2012).

Les **mutations CKIT** sont à rechercher pour compléter le bilan, en cas de mélanome acral ou de mélanome des muqueuses. CKIT est également une cible thérapeutique (Carvajal et al., 2011). L'anti CKIT développé est l'imatinib (Jun Guo et al., 2011). Un essai de phase II sur 295 patients atteints d'un mélanome acral ou des muqueuses a été mené en multicentrique d'Avril 2007 à Avril 2010. 28 patients ont été traités par imatinib à la dose de 400 mg, 2 fois par jour. Le taux de réponses durables comprenant les rémissions complètes et les réponses partielles durables (53 à 89 semaines) était évalué à 16%. Les patients répondeurs ont tous survécu plus d'un an.

## II. Prise en charge médicale du mélanome métastatique

Au stade de la tumeur primitive, le traitement de référence est l'exérèse chirurgicale. C'est le seul traitement potentiellement curatif du mélanome. Une fois l'exérèse initiale réalisée, une reprise chirurgicale emportant des marges de sécurité doit être effectuée. Son intérêt est d'éliminer les micrométastases locales. Les marges chirurgicales sont définies selon l'épaisseur du mélanome (indice de Breslow). Lorsque la récurrence se développe de façon locorégionale, la chirurgie est efficace lorsque le nombre de lésions est limité. Si les lésions sont plus diffuses et qu'elles se localisent à un membre, d'autres techniques telles que la chimiothérapie locale, la thermochimiothérapie ou la perfusion de membre isolé sont des alternatives souvent palliatives à la chirurgie.

Au stade d'envahissement ganglionnaire, le curage chirurgical reste le traitement de référence. Le curage doit s'étendre au minimum à l'aire de drainage atteinte mais il n'y a pas de consensus quant à la nécessité d'élargir aux aires ganglionnaires adjacentes. La radiothérapie ne peut être proposée qu'à titre palliatif lorsque les lésions ganglionnaires ne sont pas accessibles à la chirurgie.

Lorsque la maladie s'étend avec des métastases viscérales, la chirurgie peut encore être proposée sur lésion unique. La radiothérapie peut être traitée de manière palliative des métastases osseuses, des compressions médullaires ou des métastases cérébrales multiples. La radiothérapie stéréotaxique (Gamma-knife) est une technique qui permet de traiter de façon localisée après repérage stéréotaxique une lésion cérébrale unique. Le taux de contrôle est proche de celui des séries d'exérèse chirurgicale mais ce traitement est mieux toléré avec un faible taux de complications. Le maximum de lésions traitées de manière palliative par cette technique n'excède pas 3 ou 4 lésions de moins de 3 cm de diamètre (Gaudy-Marqueste et al., 2006).

Le traitement du mélanome métastatique est longtemps resté cantonné à quelques chimiothérapies cytotoxiques à efficacité limitée. La médiane de survie d'un patient métastatique était alors de moins de 1 an et moins de 10% des patients n'étaient en vie à 5 ans. Avant 2011, 2 molécules étaient prescrites : la dacarbazine et l'interleukine 2. Les essais multicentriques les plus récents ont démontré pour la

dacarbazine un taux de rémission (réduction de la masse tumorale supérieure à 50%) de l'ordre de 5-12% (Patel et al., 2011 ; Bedikian et al., 2011). La médiane de survie et la durée de survie sans récurrence restaient le plus souvent inchangées (Middleton et al., 2000). Les nouvelles thérapeutiques ciblées et l'immunothérapie ont montré depuis peu une efficacité certaine permettant d'allonger la durée de survie (Chapman et al., 2011 ; Hodi et al., 2010). Il s'agit d'un apport majeur très récent permettant également une amélioration de la qualité de survie et de la durée de survie sans récurrence.

## **A. Les chimiothérapies cytotoxiques**

De nombreuses molécules de chimiothérapie systémique ont été comparées au standard : la dacarbazine (Déticène® ou DTIC). La dacarbazine est un analogue des bases puriques qui se comporte comme un agent alkylant après activation hépatique. Historiquement, une réponse clinique après traitement au DTIC était observée pour 15% à 23 % des patients avec un taux de réponse complète de seulement 5%. En outre la durée de réponse est courte, de l'ordre de 4 à 6 mois. Aucun essai clinique randomisé n'a comparé la survie des patients traités par DTIC versus placebo ou « best supportive care » (Eigentler et al., 2003). Toutefois à la marge, quelques patients métastatiques avec un bon performans status et un taux de LDH normal (stades M1a et M1b de la classification AJCC) ont un contrôle prolongé de la maladie et parfois même une guérison. C'est le cas de 8 patients australiens sur une cohorte de 1100 patients suivis pendant 15 ans (Coates, Segelov, 1994). Les derniers essais de phase III contrôlés retrouvent des taux de réponse n'excédant pas les 12% (Middleton et al., 2000 ; Bedikian et al., 2006). Les schémas d'administration varient selon les équipes mais le standard utilisé dans les essais randomisés comparant les nouveaux traitements au Déticène® sont une dose unique de 850-1000 mg/m<sup>2</sup> par cycle. Les métastases répondant le mieux à la dacarbazine sont les métastases cutanées, ganglionnaires et pulmonaires.

En monochimiothérapie, l'alternative est le témozolomide (Temodal®) Il s'agit également d'un agent alkylant qui offre l'avantage de franchir la barrière hémato-encéphalique. De plus il est administrable per os (Patel et al., 2011). Cette molécule ne

dispose toutefois pas de l'AMM en France dans le mélanome métastatique même si des essais de phase I/II ont établi une efficacité équivalente à la dacarbazine (Bleehen et al., 1995).

La fotémustine (Muphoran®) peut, pour certains auteurs, être proposée en première ligne de traitement de métastases cérébrales (Jacquillat et al., 1990) car elle franchit elle aussi la barrière hémato-encéphalique. Les taux de réponse obtenus sont de 25 % environ (Calabresi et al., 1991) et de 5% à 8% pour les réponses complètes d'après 5 essais de phase II sur 351 patients publiés (Jacquillat et al., 1990 ; Calabresi et al., 1991 ; Kleeberg et al., 1995).

Les autres molécules testées ont montré de moins bons taux de réponse et une plus grande toxicité : cisplatine, carboplatine, nitroso-urées (BCNU, CCNU) ou alkaloïdes de la pervenche (vindésine et vinblastine). Les nitroso-urées BCNU et CCNU passent la barrière hémato-encéphalique mais, aux doses conventionnelles, aucune action contre les métastases cérébrales de mélanome n'a été observée (Boaziz et al., 1991). Par ailleurs BCNU et CCNU sont connus pour donner des myélosuppressions prolongées.

De nombreuses associations de molécules cytotoxiques ont été proposées pour améliorer les taux de réponse. Du fait de la faible efficacité des différents traitements les essais se sont multipliés sans grand rationnel biologique sous-jacent. Initialement des combinaisons de 2 agents ont été testées dans lesquelles la Dacarbazine était associée à un nitroso-urée, un alcaloïde, ou un sel de platine. Aucun essai n'a pu montrer une quelconque supériorité de ces associations par rapport à la Dacarbazine seule.

De nouvelles combinaisons associant 3 ou 4 agents cytotoxiques ont alors été proposées en essais de phase II. Une de ces combinaisons est le CVD pour Cisplatine, Vinblastine et Dacarbazine développée par Legha et al. pour qui le taux de réponse avoisinait 40% avec 4% de réponses complètes sur une cohorte de 50 patients (Legha et al., 1989). Toutefois un essai randomisé incluant 150 patients a donné 19% de taux de réponse contre 14% dans le bras Dacarbazine seule sans différence sur la durée de la réponse ni sur la survie (Buzaid et al., 1993). L'association de 4 molécules Cisplatine, Dacarbazine, Carmustine et Tamoxifène (CBDT), appelée association Darmouth, a été

évaluée dans un essai de phase III conduit par le National Cancer Institute of Canada (Rusthoven et al., 1996). Cet essai n'a pas montré de différence significative entre les 2 bras avec ou sans Tamoxifène. Aucune différence n'a pu être montrée dans un autre essai de phase III comparant le CBDT à la Dacarbazine seule (Chapman et al., 1999).

L'adjonction de Tamoxifène a été évaluée par l'association de Dartmouth. D'autres hormonothérapies ont été testées, notamment avec l'Interféron alpha (IFN- $\alpha$ ). Un essai de Phase III comprenant 4 bras pour comparer les associations de Tamoxifène ou d'IFN- $\alpha$  à la Dacarbazine a été mené par l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (Falkson et al., 1998). Aucun avantage en terme de taux de réponse ou de survie n'a pu être attribué à ces nouvelles combinaisons.

Plus récemment, des essais ont évalué des biochimiothérapies qui associent des chimiothérapies cytotoxiques à des cytokines interféron-alpha (IFN- $\alpha$ ) ou interleukine-2 (IL-2). Les taux de réponse sont un peu améliorés aux alentours de 40% à 60% avec un taux de réponses complètes d'environ 10%. Les 2 méta-analyses sur le sujet concluent à une augmentation du taux de réponse sans amélioration du taux de survie avec de plus grandes toxicités (Keilholz et al., 1998 ; Allen et al., 1998).

Les associations d'agents cytotoxiques entre eux ou avec des cytokines (interféron- $\alpha$  ou interleukine-2) augmentent parfois le taux de réponse thérapeutique mais malheureusement la durée de survie globale n'est jamais modifiée significativement. De plus la tolérance est moins bonne pour ces associations. Cette triste réalité souligne le besoin urgent d'alternatives thérapeutiques pour cette pathologie cancéreuse si résistante.

## **B. Les immunothérapies**

La plupart des découvertes sur l'immunologie des cancers humains ont été initiées à partir du modèle mélanome, une des tumeurs les plus immunologiques (Alexandrescu et al., 2010). De multiples approches novatrices cherchent à recruter le système immunitaire du patient pour lutter contre la maladie métastatique.

### ***a. Les cytokines***

Certaines cytokines comme l'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) et l'interleukine-2 (IL-2), seules ou en association ont fait l'objet de nombreux travaux et essais thérapeutiques depuis les années 1980 à l'initiative de Rosenberg.

#### ***Interleukine-2 (IL-2)***

Les effets biologiques de l'IL-2 sont complexes. Les propriétés anti-tumorales relèvent de l'induction par l'IL-2 de l'activité lytique des Lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et des Natural Killers (NK). Le schéma thérapeutique standard comprend 2 cycles par semaine, chaque cycle se composant de 8 à 14 administrations de hautes doses d'IL-2 (600,000 à 720,000 UI/kg i.v.) répétées toutes les 8 heures (Sparano et al., 1993). Ce schéma peut être répété toutes les 6 à 12 semaines. La durée médiane de réponse est d'environ 9 mois et 44% des répondeurs sont en vie à 6 ans (Atkins et al., 2000). Une étude de l'équipe de Rosenberg incluant 374 patients métastatiques traités par IL-2 à haute dose suggère que les patients ayant uniquement des métastases cutanées ont un meilleur taux de réponse (Phan et al., 2001). De plus le développement d'un vitiligo ou d'une dyfonction thyroïdienne est corrélé à une réponse positive au traitement.

## ***Interféron- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )***

L'interféron- $\alpha$ -2b en haute dose (IFN $\alpha$ 2b –HDI) selon le protocole de Kirkwood est le seul traitement adjuvant (après exérèse chirurgicale du mélanome primitif) reconnu en Europe actuellement (Ascierto et al., 2013). Une revue cochrane fait le point en 2013 sur l'efficacité de l'interféron- $\alpha$  en traitement adjuvant des mélanomes stades II et III. Cette méta-analyse a recensé 18 essais cliniques randomisés comprenant au total 10 499 patients. Le traitement adjuvant par IFN- $\alpha$  augmente la durée de survie sans récurrence pour les mélanomes non métastatiques de stades II et III (Mocellin et al., 2013). Dans cette indication adjuvante, la tolérance est bonne, une minorité d'effets indésirables de grades 3 et 4 ont été recensés ; parmi les plus fréquents, la fièvre (jusqu'à 8%) et la fatigue (jusqu'à 23%).

En situation métastatique les taux de réponse ne dépassent pas 15% et un tiers seulement des patients répondeurs ont une réponse prolongée (Agarwala, 2003). Les toxicités dose-dépendantes sont assez fréquentes et sérieuses pour brider l'utilisation de l'IFN-  $\alpha$  comme celle de l'IL-2.

Le mécanisme d'action de l'IFN- $\alpha$  semble être principalement immunomodulateur, tout en ayant une part d'activité antiproliférative. La liaison de l'IFN- $\alpha$  à des récepteurs membranaires induit l'activation de nombreuses voies de signalisation, principalement la voie JAK-STAT. L'étude du profil d'expression génique des patients atteints de mélanomes métastatiques montre un défaut d'activation des lymphocytes T et B par l'IFN (Critchley-Thorne et al., 2007). L'apport d'IFN- $\alpha$  peut en partie pallier à ce dysfonctionnement. Par ailleurs le taux de lymphocytes T-Régulateurs qui freinent l'activation du système immunitaire est significativement plus élevé chez les patients porteurs d'un mélanome métastatique. Une étude pilote suggère que l'IFN- $\alpha$  pourrait abaisser le taux de ces lymphocytes T-Regulateurs (Ascierto et al., 2010). Il est également rapporté une modulation de nombreuses cytokines par l'IFN- $\alpha$  . On peut noter d'une part une augmentation de la protéine anti-angiogénique IP-10, la protéine MIP, les interleukines IL-12p40 et IL-2R, les récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) TNF-RI et TNF-RII. On relève d'autre part une baisse des taux des facteurs de croissance (FGF, EGF, IGF,TGF- $\beta$ ) et des facteurs angiogéniques (VEGF) (Yurkovetsky et al., 2007).

## ***Associations IFN- $\alpha$ et IL-2***

L'association de l'IFN- $\alpha$  et de l'IL-2 est basée sur le principe que l'IFN- $\alpha$  augmente le taux d'antigènes HLA et d'antigènes associés à la tumeur, ce qui favorise l'action lytique des lymphocytes T soutenue par l'IL-2 (Cangemi et al., 2003). Toutefois les essais cliniques randomisés n'ont pas pu mettre en évidence une différence significative pour cette association comparativement à l'IL-2 haute dose seule (Marincola et al., 1995).

### ***b. Les vaccins***

Il y a plus d'un siècle qu'est né l'espoir que le système immunitaire puisse éliminer des cellules cancéreuses à l'instar des maladies virales et bactériennes. Dans les années 1950, les premiers modèles murins de xénogreffes de tumeurs humaines ont été mis au point. Leur observation a permis de montrer que les greffes tumorales pouvaient être rejetées chez des souris et que ces rejets étaient médiés par le système immunitaire, dans la plupart des cas par des lymphocytes T. Beaucoup de cellules tumorales humaines portent à leur surface des antigènes qui peuvent être reconnus par des lymphocytes T, en particulier des lymphocytes T cytolytiques (CTL), qui expriment les molécules CD8. Ces antigènes sont constitués d'un peptide d'une dizaine d'acides aminés issu de la dégradation intracellulaire d'une protéine cytoplasmique. Ce peptide est présenté à la surface de la cellule par les molécules d'histocompatibilité (HLA) de classe I. Ce complexe HLA-peptide peut être reconnu par les récepteurs d'un CTL spécifique de cet antigène. Le CTL activé suite à cette reconnaissance lyse la cellule qui porte l'antigène.

Dans un but thérapeutique il est donc indispensable d'identifier les antigènes pouvant servir de cible à une attaque par les CTL. Le but de la vaccination antitumorale est de faire réagir le système immunitaire du patient, et plus particulièrement ses CTL, contre les antigènes tumoraux exprimés par sa propre tumeur, en espérant que les CTL activés par le vaccin détruisent les cellules tumorales sans altérer les tissus normaux. Il s'agit de vaccins thérapeutiques, c'est-à-dire administrés après le début de la maladie.



De nombreuses pistes de recherche ont été explorées dans les 30 dernières années sans réel résultat (Yannelli, Wroblewski, 2004 ; Rosenberg et al., 2004) ; il s'agit de vaccins basés sur des cellules tumorales entières (Mitchell et al., 2007), des peptides tumoraux comme gp100 (Steven A Rosenberg, 1998 ; Slingluff et al., 2013), des protéines (MAGE par exemple) des cellules tumorales génétiquement modifiées (Soiffer et al., 1998), des cellules dendritiques (Engell-Noerregaard et al., 2008), le complexe protéique Heat-Shock (HSP) (Testori et al., 2008).

Les gènes MAGE ne sont exprimés dans les tissus normaux sauf dans les cellules de la lignée germinale mâle qui ne portent pas de molécules HLA et ne peuvent donc pas présenter d'antigènes aux Lymphocytes T Cytotoxiques (CTL). Le caractère spécifique des antigènes tumoraux codés par les gènes MAGE prévient donc tout effet secondaire néfaste sur les cellules normales. Par ailleurs le fait qu'ils soient présents sur de nombreuses tumeurs permet d'appliquer le même vaccin à de nombreux patients, ce qui permet d'envisager un développement industriel. A partir d'un fragment tumoral prélevé chez le patient, une analyse par RT-PCR vérifie l'expression du gène MAGE qui code pour l'antigène. Le patient reçoit des vaccinations répétées par voie intradermique ou sous-cutanée car la peau est particulièrement riche en cellules dendritiques, qui jouent un rôle important dans le déclenchement d'une réponse immunitaire.

Une autre approche consiste à administrer un vaccin à base de cellules dendritiques autologues. Des cellules monocytaires sont prélevées par leucaphérèse chez le patient puis cultivées avec des cytokines comme l'IL4 et le GM-CSF qui les font se différencier en cellules dendritiques. Elles sont ensuite incubées avec un ou plusieurs peptides antigéniques. Les peptides se placent sur des molécules HLA présentes sur les cellules dendritiques et reconstituent ainsi les antigènes tumoraux. Elles sont ensuite réinjectées au patient pour l'immuniser.

Toutes études confondues, les vaccins quels qu'ils soient, induisent des régressions tumorales chez 5 à 20 % des malades vaccinés. Ces résultats restent insuffisants pour valider les vaccins thérapeutiques comme traitement reconnu du mélanome métastatique. Les régressions tumorales, parfois complètes, doivent nous rappeler que cette approche ne doit pas être abandonnée (Baurain et al., 2008).

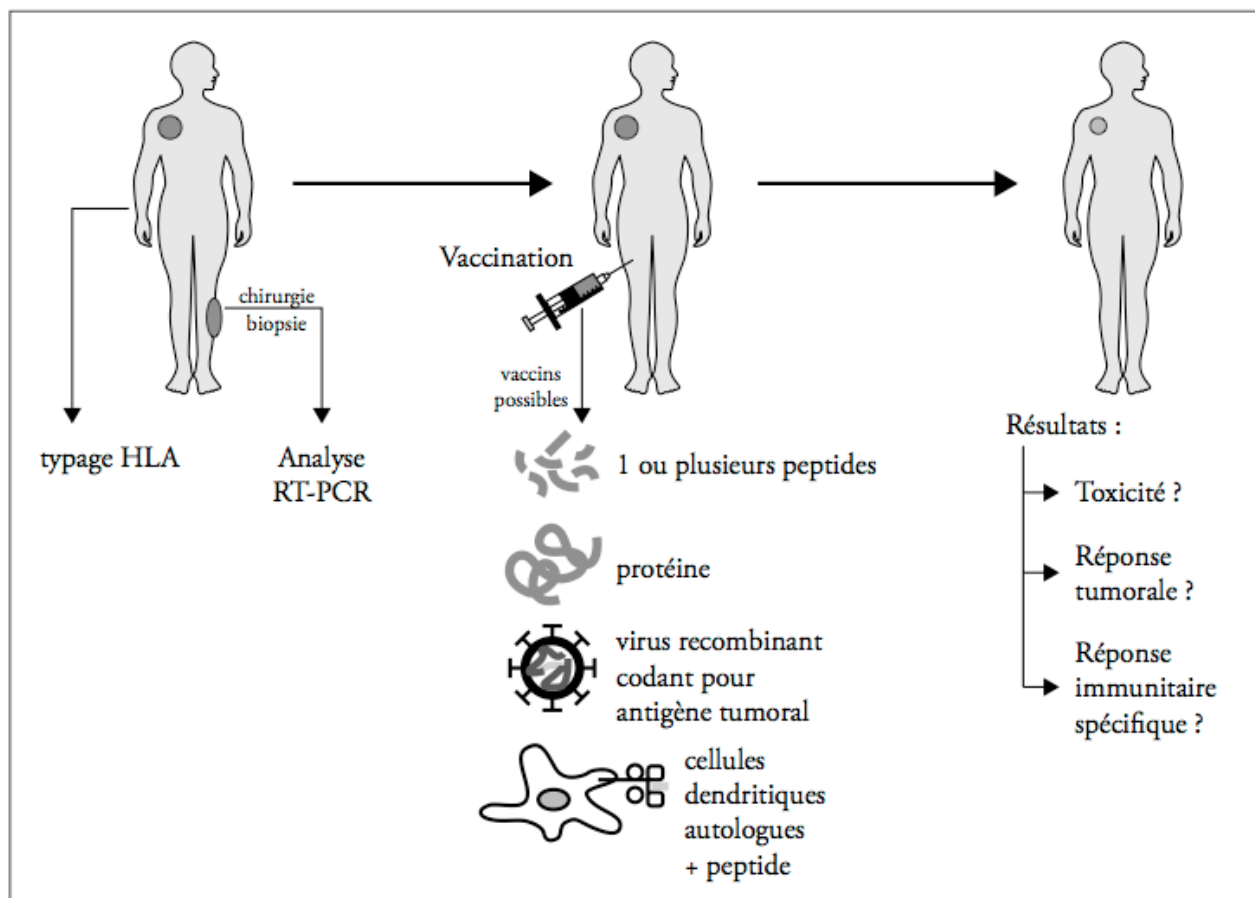


Figure 3 : Principe de la vaccination antitumorale thérapeutique. La première étape consiste à déterminer si les cellules cancéreuses du patient expriment l'antigène tumoral par un typage HLA et l'analyse d'un prélèvement tumoral par RT-PCR. Les patients reçoivent alors des injections répétées d'un vaccin contenant l'antigène (Baurain et al., 2008)

Malheureusement le mélanome comme d'autres tumeurs échappent au système immunitaire. Les mécanismes de résistance sont multiples, ce qui explique probablement que les résultats in vivo dans des essais cliniques ne sont pas à la hauteur des succès dans les modèles pré-cliniques. La tumeur est capable de produire des facteurs immunosuppresseurs comme le Fas ligand, TGF- $\beta$ , IL-6, IL-10, PGE2, VEGF. A l'inverse la tumeur peut induire la suppression de molécules co-stimulatrices comme le CD40, CD80 et CD86. L'échappement tumoral peut également se faire par sécrétion de microvésicules appelées exosomes contenant des antigènes tumoraux de la classe I HLA ou de nombreuses molécules inhibitrices comme HLA-G, FasL ou des inhibiteurs de la maturation des cellules dendritiques.

### ***c. Les anticorps monoclonaux***

D'autres voies de traitement visent à stimuler de façon aspécifique le système immunitaire. Certaines molécules exprimées par les lymphocytes permettent leur down-regulation pour éviter tout emballement du système. Parmi ces molécules on trouve le Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 (CTLA-4) et le récepteur Programmed Death-1 (PD-1). Si ces freins naturels des lymphocytes sont bloqués par des anti-corps spécifiques, le système immunitaire est alors stimulé.

L'ipilimumab est le premier anti-corps anti-CTLA-4 ayant montré un bénéfice en terme de durée de survie dans plusieurs essais randomisés (Hodi et al., 2010 ; Robert et al., 2011 ; Attia et al., 2005). L'ipilimumab est administré par voie intra-veineuse en 4 cures séparées par 3 semaines d'intervalle. L'action de l'ipilimumab porte sur l'ensemble de la population lymphocytaire, à l'intérieur du ganglion. La toxicité auto-immune est parfois sévère ; sont rapportés des rash cutanés et prurit (47-68%), des diarrhées et entérocolites (31-46%), des hépatites (3-9%), des hypophysites (4-6%) (Weber et al., 2012). Le taux de réponse n'est que d'environ 15%, mais des durées de rémissions remarquables ont été rapportées chez des patients en stade IV ayant déjà reçu d'autres traitements. L'autorisation de mise sur le marché en Europe est donnée pour les patients ayant reçu une première ligne de chimiothérapie classique. Aux Etats-Unis l'ipilimumab est autorisé en première ligne.

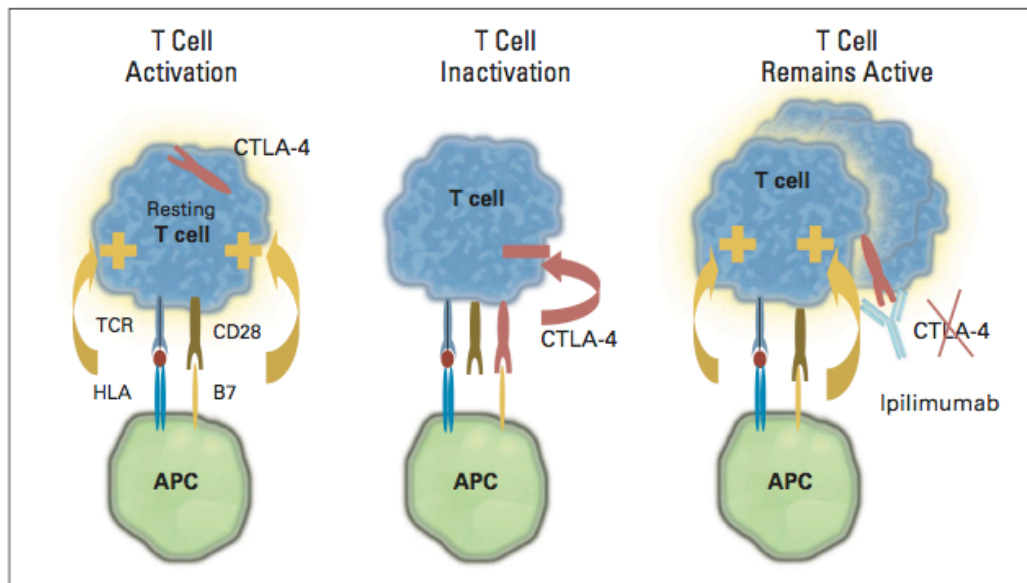


Figure 4 : Mécanisme d'action de l'ipilimumab. APC : cellule présentatrice de l'antigène ; TCR : Recepteur du lymphocyte T

PD-1 est une autre molécule inhibitrice exprimée à la surface des lymphocytes T. Si la cellule tumorale exprime à sa surface un récepteur de PD-1 appelé PD-L1, elle neutralise l'effet de PD-1 et s'en prémunit. Un anticorps anti-PD1 (MDX-1106/ONO-4538) est actuellement testé en phase I (Dallas B Flies, 2011). L'action de PD-1 et de son anticorps siège au niveau de la cellule tumorale. Les tumeurs exprimant PD-L1 seront plus sensibles à cet anticorps : PD-L1 est donc un marqueur prédictif de réponse à ce traitement.

Des modèles murins ont permis de démontrer l'efficacité *in vivo* d'un anticorps agoniste de CD40 (CP-870,893) sur différentes cellules tumorales (Gladue et al., 2006). L'activation de CD40 contient les mécanismes immunosuppresseurs de la tumeur et augmente l'activation des lymphocytes T. Un essai de phase I montre une bonne tolérance et une réponse objective chez 27% des 29 patients inclus dans cet essai (Vonderheide et al., 2007).

Les agonistes des Toll-Like récepteurs (TLR) sont en cours d'évaluation pour leur capacité d'activation des cellules dendritiques et de la réponse immunitaire Th1. En effet les cellules dendritiques mais aussi les monocytes et d'autres types cellulaires du système immunitaire héréditaire sont porteurs de protéines transmembranaires :

les Toll-Like récepteurs (TLR). L'activation des TLR augmente la réponse immunitaire de différentes manières. Certaines cytokines sont activées. La phagocytose est stimulée. En outre on note une augmentation de l'expression de molécules co-stimulatrices comme CD80 ou CD86 sur les cellules dendritiques, améliorant ainsi l'activation des lymphocytes T.

Ainsi il est apparu intéressant de développer des activateurs pharmacologiques des TLR. Parmi eux, l'imiquimod est un agoniste synthétique de TLR7. Sous forme de crème pour application locale, l'imiquimod a montré quelques effets positifs de régressions partielles ou parfois totales sur des naevi dysplasiques (Dusza et al., 2006), des mélanomes in situ, des carcinomes basocellulaires et des nodules de perméation cutané de mélanomes (Zeitouni et al., 2005). Il pourrait avoir une place dans l'arsenal thérapeutique comme adjuvant à des stratégies de vaccinothérapies (Schön et al., 2004).

### **C. Les thérapies ciblées**

Des avancées significatives ont été faites durant ces 10 dernières années dans la connaissance et la compréhension des modifications génétiques des mélanomes. Les mélanomes regroupent en fait de nombreux types tumoraux très hétérogènes quant à leur profil de mutations oncogéniques. Certaines de ces mutations activatrices comme la sérine/thréonine kinase BRAF ou le récepteur de tyrosine kinase KIT sont devenues des cibles thérapeutiques efficaces pour certains sous-groupes de mélanomes (Smalley, McArthur, 2012).

En 2002, Davies et al (Davies et al., 2002) montrent qu'environ 50% des mélanomes portent la mutation activatrice BRAF. Trois Sérine/Thréonine Kinases (ARAF, BRAF et CRAF) forment la famille des protéines raf. Plus de 50 mutations distinctes ont été identifiées sur BRAF à ce jour. Parmi elles, la mutation BRAF V600E est la plus répandue (80% de toutes les mutations connues). Elle résulte de la substitution d'une valine par un acide glutamique (Wan et al., 2004). L'activité oncogénique principale de la mutation BRAF passe par l'activation de la cascade des

MAPKinases (Mitogen Activated Protein Kinase). La voie des MAPK régule l'entrée dans le cycle cellulaire en contrôlant l'expression de la cycline D1 et la suppression de p27<sup>KIP1</sup> (Bhatt et al., 2005).

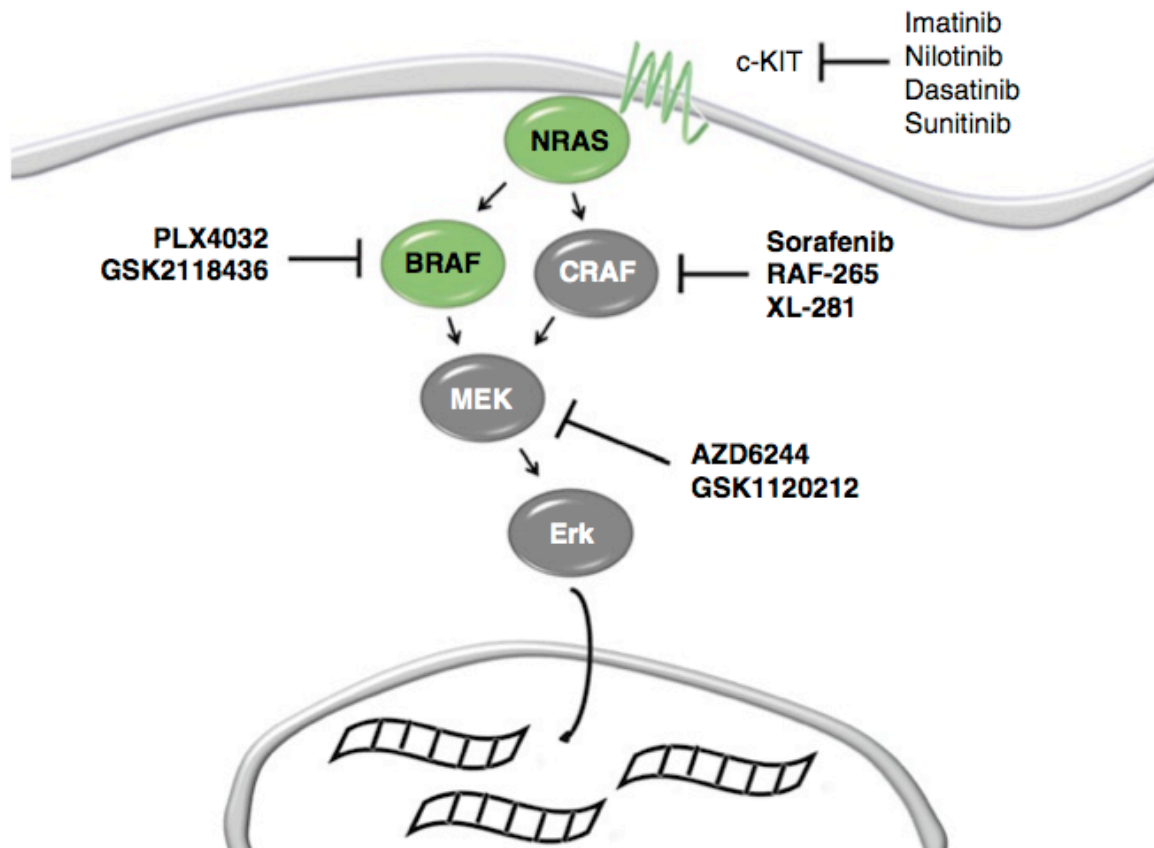


Figure 5 : les inhibiteurs de c-KIT, BRAF et MEK sur la cascade des Mitogen Activated Protein Kinases. Les inhibiteurs de BRAF actuellement développés sont le Vémurafénib (PLX4032) et le Dabrafénib (GSK2118436) ((Bosserhoff, 2011))

Des études in vitro ont pu montrer que la mutation BRAF V600E est un oncogène dans les mélanocytes murins et que l'inactivation de ce gène muté par siRNA réprime la transformation maligne du mélanocyte : cette mutation oncogénique devient alors une cible thérapeutique (Wellbrock et al., 2004 ; Hingorani et al., 2003 ;

Karasarides et al., 2004). Toutefois la seule mutation BRAF V600E n'est pas suffisante pour transformer le phénotype d'un mélanocyte murin. Il semble que la co-activation de la voie PI3K/AKT soit également nécessaire. Cette dernière peut être activée par la suppression de l'expression de PTEN comme le montre Dankort et al. (Dankort et al., 2009). PTEN est un gène suppresseur de tumeurs qui inhibe la voie PI3K - AKT.

Il est maintenant établi que le statut mutationnel tumoral peut correspondre aux différents sous-types cliniques de mélanomes ainsi qu'aux facteurs de risque connus. Ainsi la mutation BRAF apparaît plus fréquemment dans la population exposée au soleil de manière intermittente, plutôt jeune (<55 ans) avec une dose d'exposition UV cumulée peu importante, présentant un mélanome du tronc de forme clinique SSM (Viros et al., 2008 ; Long et al., 2011). Le statut mutationnel BRAF est également un facteur pronostic prédictif péjoratif au stade métastatique (8,5 mois si BRAF wild-type vs. 5,7 mois pour un mélanome muté BRAF) (Long et al., 2011).

De petites molécules inhibitrices de BRAF ont été développées : le Dabrafenib et le Vémurafenib pour les premières mises sur le marché (Chapman et al., 2011 ; Menzies et al., 2012). In vitro ces thérapies ciblées provoquent l'arrêt du cycle cellulaire et induisent l'apoptose. Le Vémurafenib diminue la prolifération tumorale en réduisant ERK phosphorylé et la cycline D1 (Tsai et al., 2008). Un essai de phase 3 a comparé le Vémurafenib à la chimiothérapie standard Dacarbazine (Déticène®) chez 675 patients (Chapman et al., 2011). La survie globale et la survie sans récurrence augmentent significativement pour les patients traités par Vémurafenib. Cet essai a conduit à l'autorisation de la Food and Drug Administration en Août 2011 aux Etats-Unis. Le Vémurafénib (Zelboraf®) a obtenu un avis favorable de la commission d'AMM de l'agence européenne du médicament en décembre 2011 pour le traitement des adultes atteints de mélanome métastatique avec mutation du codon 600 du gène BRAF.

Un des effets indésirables important est le développement de carcinomes épidermoïdes (le plus souvent des kératoacanthomes) chez plus de 26% des patients traités (Belum et al., 2013). Le mécanisme physiopathologique sous-jacent serait une transactivation paradoxale de CRAF dans les kératinocytes (Su et al., 2012).

Malheureusement des résistances apparaissent relativement rapidement (5 à 7 mois). Les mécanismes de résistance sont complexes et multifactoriels (Smalley,

Sondak, 2010). On peut schématiquement décrire des mécanismes dépendant de la voie MAPK et d'autres indépendant de cette voie.

Parmi les mécanismes réactivant la voie des MAPK, ont été observées des modifications de BRAF comme une amplification du mutant BRAF ou une modification de la protéine BRAF plus facilement dimérisable avec une meilleure activité kinase (Poulikakos et al., 2011). Aucune mutation secondaire de BRAF n'a pu être mise en évidence à ce jour alors que c'est un mécanisme de résistance classiquement observé dans d'autres cancers traités par des thérapies ciblées. Par contre, on a détecté des mutations secondaires de NRAS (en amont) et de MEK (en aval) dans les tumeurs de patients échappant au traitement (Wagle et al., 2011). Par ailleurs la surexpression de la protéine COT (Cancer Osaka Thyroïde) qui active ERK par l'activation de MEK a également été rapportée (Johannessen et al., 2010).

Dans certains cas de résistance, la voie MAPK semble toujours inactivée. Le mécanisme d'échappement passe alors par d'autres voies comme la voie PI3-AKT-mTOR. La surexpression de PDGFR- $\beta$  et celle de IGF1R sont des signaux activateurs de cette voie. PI3K, AKT ou mTOR sont alors autant de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant s'associer aux inhibiteurs de BRAF (Shi et al., 2011 ; Villanueva et al., 2010). Shi et al. obtiennent une inhibition de croissance synergique sur des lignées de mélanome en les traitant concomittamment avec un inhibiteur anti-BRAF (Vémurafénib) et un inhibiteur de la voie PI3K - AKT- mTOR (AZD8055) (Shi et al., 2011).



### III. Une proposition thérapeutique novatrice étudiée dans le laboratoire : l'approche métabolique

L'une des principales caractéristiques métaboliques des cellules cancéreuses est l'avidité au glucose. Les travaux d'Oto Warburg (Warburg, 1956) montrent que cette surconsommation passe par un switch métabolique sur la voie de la glycolyse au détriment de la voie oxydative mitochondriale. La voie glycolytique, bien que moins efficace en terme de production énergétique que la voie oxydative, permet à la cellule de faire face à tous ses besoins vitaux primaires : production minimum énergétique et production des précurseurs métaboliques indispensables aux synthèses des protéines et des acides nucléiques. Ceci confère à la cellule cancéreuse un avantage sélectif dans son processus prolifératif.

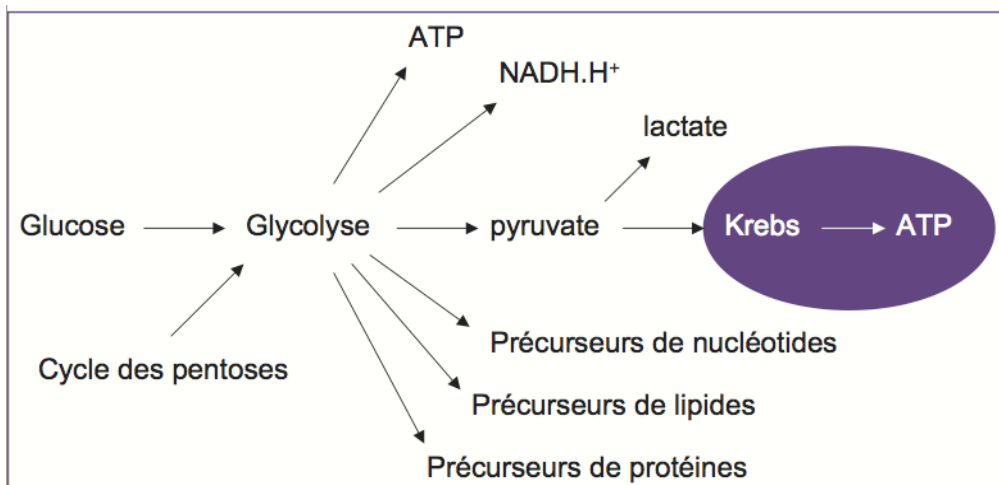


Figure 6 : Utilisation du glucose pour tous les besoins de la cellule en précurseurs métaboliques (Malthièry, Savagner, 2006)

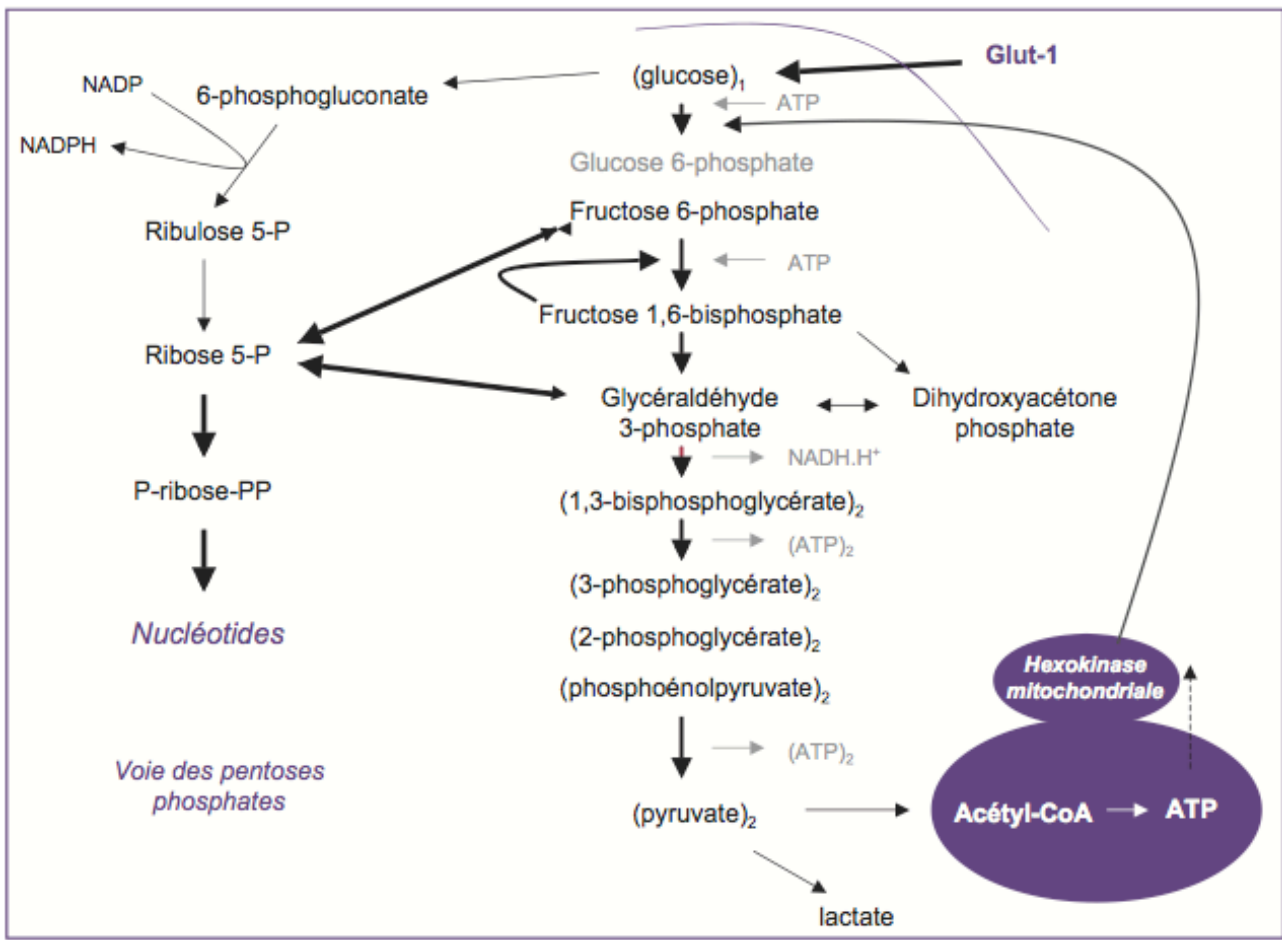


Figure 7 : Augmentation de la glycolyse dans la cellule tumorale (Malthièry, Savagner, 2006)

Ce sont différentes modulations enzymatiques qui permettent à la cellule cancéreuse de privilégier la voie de la glycolyse. La captation intracellulaire du glucose est assurée par des transporteurs de type Glut-1. L'augmentation du flux de glucose est le fruit d'une augmentation de leur activité mais aussi de leur expression à la surface de la cellule. La phosphorylation du glucose en G6-P est assurée par une hexokinase liée aux membranes externes de la mitochondrie : l'hexokinase 2 (HK2). Cette kinase n'est pas sensible au rétro-contrôle négatif contrairement à l'hexokinase 1. L'amplification de la HK2 permet l'augmentation sans frein de la glycolyse. La HK2 a un mécanisme d'action plus complexe car elle agit non seulement comme catalyseur de la glycolyse mais également comme bloqueur de la fonction mitochondriale. En effet la HK2 se lie au système VDAC (Voltage-Dependent Anion Chanel) ce qui inhibe

BAX/BAK, empêchant alors l'ouverture des pores à cytochrome c dépendant de BAX/BAK et réalisant un signal d'apoptose.

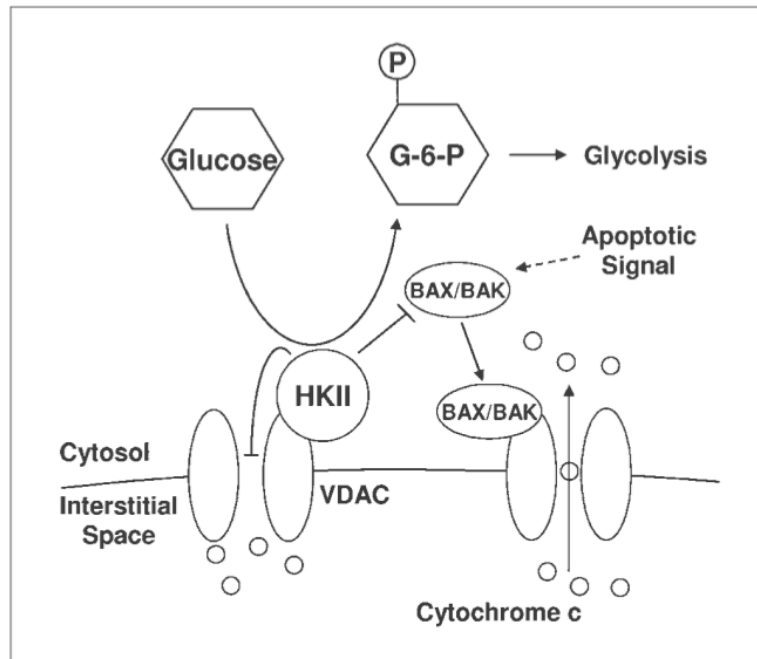


Figure 8 : Double rôle de l'Hexokinase 2 (HK2). D'une part la HK2 phosphoryle le glucose lorsqu'il entre dans la cellule, ce qui permet son métabolisme. D'autre part la HK2 bloque le canal VDAC (voltage-dépendant anion channel) situé sur la membrane externe de la mitochondrie. Ceci bloque l'ouverture des pores de la mitochondrie sous dépendance de BAX, empêchant le relargage du cytochrome c et l'apoptose (Hersey et al., 2009)

Par ailleurs l'activité de la pyruvate kinase est généralement augmentée dans la cellule cancéreuse, probablement fortement régulée par les produits d'oncogènes impliqués dans le cycle cellulaire.

De même l'activité Lactate Déshydrogénase (LDH) est très augmentée. Plusieurs études démontrent que l'activité LDH sérique est le meilleur marqueur de l'agressivité tumorale du mélanome (Deichmann et al., 1999). Le taux de LDH permet également d'identifier des mélanomes résistants à certains traitements (Bedikian et al., 2006). La LDH est codée par 2 gènes : le gène LDH-A (M-muscle) et le gène LDH-B (H-Heart). Ces

2 gènes codent pour 2 chaînes polypeptidiques : les sous-unités M et H. Selon les différentes combinaisons de ces 2 sous-unités, on distingue 5 isoformes de la LDH (Markert, Ursprung, 1962). La LDH-1 est l'isoforme composée par 4 sous-unités H et la LDH-5 par 4 sous-unités M. La LDH-5 est l'isoforme la plus efficace pour catalyser la conversion de pyruvate en lactate . Le taux de LDH-5 fait partie des facteurs pronostics des mélanomes primitifs.

Ces régulations enzymatiques du métabolisme énergétique sont modifiées sous l'effet d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs. Ainsi la mutation du gène suppresseur Von Hippel-Lindau entraîne une déplétion en protéine pVHL. Sous cette influence, les transporteurs membranaires Glut-1 et Glut-3 sont augmentés, favorisant le transport intracellulaire du glucose. Autre exemple, la protéine p53 favorise l'expression de l'hexokinase HK2 liée à la membrane de la mitochondrie au détriment de la forme soluble HK1, ce qui stimule la phase initiale de la glycolyse. Par ailleurs, l'oncogène Myc stimule directement la LDH. Mais surtout le facteur HIF-1 (Hypoxia Inductible Factor) apparaît comme un potentialisateur global de ce switch métabolique. Sous l'action d'oncogènes tels que Ras et sous l'effet de la déplétion de la protéine pVHL, HIF-1 est activé. Son activation correspond à une stabilisation qui le rend actif (comme sous l'effet de l'hypoxie) même en normoxie. Ce facteur stabilisé a un effet global sur toute la voie de la glycolyse en activant toutes les enzymes de cette voie et en inhibant fortement la voie oxydative, même en présence d'oxygène. Ceci conditionne un état de glycolyse en aérobie.

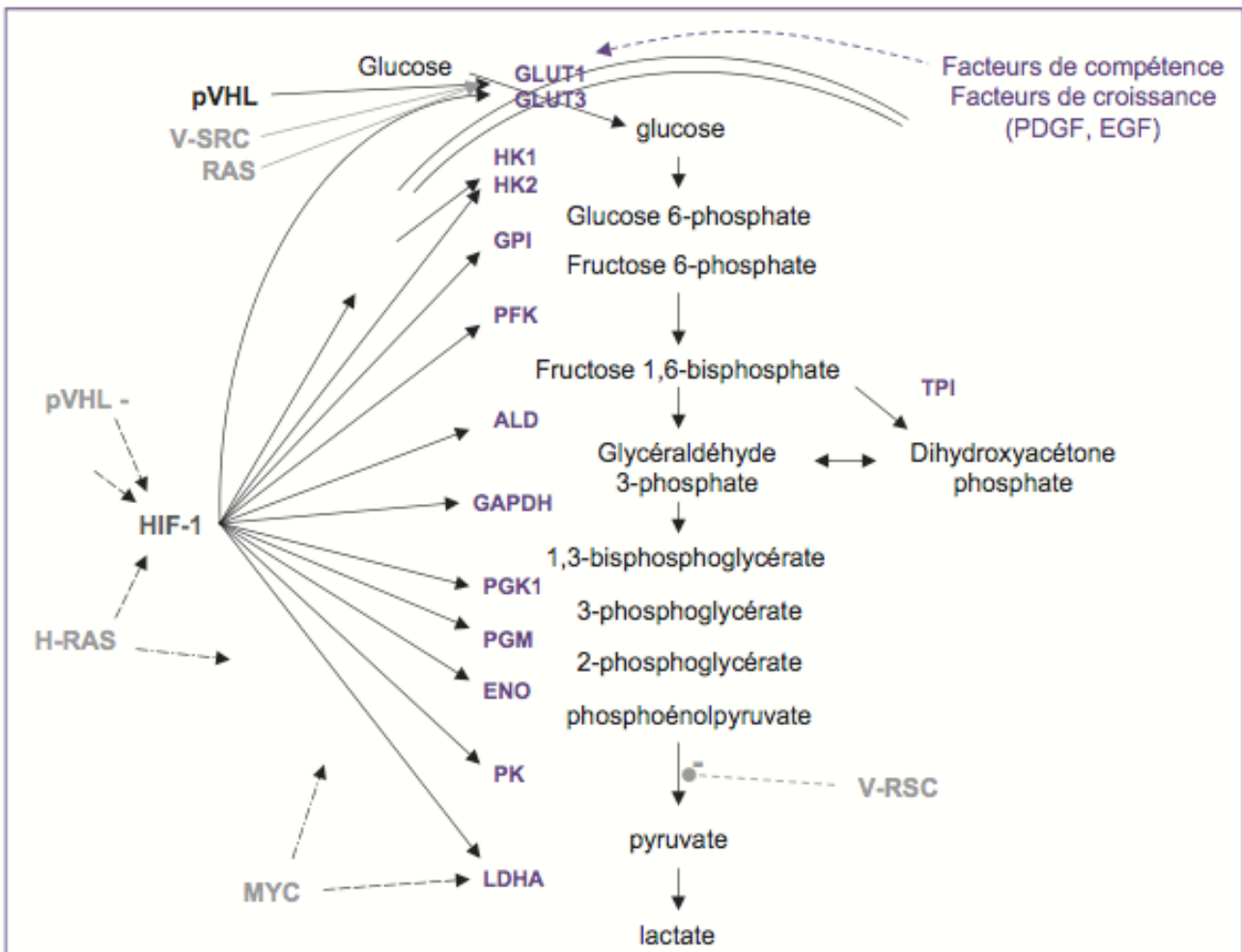


Figure 9 : Rôle de l'Hypoxia Inducible Factor - 1 (HIF-1) dans l'induction vers la voie glycolytique (Malthièry, Savagner, 2006)

Toutes ces connaissances au sujet du métabolisme particulier de la cellule tumorale et en particulier du mélanome conduisent à proposer des cibles thérapeutiques métaboliques.

Il est alors possible d'induire la mort cellulaire par différents biais touchant le métabolisme de la cellule tumorale : bloquer l'excrétion d'acide de la cellule, réduire la glycolyse et relancer la voie oxydative mitochondriale ou encore « affamer » la cellule en la privant de ses sources d'énergie.

Bloquer l'excrétion des ions  $H^+$  et du lactate pourrait induire la mort cellulaire. Toutes les cellules possèdent des pompes à protons pour excréter les ions  $H^+$  dont les

plus importantes sont les V-ATPases (vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPases) et les H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPases (Fais et al., 2007). Leur activité maintient un pH intracellulaire relativement neutre et un milieu extracellulaire acide. L'acidité du milieu extracellulaire permet l'activation de protéases importantes dans le processus métastatique du mélanome. L'activité de la V-ATPase semble augmentée dans les formes cancéreuses hautement métastatiques (Rofstad et al., 2006 ; Sennoune et al., 2004). Ainsi les pompes à protons sont d'éventuelles cibles thérapeutiques et les agents pharmacologiques sont les inhibiteurs de la pompe à proton (IPP) comme l'omeprazole parfois avantageusement renforcés par la N-acetyl-cystéine (NAC) (Marino et al., 2010).

Réduire la glycolyse et relancer la respiration mitochondriale permettent également de freiner la prolifération tumorale. Ainsi le blocage de la voie glycolytique par l'inhibition de la conversion de pyruvate en lactate augmente la phosphorylation oxydative et empêche la croissance tumorale de lignées cellulaires de cancer du sein (Fantin et al., 2006 ; Bonnet et al., 2007). Plus récemment dans le mélanome métastatique, Kluza et al. (Kluza et al., 2012) ont montré que le blocage de la Pyruvate Déshydrogénase Kinase 3 (PDK3) relance la respiration mitochondriale et bloque la voie de la glycolyse. L'agent pharmacologique utilisé, le Dichloro-acétate (DCA) a pour indication clinique standard le traitement de l'acidose lactique notamment dans le traitement de mitochondriopathies congénitales. Le DCA bloque la PDK3 qui est elle-même un inhibiteur de l'entrée du pyruvate dans la voie oxydative du cycle de Krebs. L'utilisation du DCA conduit donc à privilégier la transformation du pyruvate en AcétylCoA pour entrer dans le cycle de Krebs. La voie de la respiration mitochondriale est relancée avec notamment l'augmentation de production de Reactive Oxygen Species (ROS). Les cellules tumorales sont alors plus vulnérables au stress oxydant. Un agent pro-oxydant comme l'elesclomol peut avoir un rôle antitumoral notable sur ces cellules de mélanome au métabolisme préalablement modifié.

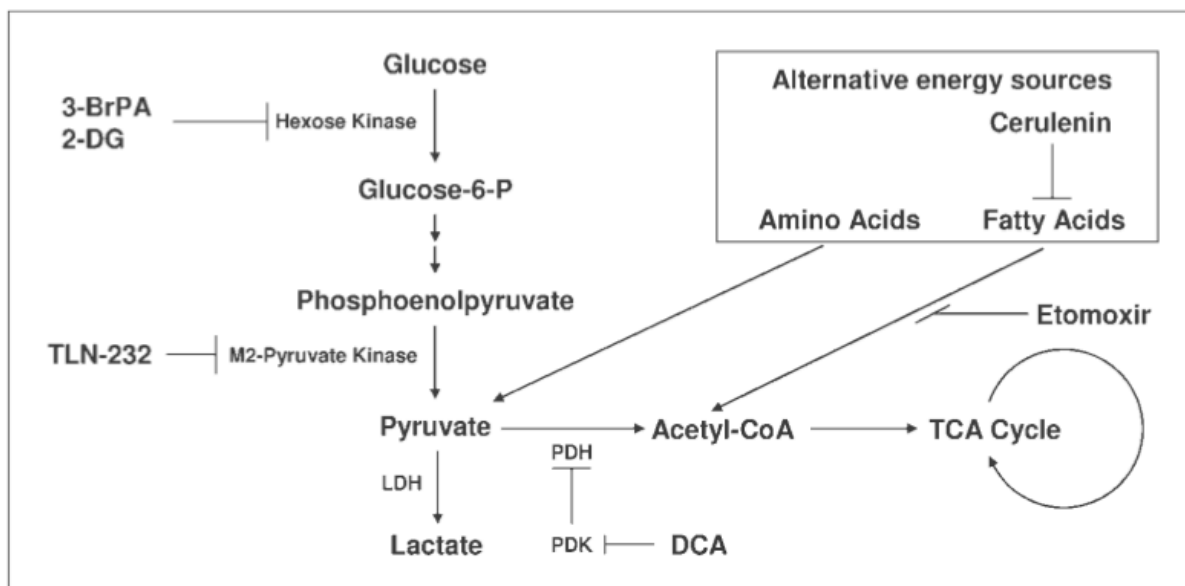


Figure 10 : Effet du DichloroAcétate (DCA). Le DCA freine l'action de l'inhibiteur (la pyruvate déshydrogénase kinase, PDK) de la pyruvate déshydrogénase (PDH) qui, elle, active la transformation du pyruvate en acetylCoA : la voie mitochondriale est relancée aux dépens de la glycolyse (Hersey et al., 2009)

Une troisième approche par les traitements métaboliques consiste à affamer les cellules tumorales. Le 3-bromopyruvate (3-Br-PA) permet de vider la cellule de son ATP en l'empêchant d'utiliser le glucose qui lui arrive. On lui connaît un effet antitumoral sur l'hépatocarcinome (Ko et al., 2004) ou le cancer du sein (Buijs et al., 2009) dans des modèles murins. Le 3-Br-PA est un agent alkylant dont la structure est similaire à celle du lactate. Il inhibe l'action des hexokinases et bloque la transformation du glucose en G-6-P donc l'utilisation du glucose par la cellule. On peut également priver la cellule de l'apport en glucose en utilisant le 2-DG. Le 2-DG est capté par la cellule cancéreuse puis phosphorylé par les hexokinases mais non métabolisé. C'est un compétiteur du glucose qui est moins facilement métabolisé en G-6-P.

## IV. Les modèle animaux en cancérologie

Les multiples propositions thérapeutiques, i.e. chimiothérapies cytotoxiques, cytokines, vaccins, anticorps monoclonaux, thérapies ciblées, approches métaboliques forment un large choix pour lequel le clinicien a besoin de marqueurs prédictifs. Les biomarqueurs moléculaires sont bien sûr essentiels mais ils manquent parfois de spécificité. Ils peuvent être associés entre eux ou à d'autres examens comme l'imagerie métabolique. Les modèles animaux peuvent compléter l'arsenal pour prédire la réponse à certains traitements et améliorer les connaissances fondamentales de ces approches thérapeutiques variées.

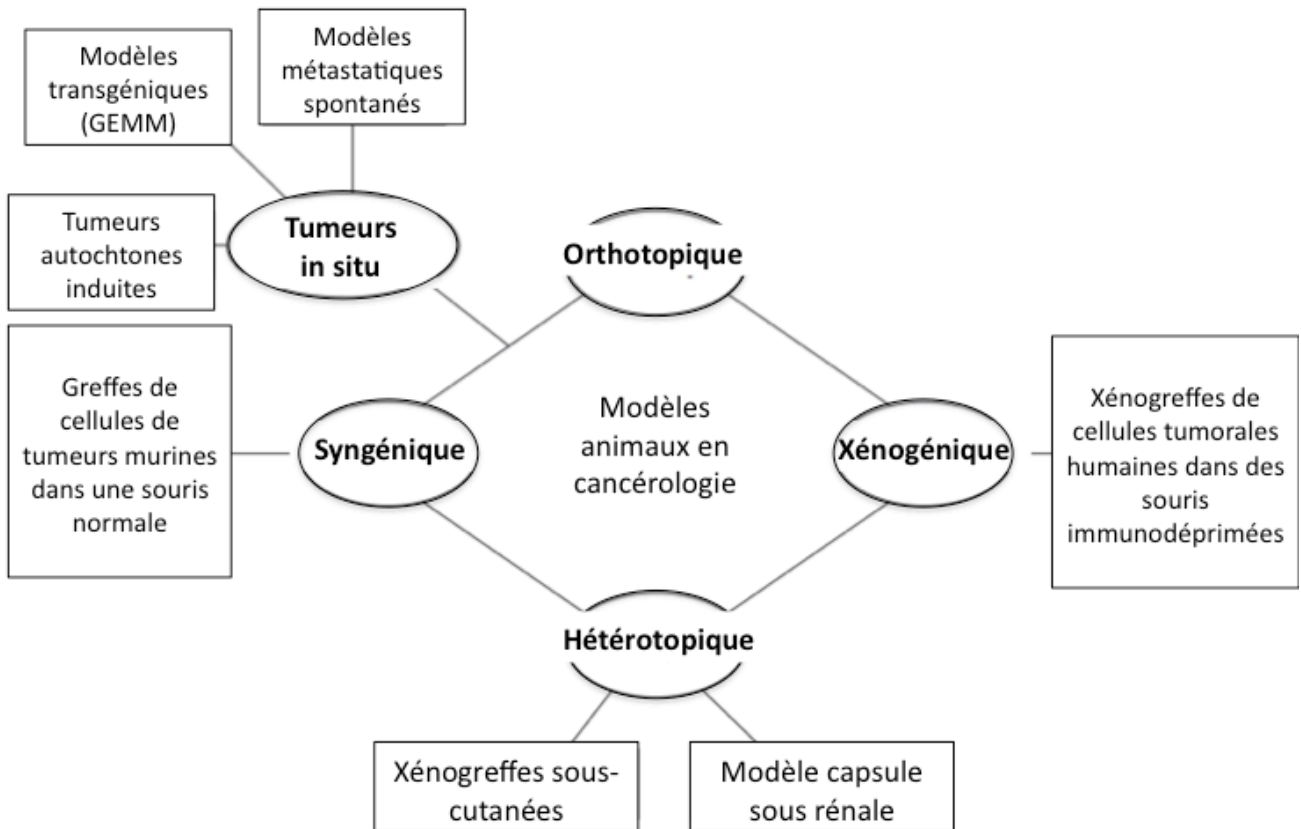


Figure 11 : Larges possibilités pour établir un modèle animal : tumeurs syngéniques vs xénogreffes, modèles orthotopiques vs ectopiques (sous-cutané ou sous la capsule rénale). D'après (Kreger et al., 2007)



## A. Généralités au sujet des modèles murins

Le développement tumoral recouvre un ensemble complexe d'évènements intriqués les uns aux autres : apparition de la tumeur, prolifération locale, envahissement des organes adjacents, cellules en transit, cellules dormantes, capacités de métastases dans les organes à distance.

Le processus métastatique est lui-même un enchaînement d'étapes qui conduit les cellules cancéreuses, sous l'influence de leur environnement et du système immunitaire, à transcender leur comportement programmé pour essaimer dans d'autres organes. Cela sous-tend non seulement des altérations génétiques ou des changements métaboliques de la cellule cancéreuse elle-même, mais aussi des interactions constantes avec le tissu environnant : le microenvironnement. Il est maintenant bien établi qu'il s'agit d'un processus complexe, dynamique dont les multiples niveaux sont intriqués formant une véritable cascade (Pantel, Brakenhoff, 2004). La reproduction totale de ces interactions cellulaires complexes n'est pas encore possible dans les systèmes in vitro.

Les métastases ne se développent pas dans les mêmes organes selon la tumeur primitive dont elles proviennent. Ainsi les mélanomes métastasent préférentiellement au niveau ganglionnaire, pulmonaire, hépatique et cérébral (Huang et al., 2008 ; Xie et al., 2006). Enfin l'évaluation des nouvelles stratégies thérapeutiques et la compréhension de leurs mécanismes de résistance reposent encore bien souvent sur un modèle animal.

En cancérologie le modèle murin est de loin le plus utilisé. Le choix des chercheurs s'est porté sur cette espèce animale pour de multiples raisons. Il s'agit d'une espèce dite nuisible pour laquelle l'expérimentation animale est socialement et éthiquement acceptée. L'élevage est simple et ne demande pas beaucoup de place ; le coût est donc adapté. Enfin le rapide renouvellement des générations peut donner accès à une grande diversité génétique par croisements et sélections. Un siècle de développement permet aujourd'hui de disposer d'un très large choix de souches génétiquement différentes. Des règles éthiques communément acceptées encadrent l'expérimentation animale depuis 1959 (Russell et al., 1959).

On peut distinguer d'emblée les modèles permettant d'obtenir des tumeurs in situ et ceux dont la tumeur est transplantée.

## **B. Les tumeurs in situ**

### ***a. Les tumeurs induites***

Les tumeurs in situ sont également appelées autochtones. Des tumeurs murines se développent dans l'organe cible sous la pression de facteurs étiologiques variés semblables à ceux rencontrés dans l'espèce humaine. Les pionniers ont mis au point des tumeurs leucémiques puis des tumeurs solides. Les investigateurs principaux de cette première étape étaient Fidler (Fidler, 1973 ; 1975), Morris (Morris, Slaughter, 1977 ; Morris, 1965), Skipper (Skipper, Schmidt, 1962), Schabel (Schabel et al., 1980), Griswold (Griswold, Corbett, 1975) et Corbett (Corbett et al., 1975). Les tumeurs sont induites par différents agents, le plus communément par des carcinogènes chimiques, des irradiations, des virus ou des bactéries. Ces modèles ont été les premiers à avoir été développés dans les années 1960-1970. Les études de ce type sont souvent limitées par le faible taux d'incidence tumorale ainsi qu'une grande variabilité dans le délai et la vitesse de croissance tumorale. En outre l'induction de tumeurs dans un modèle in situ requiert souvent la manipulation et l'administration de carcinogènes humains connus (Gillick et al., 2008 ; Stewart, Hare, 1949). On peut citer le dimethyl-hydrazine pour le cancer gastrique (Watanabe et al., 1999) ou le diethylnitrosamine pour l'hépatocarcinome (Ha et al., 2001). Certaines tumeurs sont obtenues après un geste chirurgical comme le modèle de cancer de l'œsophage après anastomose oesophago-gastroduodénale chez le rat (X Chen et al., 1999).

Les modèles de tumeurs induites de mélanome sont obtenus soit par application d'un carcinogène chimique, soit par exposition de l'animal à une radiation d'Ultra-Violets. Les carcinogènes utilisés le plus couramment sont le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA), le triméthylanthracène et les dérivés nitrosurés (Fairchild, Carson, 2011). Il s'en suit une hyperpigmentation temporaire puis le développement d'une tumeur dermique qui a rarement un potentiel métastatique. Il

est possible d'ajouter l'application de promoteurs de tumeurs comme l'huile de croton ou le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) (Fairchild, Carson, 2011).

### ***b. Les GEMM***

Les modèles de tumeurs induites miment les facteurs exogènes, environnementaux à l'origine de l'apparition et du développement tumoral. Toutefois on connaît l'importance du terrain génétique et biologique de l'hôte dans la carcinogénèse (Lifsted et al., 1998 ; Winter, Hunter, 2008). La sophistication génétique, par ses avancées majeures, a permis la mise au point de nouveaux modèles génétiquement modifiés appelés GEMM (Genetically Engineered Mouse Model). L'induction de l'expression d'oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur *in vivo* sont maintenant précisément contrôlés (Sharpless, Depinho, 2006). Beaucoup de potentialités de ce type de modèles sont encore à explorer. Les plus récents exprimant plusieurs anomalies génétiques ont permis d'augmenter la tumorigénicité et le pouvoir métastatique. Les modèles transgéniques les plus répandus sont les cancers mammaires induits par l'oncogène viral *polyoma virus middle T* (Guy et al., 1992) ou par l'oncogène humain ou murin *Her2/neu* (Chan et al., 1999). Les embryons unicellulaires de souris sont transfectés par un ADN construit préalablement. Ils sont ensuite transférés *in utero* chez une souris pseudogestante. Les souriceaux transgéniques seront testés génétiquement dès la naissance. Très utilisés également sont les adénomes et les cancers du colon induits par l'inactivation du gène suppresseur APC (Adenomatous Polyposis Coli) (Taketo, 2006).

Dans le mélanome, beaucoup de Genetically Engineered Mouse Models (GEMM) ont été développés pour préciser le rôle des nombreux gènes intervenant dans la mélanomagénèse et dans le processus métastatique. Historiquement c'est en 1993 que l'équipe de Mintz à Philadelphie parvient pour la première fois à transformer des mélanocytes en cellules de mélanome chez la souris sous l'influence d'une modification génétique : l'antigène SV40 est placé sous la dépendance d'un promoteur tyrosinase qui s'exprime dans les cellules pigmentées. Les souris porteuses de ce transgène à des taux importants développent rapidement des mélanomes uvéaux (Mintz, Silvers,

1993). En 1997, Chin et al. génèrent une souris transgénique exprimant l'oncogène activé Hras<sup>G12V</sup> sous la dépendance d'un promoteur tyrosinase (Chin et al., 1997). Ce modèle porte également une délétion sur les gènes suppresseur de tumeur INK4a et ARF. Cette souris développe spontanément et rapidement des mélanomes cutanés ce qui indique que l'activation de Ras et la perte concomitante de INK4a et ARF induisent la mélanomagenèse. Ce GEMM apporte la première preuve in vivo du rôle de INK4a et ARF dans le processus de mélanomagenèse.

Parmi les gènes d'intérêt également étudiés, on retrouve CDKN2A (Serrano et al., 1996), c-MET, c-KIT, MITF, les oncogènes de la famille RAS, le gène suppresseur de tumeur PTEN.

Un modèle intéressant la mutation BRAF a été mis au point par Dankort et al. et publié en 2009 (Dankort et al., 2009). La technique utilisée consiste à activer spécifiquement des oncogènes des mélanocytes par l'induction au tamoxifène. Les souris portant la mutation BRAF ont développé de nombreux naevi qui ont pour certains évolué en mélanomes après une période de latence de 15 à 20 mois. Si on rajoute à ce modèle une mutation du gène suppresseur de tumeur PTEN, les souris développent toutes un mélanome très rapidement et l'on observe alors fréquemment des métastases ganglionnaires et pulmonaires. Ce modèle souligne le caractère prédisposant de la mutation BRAF.

D'autre part l'introduction de gènes de fluorescence ou de bioluminescence spécifiquement exprimés par les mélanocytes permet d'identifier par imagerie in vivo les premiers stades de la mélanomagenèse. C'est le cas dans le modèle d'irradiation UV néonatale de Noonan et al. (Noonan et al., 2001).

Par ailleurs Combest et al. soulignent l'importance des GEMM pour l'étude de la pharmacocinétique (Combest et al., 2012). Dans leur étude, ils comparent quatre modèles murins différents : un modèle GEM, 2 transplants de tumeurs syngéniques et une xéno greffe de cellules humaines issues de culture. La distribution de la carboplatine est évaluée dans le plasma et au sein de la tumeur. Les modèles de transplants syngéniques et celui de xéno greffe de cellules humaines ne parvenaient pas à prédire correctement les paramètres pharmacocinétiques retrouvées dans la tumeur humaine, alors que la distribution de la carboplatine était similaire dans la tumeur du patient et dans le modèle GEM.

## **C. Les tumeurs transplantées**

### ***a. Transplantation de tumeurs syngéniques***

Les tumeurs peuvent être syngéniques à l'organisme qui les reçoit. Les phénomènes de rejet d'un hôte étranger n'interfèrent pas dans ce type de modèles. Ils sont donc adaptés à l'étude des interactions entre tumeur et système immunitaire.

Deux voies ont été empruntées pour les modèles syngéniques :

- La tumeur peut être induite in situ et apparaître dans l'organe où elle se développe habituellement chez l'Homme.
- La tumeur d'origine murine peut également être amplifiée par greffe à une cohorte de souris. Des fragments de tumeurs solides sont greffés dans l'espace sous-cutané pour amplifier les cohortes et observer facilement les réponses aux traitements par mesures directes au pied à coulisse (Corbett et al., 1984).

De nouvelles approches thérapeutiques ont été testées par stratégie de screening dans ces modèles syngéniques. Les avantages de ces modèles sont leur faible coût et leur bonne reproductibilité. L'imagerie n'est pas nécessaire à la surveillance de l'évolution tumorale. Toutefois certaines équipes les ont utilisés pour développer et tester de nouvelles technologies d'imagerie.

### ***b. Xénotransplantations***

Après de nombreuses années d'utilisation, les limites des modèles syngéniques in situ ou transplantés ont pris de plus en plus d'importance. En effet le fond génétique des cancers murins a semblé trop éloigné des tumeurs humaines pour aller plus avant dans la compréhension et la mise au point de nouveaux traitements. Pouvoir travailler directement sur du matériel tumoral humain est apparu indispensable.

La xénotransplantation est la transplantation de tissus d'une espèce à une autre. L'arrivée de la xénotransplantation a été une révolution dans le domaine des modèles animaux en cancérologie.

La première greffe de tissu tumoral humain dans une souris athymique nude est rapportée par Rygaard et al. en 1969 (Rygaard, Povlsen, 1969). Parmi les premiers

modèles, on a cherché à tirer partie du statut immunologique particulier de la capsule rénale. En effet les tumeurs humaines placées sous la capsule rénale ne sont pas rejetées (Aamdal et al., 1984 ; Bogden, 1985). Bogden place des fragments de tumeurs du sein, du colon et du poumon dans cet espace bien particulier. La taille du greffon est d'environ 1 mm. La xénogreffe est placée sous la capsule rénale de souris immunocompétentes de souche BDF1 (C57BL/6 X DBA/2). Le protocole est codifié : le 6-days SRCA (SubRenal Capsule Assay) (Aamdal et al., 1985). Il se déroule sur 6 jours. Les traitements sont débutés le lendemain de la greffe et le sacrifice des animaux intervient au 6<sup>e</sup> jour. Les variations de taille de tumeurs sont déterminées par lecture des pièces anatomiques au microscope optique. Par ailleurs une dose d'immunosupresseurs (150 mg/kg de cyclophosphamide, Endoxan®) est administrée 24h avant le début du protocole.

Toutefois les manipulations sont difficiles à la fois au moment de la mise en place de la greffe, mais également pour le suivi de la prolifération tumorale et de l'efficacité des traitements. Les mesures sont invasives et nécessitent le sacrifice de nombreux animaux pour l'obtention de courbes de croissance fiables. L'espace sous-rénal est très restreint et limite l'expansion tumorale et le temps des protocoles.

### ***c. L'Hôte : un animal immunodéficient***

L'identification et la caractérisation des souris et rats immunodéprimés ont été des découvertes capitales pour la mise au point de nouveaux modèles. Ces animaux ont des déficits immunitaires génétiques qui minimisent ou empêchent le rejet de tumeurs humaines greffées (Flanagan, 1966 ; Bosma et al., 1983 ; Roder, Duwe, 1979 ; Saxena et al., 1982).

La plus grande difficulté dans l'utilisation quotidienne de ces modèles est leur extrême sensibilité aux infections virales, bactériennes ou fongiques. Ces infections parfois asymptomatiques peuvent interférer dans la reproductibilité des observations et des résultats (Kyriazis et al., 1979). Il s'agit des risques d'interférence bien établis pour de nombreux pathogènes mais parfois très difficiles à mettre en évidence. Kyriazis et al. ont mis en évidence le rôle délétère de l'infection asymptomatique au

MHV (mouse hépatitis virus) pour la prise de greffe tumorale. Deux groupes de souris nude ont été comparés, l'un ayant un statut SOPF (Specific and Opportunist Pathogen Free) et l'autre porteur sain du virus MHV. Pour le même nombre de cellules injectées (1 million) soit en sous-cutanée, soit en intra-péritonéal, le groupe MHV positif ne développe pas de tumeur alors que le groupe SOPF voit apparaître chez chaque sujet de nombreuses tumeurs. Si le nombre de cellules greffées est doublé, quelques sujets seulement développent une tumeur dans le groupe MHV positif.

Il est donc impératif de maintenir ces animaux dans des environnements dépourvus de pathogènes (Specific and Opportunist Pathogen-free SOPF). Ces conditions expérimentales complexifient les manipulations et en augmentent significativement le coût.

Chaque souche de souris immunodéprimées a dans son génome une ou plusieurs mutations qui diminuent ses capacités à rejeter une allogreffe ou une xénogreffe. Aucun de ces déficits n'élimine complètement le système immunitaire. Les souches les plus répandues sont les *nude*, les *scid* et les *beige*. Il existe bien sûr des associations de ces déficits obtenues par croisement des différentes souches mutées.

Le *gène Foxn1<sup>nu</sup>* est appelé couramment le gène nude (Flanagan, 1966). Il confère à l'animal qui le porte de manière homozygote non seulement une absence de poil mais également l'absence de thymus. Athymique, cet animal ne peut pas produire de lymphocytes T. Les souches homozygotes pour cette mutation sont appelées nude. Les souris nude sont les premières souris immunodéprimées à avoir été utilisées. Elles restent au premier plan des souches employées aujourd'hui et de nombreux types sont disponibles : CD-1 nude, NU/NU, BALB/c nude, NMRI-nude. Une souche de rat nude a également été mise au point depuis 1979 au NIH Animal Genetic Resources. Chez les sujets homozygotes le pelage est présent même si la quantité de poils est variable.



Figure 12 : Souris NMRI-nude (à gauche) – Rat nude (à droite)

Le **gène *Prkdc<sup>SCID</sup>*** code pour la protéine DNA-PK p350. Cette protéine se fixe sur les brins d'ADN cassés après la liaison du complexe protéique Ku lors du processus de réarrangement VDJ. La souris homozygote pour le gène *Prkdc<sup>SCID</sup>* muté est déficiente dans le processus de recombinaison utilisé à la fois pour la réparation de l'ADN double brin et les réarrangements VDJ. Son phénotype se caractérise par une absence d'immunité B et T. Cette mutation a été détectée pour la première fois en 1980 par Bosma chez des souris BALB/*c-lgh<sup>b</sup>* ou CB17. Les différentes souches homozygotes pour cette mutation sont appelées SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency). Cette mutation, située dans la région centromérique du chromosome 16, a été transmise à plusieurs fonds génétiques : CB17, NOD par exemple. Il est à noter que la mutation *Prkdc<sup>SCID</sup>* sur un fond NOD (Non Obese Diabetic) reverse la susceptibilité au diabète.

La mutation du **gène *Lyst<sup>bg</sup>*** affecte le bon fonctionnement lysosomal. A l'état homozygote, le phénotype est une faible activité endogène des NK accompagnée d'anomalies fonctionnelles des granulocytes. C'est un homologue du syndrome humain de Chediak-Higashi (OMIM :214500). Les souris portant 2 allèles mutés de ce gène sont appelées beige.

Les mutations des **gènes *RAG1* et *RAG2*** sont responsables d'une impossibilité d'initiation des réarrangements VDJ. Chez l'Homme ces mutations sont observées dans un déficit immunitaire primaire appelé syndrome de Omenn (OMIM :603554).



Les souris porteuses de la mutation liée à l’X du **gène Bruton agammaglobulinemia Tyrosine Kinase (Btk)** sont le modèle de l’immunodéficience liée à l’X. Le nombre de lymphocytes B est diminué, leur maturation est anormale.

Le **gène B2m** (beta-2 microglobuline) est indispensable à l’expression des protéines du complexe majeur d’histocompatibilité classe I et à la maturation des lymphocytes T CD8+ ainsi qu’au développement des Natural Killer (NK).

Le **gène Il2rg** permet la liaison en haute affinité de nombreuses interleukines. Son déficit bloque le développement des Natural Killer (NK). Enfin il jouerait un rôle clé dans la susceptibilité au lymphome thymique. Ainsi la souris NOD-SCID porteuse de cette mutation Il2rg ne développe pas de lymphome thymique qui est une caractéristique de la souris NOD-SCID habituellement.

Souche	Gène	L T	L B	NK	Macrophage	Ig sériques	Consanguinité
Nu/Nu	Foxn1 <sup>nu</sup>	0	+	+	+	IgG : bas IgM : normal IgA : bas	Non consanguin
BALB/c Nude	Foxn1 <sup>nu</sup>	0	+	+	+	IgG : bas IgM : normal IgA : bas	Consanguin
CB17 SCID	Prkdc <sup>SCID</sup>	0	0	+	+	IgG : bas IgM : bas IgA : bas	Consanguin
NOD SCID	Prkdc <sup>SCID</sup> /Nod	0	0	déficient	déficient	IgG : bas IgM : bas IgA : bas	Consanguin
SCID Beige	Prkdc <sup>SCID</sup> /Lyst <sup>bg</sup>	0	0	déficient	déficient	IgG : bas IgM : bas IgA : bas	Consanguin
NIH III Nude	Foxn1 <sup>nu</sup> / Lyst <sup>bg</sup> /Btk <sup>XID</sup>	0	0	déficient	déficient	IgG : bas IgM : bas IgA : bas	Non consanguin

Tableau 7 : Caractéristiques des souches de souris immunodéprimées les plus fréquentes. Le déficit immunitaire est primitif, il est lié à la mutation d’un gène identifié. Selon les différentes mutations, les phénotypes présentent des degrés d’immunosuppression variables

#### ***d. Hétérotopique vs Orthotopique***

Les tumeurs transplantées, qu'elles soient syngéniques ou bien xénogéniques humaines, ont tout d'abord été greffées en sous-cutané. Ce site anatomique est bien sûr la plupart du temps très différent de l'organe dans lequel se développe normalement la tumeur greffée. Le modèle est hétérotopique. Il possède plusieurs avantages (Kreger et al., 2007). Tout d'abord la mise en place chirurgicale des greffons dans une poche sous-cutanée est aisée. Ce transfert nécessite toutefois une anesthésie de l'animal et des précautions importantes d'asepsie. De plus ce choix de site rend la surveillance facile. Le volume tumoral peut être estimé régulièrement plusieurs fois par semaine pour évaluer cliniquement la prolifération tumorale. Une formule mathématique communément utilisée permet de calculer ce volume à partir de la mesure des axes de la tumeur au pied à coulisse (Workman et al., 2010) :  $V = \frac{1}{2} \times L \times l^2$  où L est le grand axe de la tumeur et l le petit axe.

En sous-cutané, la tumeur est facilement accessible à un prélèvement chirurgical. Par contre dans ce type de modèle, les cellules humaines sont placées dans un environnement murin créant des interactions avec le microenvironnement (les cytokines ou le système immunitaire par exemple) non superposables au processus pathologique à évaluer. D'autre part ce site sous-cutané peut conduire plus facilement à une ulcération en regard, mettant parfois en péril la tumeur et/ou l'animal lui-même. Le processus métastatique est également perturbé, souvent perdu. En outre les tumeurs peuvent se différencier et ne plus correspondre tout à fait à la tumeur initialement greffée.

Une alternative au modèle hétérotopique sous-cutané a été développée : la greffe de cellules au sein de fibres creuses (Decker et al., 2004). Ces fibres sont colonisées par des lignées cellulaires tumorales humaines puis implantées dans l'animal dans la cavité intrapéritonéale ou en sous-cutané. Après que l'animal ait reçu le traitement anti-tumoral à tester, les fibres sont retirées et les cellules tumorales caractérisées. Les avantages de cette méthode sont que de multiples lignées cellulaires peuvent être screenées dans un même environnement pour un même traitement. Les limites sont l'isolement des cellules vis-à-vis du stroma normal et l'impossibilité de développer une néo-vascularisation (Kreger et al., 2007).

Ces modèles hétérotopiques sont simples à mettre en œuvre et à surveiller, mais ne permettent pas d'analyser les interactions entre la tumeur et l'environnement spécifique de l'organe impliqué. Il a donc été crucial de mettre au point des modèles orthotopiques appelés également Implantation Orthotopique Chirurgicale (Surgical Orthotopic Implantation).

Le microenvironnement joue un rôle clé et le mélanome est un modèle idéal pour illustrer ces interactions entre cellules tumorales et cellules avoisinantes par l'intermédiaire de facteurs de croissance et de cytokines inflammatoires. Les cellules de mélanome activent, recrutent et interagissent en permanence avec les cellules normales qui les entourent ce qui favorise leur survie, leur croissance, leur migration et leur capacité d'invasion. Les cellules de mélanome métastatique peuvent perdre leurs propriétés tumorigènes si on les force expérimentalement à s'attacher aux kératinocytes (Hsu et al., 2000). La plasticité des cellules de mélanome en fonction de son microenvironnement est également illustré par leur capacité à retrouver un phénotype normal dans un microenvironnement embryonnaire (Díez-Torre et al., 2009). Les mélanocytes normaux se localisent au niveau de la membrane basale qui sépare l'épiderme du derme. Ils sont régulés de manière forte par les kératinocytes environnant par contacts directs cellule-cellule médiés par l'E-cadhérine. Si cette régulation se relâche par la perte des E-cadhérine remplacées par des N-cadhérines, la transformation des mélanocytes peut s'enclencher. Durant son développement la tumeur mélanique sécrète des facteurs solubles pour recruter des fibroblastes et des cellules immunitaires qui colonisent alors le stroma péri-tumoral. Ce stroma péri-tumoral composé de fibroblastes, de cellules endothéliales et de cellules du système immunitaire participe par des voies paracrines à la dégradation de la membrane basale, à l'invasion du derme et au processus métastatique. Les relations dynamiques entre la tumeur et son microenvironnement sont médiées par des facteurs de croissance comme le bFGF, le PDGF, le VEGF, le TGF $\beta$ , et des cytokines.

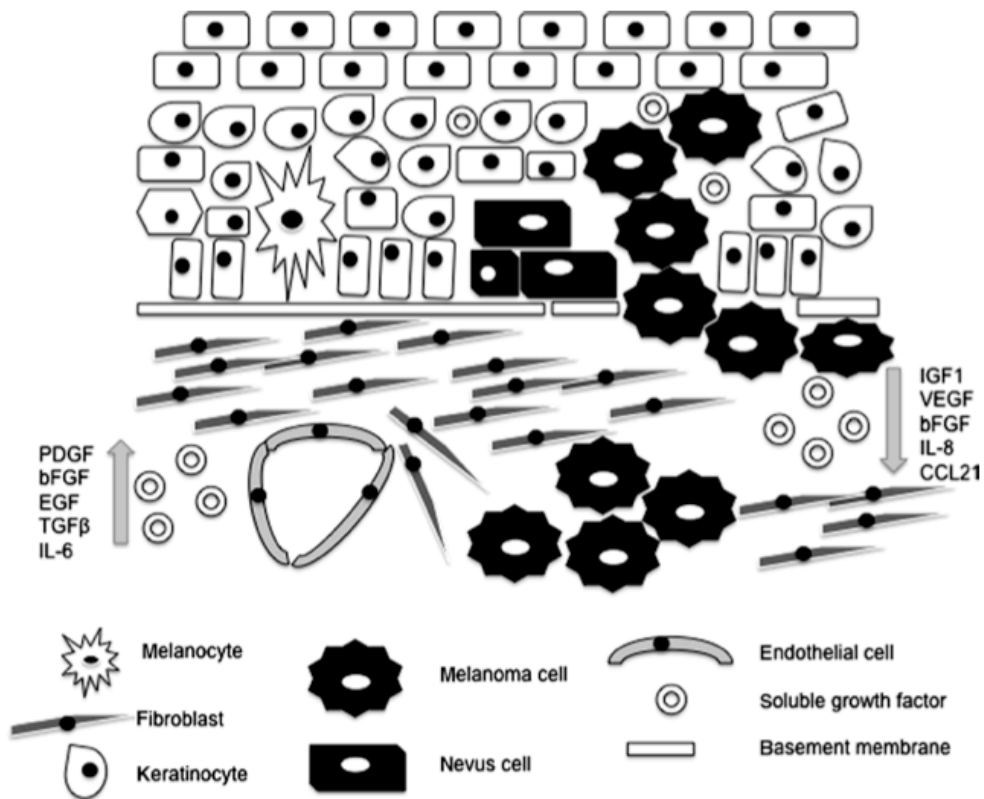


Figure 13 : Représentation schématique des inter-relations entre la tumeur mélanocytaire et son microenvironnement. Les cellules de mélanome, situées au niveau de la membrane basale ne sont plus régulées par les E-cadhérines des kératinocytes qui sont remplacées par des N-cadhérines dans le processus tumoral initial. Les cellules de mélanome recrutent des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules du système immunitaire pour former un stroma péri-tumoral qui les aide dans les processus de prolifération, d'invasion de la membrane basale et de dissémination métastatique (Bosserhoff, 2011)

S'il est possible de transférer des cellules tumorales humaines chez l'animal, des efforts de raffinements techniques doivent être faits pour apporter le microenvironnement humain en même temps que la tumeur. Les xénogreffes de tumeurs issues directement de patient (Patient-Derived Tumor Xenograft ou PDTX) contiennent le stroma péri-tumoral du patient car la tumeur est divisée en petits cubes de 3 mm de côté environ. Aucune digestion enzymatique ou centrifugation ne sont réalisées. Les cellules tumorales ne sont pas séparées de leur microenvironnement.

Dans le même but Kiowski et al. ont proposé une pré-fabrication du microenvironnement humain sur lequel les cellules de mélanome sont greffées

Ce microenvironnement est construit à l'aide d'un substitut dermique colonisé *in vitro* par des fibroblastes et des kératinocytes humains. Cette pseudo-peau humaine est greffée à la souris immunodéficiente et reçoit la greffe de mélanome humain à étudier. L'avantage de ce type d'environnement humanisé est qu'il peut accueillir des cellules mélaniques établies dont la caractérisation est connue. Grâce à des cellules porteuses du gène de la GFP (Green Fluorescent Protein), ce modèle illustre élégamment les différentes étapes de l'invasion tumorale (Kiowski et al., 2012).

Les xénogreffes hétérotopiques sous-cutanées ne donnent que très rarement lieu à une évolution métastatique quelque soit la tumeur solide xénogreffée (sein, poumon, prostate, mélanome) (Fidler, 1991). A l'inverse il est établi que les xénogreffes développent plus souvent des métastases quand elles sont greffées de manière orthotopique (Man et al., 2007). Man et al. décrivent un protocole permettant d'obtenir des tumeurs à haut potentiel métastatique. Des cellules de tumeur du sein sont tout d'abord injectées dans le coussinet graisseux mammaire d'une souris CB17/SCID. Lorsque la taille de la tumeur obtenue atteint environ 400 mm<sup>3</sup>, celle-ci est retirée chirurgicalement et la souris est maintenue en observation environ 4 semaines. Après sacrifice, les poumons sont examinés et les éventuelles métastases pulmonaires sont mises en culture. Cette seconde génération cellulaire est réinjectée dans le coussinet graisseux mammaire selon le même protocole. Après 3 passages de ce type dans l'animal, les lignées tumorales obtenues, rendues hautement métastatiques sont utilisées pour différents tests thérapeutiques *in vivo*. Un intervalle de 9 mois en moyenne sépare le prélèvement du fragment tumoral chez le patient des différents protocoles thérapeutiques.

Pour certains types de cancers hormono-dépendants comme le cancer du sein ou le cancer de la prostate, le développement de la tumeur au sein de l'organe hôte sécrétant ces hormones est primordial (Buhler et al., 2000).

	<b>Site d'implantation</b>	
	<b>Hétérotopique</b>	<b>Orthotopique</b>
<b>Hétérogénéité cellulaire</b>	Variable selon l'origine de la tumeur	Variable selon l'origine de la tumeur
<b>Microenvironnement</b>	Environnement artificiel	Importance de l'organe hôte
<b>Potentiel métastatique</b>	Métastases rares	Métastases fréquentes
<b>Temps requis</b>	Court	Long, procédures chirurgicales parfois complexes
<b>Coût</b>	Peu coûteux	Coûteux, technique
<b>Mesure de la croissance tumorale</b>	Facile, au pied-à-coulisse	Difficile

Tableau 8 : Principales caractéristiques des sites d'implantation hétérotopique et orthotopique

***e. Xénogreffes de cellules issues de culture vs xénogreffes de fragments de tumeurs de patients. Intérêt d'une pseudo-membrane basale (BD Matrigel)***

La plupart des modèles de xénogreffes sous-cutanées ou orthotopiques sont réalisés par injection à une souris immunodéficente de cellules issues de culture. En général, les cellules issues de culture ont un meilleur taux de prise que les fragments tumoraux prélevés directement au patient (Giovanella et al., 1978). Elles peuvent être inoculées en sous-cutané dans différentes régions anatomiques de l'animal (axillaire, flanc, dos, interscapulaire). Selon la lignée cellulaire, l'inoculum contient un nombre optimal de cellules, de 1 million à 10 millions de cellules. Pour augmenter les taux de prise, il est possible de consolider l'inoculum par une pseudo-membrane basale (BME :

Basement Membrane-like Matrix type BD Matrigel®) (Noël et al., 1993 ; Fridman et al., 1991 ; Benton et al., 2011). Les membranes basales physiologiques sont des matrices extra-cellulaires très fines qui séparent les tissus épithéliaux et endothéliaux du tissu stromal. La formation de ces matrices débute très tôt durant le développement embryonnaire mettant en jeu des processus tissulaires complexes et temporaires. Ces membranes ne sont pas, à l'heure actuelle, très faciles à produire en laboratoire. En revanche des pseudo-membranes basales isolées de tumeurs sont disponibles. Il s'agit de la BME Matrigel® isolée initialement à partir d'un sarcome murin. Elle se présente sous forme liquide à 4°C et sous la forme d'un gel dans les conditions physiologiques entre 24°C et 37° C (Kleinman, Martin, 2005). Elle est composée principalement de laminin-111, de collagène IV, d'héparane sulfate protéoglycane, de protéases (MMP-2, MMP-9) et de nombreux facteurs de croissance (FGF, EGF, TGF- $\beta$ , PDGF, IGF) (Benton et al., 2011).

Les traitements des tumeurs transplantées peuvent être débutés soit immédiatement après l'inoculation (non staged model) ou retardés jusqu'à ce que la tumeur se soit développée à un volume prédéfini (staged model).

A l'inverse, les xénogreffes à partir de fragments de tumeurs prélevés directement au patient ont un taux de prise plus faible et sont réputées plus difficiles à mettre en œuvre. Toutefois ces xénogreffes appelées également tumorogreffes (Patient-Derived Tumor Xenograft PDX) semblent mieux conserver les caractéristiques morphologiques et moléculaires des tumeurs sources (Rubio-Viqueira, Hidalgo, 2008 ; Fichtner et al., 2008 ; Tentler et al., 2012). Des études d'analyse génique ont démontré une grande stabilité des principaux gènes clés et des grandes voies de signalisation intracellulaire. C'est le cas par exemple d'un travail sur le cancer du poumon non à petite cellule (NSCLC). 10 des 17 PDX obtenues par cette équipe ont montré un coefficient de corrélation  $> 0.9$  avec leur tumeur primitive respective démontrant une grande similitude génétique entre la tumeur primitive et la PDX correspondante (Fichtner et al., 2008). Il en est de même dans un modèle de PDX de cancer du pancréas publié par Rubio-Viqueira (Rubio-Viqueira et al., 2006) démontrant la stabilité de la mutation KRAS et du niveau d'expression de SMAD4. Une étude menée par Daniel et al. sur un modèle de cancer du poumon à petite cellule (SCLC) a comparé les PDX et les lignées cellulaires issues des mêmes tumeurs (Daniel et al., 2009). La comparaison de l'expression génique de ces tissus a permis d'identifier

la perte d'un groupe significatif de gènes. Ce groupe de 395 gènes, spécifiques de la tumeur, est exprimé dans la tumeur primitive et la PDTX correspondante. L'expression de ces gènes est perdue dans les cellules tumorales se développant in vitro en culture cellulaire. De plus, si ces cellules issues de culture sont greffées secondairement in vivo, elles ne récupèrent pas l'expression de ce groupe de gènes d'intérêt.

Il est intéressant de noter par ailleurs que les équipes qui ont développé ce type de modèles montrent une meilleure corrélation avec les réponses cliniques au traitement (Tentler et al., 2012). C'est le cas du modèle de xénogreffes de mélanomes uvéaux dans la souris SCID traité par une chimiothérapie standard (témozolomide) dont la réponse au traitement est un bon reflet de l'évolution clinique des patients traités (Fiebig et al., 2004 ; Nemati et al., 2010). Dans cette étude, 90 fragments tumoraux différents de mélanomes uvéaux ont été greffés : 73 provenant d'une énucléation contenant une tumeur primitive et 17 de l'excision d'une métastase. Les pièces tumorales fraîches ont été greffées en sous-cutané dans la région interscapulaire des souris SCID maintenues dans un environnement SOPF et régulièrement examinées. Lorsque la tumeur obtenue a atteint un volume d'environ 1 cm<sup>3</sup>, la souris a été sacrifiée et la tumeur prélevée et greffée à nouveau dans une souris SCID saine dans la même région anatomique. Après 3 passages consécutifs dans l'animal, les xénogreffes sont considérées comme stables et utilisées pour les protocoles de caractérisations et de tests thérapeutiques. Sur les 90 tumeurs de patients prélevées, 25 ont abouti à une xénogreffe viable soit un taux de prise de 28%. Il est intéressant de noter que le taux de prise était plus important dans le sous-groupe de tumeurs issues de métastases (53%). Pour 4 tumeurs, deux chimiothérapies cytotoxiques ont été administrées : fotémustine (Muphoran®) et témozolomide (Temodal®). Trois d'entre elles ont répondu et une tumeur a continué de progresser. Ces résultats étaient similaires à l'évolution clinique observée chez les patients.



	<b>Origine de la tumeur</b>		
	<b>Lignées cellulaires</b>	<b>Fragments de tumeur</b>	<b>Transgénique</b>
<b>Hétérogénéité cellulaire</b>	Plus homogène	Différentes populations cellulaires	
<b>Microenvironnement</b>	Stroma murin	Stroma humain	Stroma murin
<b>Potentiel métastatique</b>	Variable selon le type d'implantation	Variable selon le type d'implantation	Métastases fréquentes
<b>Temps requis</b>	Court, souvent quelques semaines	Plusieurs semaines ou mois	Long, souvent plus d'un an
<b>Coût</b>	Peu coûteux	Coûteux, important temps de manipulation	Très coûteux
<b>Mesure de la croissance tumorale</b>	Variable selon le site de greffe	Variable selon le type de greffe	Plus difficile car orthotopique

Tableau 9 : Principales caractéristiques des modèles établis selon l'origine de la tumeur

#### **D. Les modèles métastatiques**

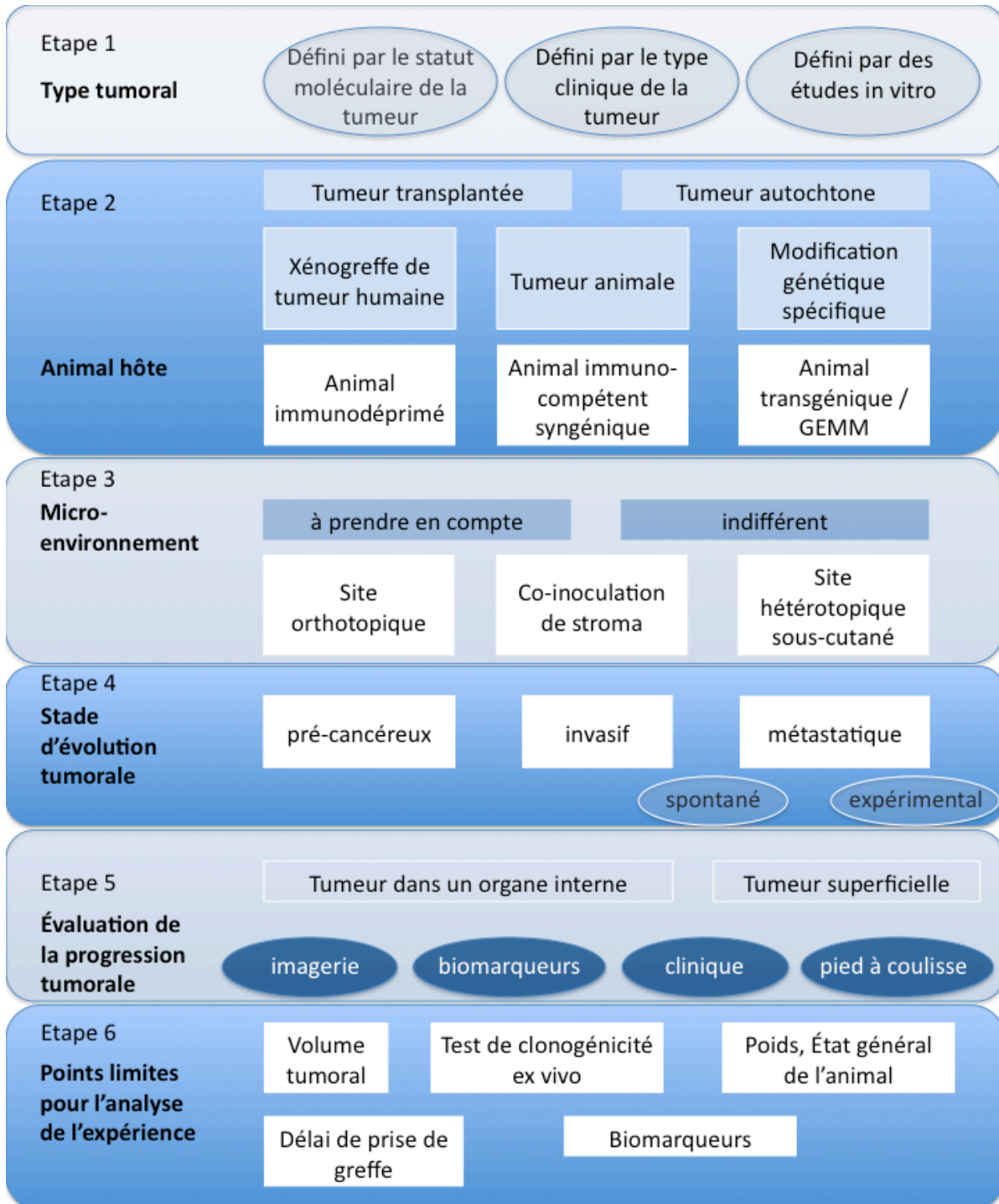
Même lorsque les cellules tumorales proviennent d'une métastase, leur propension à métastaser dans un modèle animal est rare. Welch cite pour exemple la plupart des lignées cellulaires connues de cancer du sein isolées à partir de métastases viscérales ou pleurales. Très peu d'entre elles (MDA-MB-435 ou MDA-MB-231 par exemple) métastasent au sein du modèle dans lequel elles ont été greffées (Welch, 1997). Il semble actuellement établi que les tumeurs hétérotopiques sont moins susceptibles d'avoir une évolution métastatique que les tumeurs orthotopiques (Hoffman, 1999 ; Fidler, 1991). Les modèles ont donc été améliorés dans ce sens. Man et al. montrent qu'il est possible de sélectionner des lignées à haut pouvoir métastatique en choisissant un site orthotopique (le coussinet adipeux mammaire)

pour établir des xénogreffes de cancer du sein (Man et al., 2007). L'approche orthotopique est parfois plus difficile techniquement car la greffe peut nécessiter un geste chirurgical invasif. De plus ce type de protocole est très long à mettre en place. Pour Némati et al., 9 mois sont nécessaires pour établir une tumeur stable in vivo après xénogreffes dans 3 générations de souris consécutives.

Une méthode plus rapide et plus directe a été explorée. Il s'agit de créer une métastase expérimentale en mimant les phases tardives du processus métastatique que sont la dissémination, l'extravasation et la colonisation. Le modèle le plus répandu est l'injection de cellules tumorales dans la circulation sanguine par la veine caudale de l'animal. Dans ce cas les métastases sont principalement localisées au poumon par un phénomène mécanique de piègeage des cellules dans le lit capillaire pulmonaire. Curieusement les métastases dans ce type de modèles ne sont pas toujours reproductibles et le taux d'échec est important (70% dans notre expérience) (Welch, 1997).

D'autres méthodes ont été proposées pour obtenir des modèles métastatiques. Des cellules tumorales peuvent être injectées dans la circulation portale pour favoriser les métastases hépatiques ou dans le ventricule gauche pour cibler l'os. L'injection intra-splénique est plus simple que le cathétérisme de la veine porte ou de la veine mésentérique pour envoyer les cellules coloniser le foie (Kuo et al., 1993). L'injection intra-carotidienne peut favoriser l'émergence de métastases cérébrales (Schackert, Fidler, 1988). Certains miment une dissémination métastatique par injection directe par voie transcutanée dans le parenchyme hépatique (L Chen et al., 1998) ou pulmonaire, dans la cavité pleurale ou péritonéale, dans le cerveau (Randazzo et al., 1995) ou la moelle osseuse. La morbidité est importante et la reproductibilité difficile (Liu, Hicklin, 2011).

## E. Proposition d'un arbre décisionnel pour le choix d'un modèle



## **V. Spécificités des modèles animaux de mélanome**

Les modèles murins sont de loin les plus nombreux des modèles animaux de mélanome. Il en existe une grande diversité bâtie sur les mêmes principes que pour les autres modèles tumoraux. On trouve des modèles de tumeurs induites ou spontanées, des modèles de tumeurs syngéniques ou humaines, des modèles hétérotopiques ou orthotopiques, des souches d'animaux transgéniques, des souches immunodéficientes.

### **A. Modèles murins de mélanomes induits**

En ce qui concerne les modèles de mélanome induit, deux moyens sont employés pour provoquer l'émergence tumorale : l'application d'un carcinogène chimique ou l'exposition de l'animal à une radiation d'Ultra-Violet. Les carcinogènes utilisés le plus couramment sont le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA), le triméthylanthracène et les dérivés nitrosurés (Fairchild, Carson, 2011). Il s'en suit une hyperpigmentation temporaire puis le développement d'une tumeur dermique qui a rarement un potentiel métastatique. Il est possible d'ajouter l'application de promoteurs de tumeurs comme l'huile de croton ou le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) (Fairchild, Carson, 2011). On peut ainsi obtenir un grand nombre de mélanomes murins en fonction de la souche de rongeurs exposée. Par exemple les mélanomes JB/MS et JB/RH ont été induits dans des souris C57BL/6 par une seule application de DMBA dans la région interscapulaire de souris âgées de 4 jours, suivie d'une application deux fois par semaine d'huile de croton pendant respectivement 16 et 23 semaines (Berkelhammer et al., 1982). Le mélanome murin K1735 a été induit dans des souris C3H/HeN par exposition aux radiations UV (10 fois une heure d'exposition sur une période de 2 semaines) suivie d'une application d'huile de croton pendant 92 jours (Fairchild, Carson, 2011).

Parmi les autres rongeurs, les hamsters et les gerbilles ont une bonne sensibilité tant à l'exposition aux UV qu'aux carcinogènes chimiques. En revanche les rats et les cochons d'Inde, à l'instar des souris, sont assez résistants à l'application de carcinogènes chimiques (Fairchild, Carson, 2011). Ceci pourrait s'expliquer par une

particularité histologique de la localisation des mélanocytes chez les rongeurs. En effet contrairement aux mélanocytes chez l'Homme qui se répartissent dans tout l'épiderme, les mélanocytes murins sont focalisés aux follicules pileux (Noonan et al., 2003).

## **B. Modèles murins de mélanomes spontanés**

Le développement spontané d'un mélanome chez la souris est très peu fréquent. Il existe 3 mélanomes murins spontanés facilement disponibles en culture cellulaire : le Harding-Passey (Harding, Passey, 1930), le S91 ou Cloudman (Cloudman, 1941) et le B16. Le mélanome B16 est apparu spontanément sur une souris C57BL/6 en 1954 et plusieurs sous-clones sont disponibles encore actuellement : les plus répandus sont le B16F1 dont le potentiel métastatique est faible et le B16F10 au fort potentiel métastatique. Ces deux sous-clones ont été obtenus par Fidler dans les années 1970 (Fidler, Kripke, 1977). Ces mélanomes murins sont greffables sur des souris syngéniques et un grand nombre de modèles a été mis au point. De nombreux sites d'injection ont été employés : la région du flanc ou la région interscapulaire en sous-cutané, le coussinet adipeux du membre postérieur (Markovic, Murasko, 1991), la cavité intrapéritonéale (Fleischmann et al., 1994), la face dorsale du pavillon de l'oreille (Shiohara et al., 1987), le foie (M Watanabe, 1997).

## **C. Modèles métastatiques de mélanomes**

Les modèles dont le but est de mimer au plus près la cascade métastatique s'emploient à raffiner le caractère orthotopique de la greffe tumorale. En effet pour le cas d'un mélanome primitif la localisation orthotopique de la greffe est strictement intradermique. Certaines équipes ont comparé le potentiel métastatique des mélanomes greffés en intradermique de celui des mélanomes greffés en sous-cutané. Ils montrent que la tumeur primitive doit être placée en situation intradermique ou subdermique pour garantir le meilleur potentiel métastatique (Kerbel et al., 1991 ;

Gattoni-Celli et al., 1993). En revanche certains auteurs travaillent d'emblée sur des métastases sous-cutanées de mélanome. L'emplacement orthotopique est alors dans le tissu sous-cutané. On peut raffiner encore le modèle en réalisant une greffe de peau totale d'origine humaine sur une souris immunodéprimée quelques jours avant la xénogreffe de mélanome au sein de cette peau humaine comme l'a proposé Juhasz et al. (Juhasz et al., 1993). La peau, ou un équivalent obtenu par tissue engineering ,préalablement greffée a pour rôle de mimer le microenvironnement humain pour la xénogreffe de mélanome (Kiowski et al., 2012).

## **D. Modèles de mélanome développés sur d'autres espèces que les rongeurs**

D'autres espèces animales peuvent être utilisées pour construire des modèles animaux de mélanome à des fins de caractérisation, de recherche de nouvelles molécules thérapeutiques et d'essais pré-cliniques.

### ***a. Les poissons***

Même si les mammifères sont des modèles choisis pour leur proximité physiologique avec l'Homme, d'autres espèces comme les poissons sont utilisées à des fins de recherche en cancérologie. Les poissons ont pour avantages leur grande fécondité et leur cycle d'élevage souvent très court ce qui permet d'obtenir rapidement une importante descendance. Seulement 3 mois sont nécessaires pour passer d'une cellule œuf à un individu adulte. C'est un modèle qui par ailleurs est peu coûteux. L'exposition aux carcinogènes est facile. Plus intéressant encore, les poissons représentent un mi-chemin sur l'échelle de l'évolution entre les mammifères et les modèles eucaryotes primitifs tels que la Drosophile ou le ver *Caenorhabditis elegans*. Les différents génomes des poissons offrent une grande variabilité en tailles et en complexités et les outils génétiques comme les cartographies génétiques détaillées ou les séquences de gènes sont maintenant disponibles.

## Le Xiphophorus

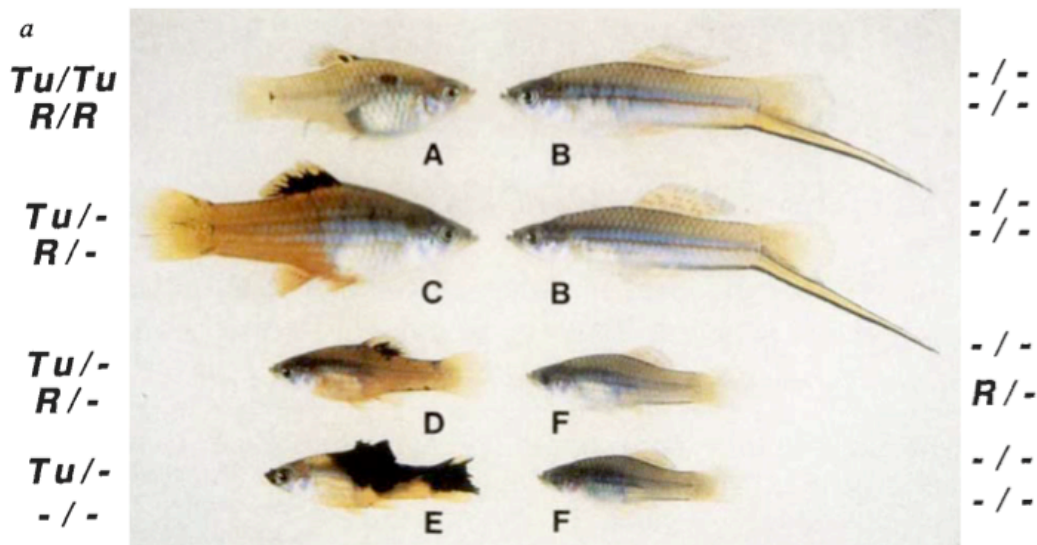


Figure 13 : Le mélanome développé sur le poisson Xiphophorus est lié à la mutation activatrice d'un oncogène dominant Tu (Wittbrodt et al., 1989)

Les Xiphophorus sont des poissons d'eau douce d'Amérique Centrale qui ne développent pas de mélanome à l'état sauvage. Toutefois des croisements entre les différentes espèces de Xiphophorus ont permis d'obtenir des souches hybrides dans lesquelles des mélanomes peuvent apparaître spontanément au sein d'une structure cutanée appelée macromélanophore. Le modèle Xiphophorus est probablement le plus ancien des modèles animaux de mélanome. Il a été étudié depuis plus de 80 ans (Gordon, 1927) et donne accès actuellement à une collection de très nombreux modèles génétiques utiles à la compréhension des mécanismes spontanés ou induits de la mélanomagenèse (Nairn et al., 2001).

Le développement de mélanomes chez le Xiphophorus est favorisé par l'exposition aux Ultra-Violets, aux Rayons X ou à d'autres carcinogènes (Anders et al., 1984). Ce modèle donne un accès facilité au génome. C'est un bon outil pour caractériser les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur en cause dans l'apparition du mélanome. Wittbrodt et al. ont mis en évidence et caractérisé un important oncogène (Xmrk) (Wittbrodt et

al., 1989). La surexpression de ce gène est nécessaire et suffisante pour entraîner la transformation néoplasique des mélanocytes dans *Xiphophorus* (Mäueler et al., 1993). La protéine codée par cet oncogène *Xmrk* est un récepteur à tyrosine kinase très proche du récepteur EGF-R humain (Wittbrodt et al., 1989). Cette kinase est constitutivement auto-phosphorylée et induit une transduction du signal par les différentes voies Ras-Raf-ERK ou STAT5 également impliquées dans la mélanomagénèse chez l'Homme. Les *Xiphophorus* sont faciles à élever, peu coûteux et à renouvellement de générations rapide. Leur génome est très bien caractérisé. Ils sont un modèle de choix pour l'étude génétique de la mélanomagénèse. En revanche la nature rapidement agressive des tumeurs, la relative faiblesse de ces poissons et leur éloignement phylogénétique de l'Homme ne permettent pas d'en faire un modèle préclinique (Fairchild, Carson, 2011).

### ***Le Zébrafish***

Les premiers travaux sur les *Danio rerio* ou Zébrafish ont été initiés par Streisinger dans les années 1960. Comme le *Xiphophorus*, ils sont peu coûteux et leur cycle d'élevage est très rapide. Mais contrairement au *Xiphophorus*, le Zébrafish fertilise ses œufs à l'extérieur de l'organisme et ainsi des centaines de cellules œufs peuvent être collectées chaque semaine pour un couple de Zébrafish. Les embryons sont transparents et les moments clés de l'embryogénèse peuvent être observés au microscope optique. Avec celui de l'Homme et de la souris, le génome du zébrafish est le seul génome de vertébrés à être séquencé en totalité ([http://www.ensembl.org/Danio\\_rerio/Info/Index](http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index)). Bien que le *Xiphophorus* permette d'identifier clairement les gènes impliqués dans le développement des mélanomes, il est difficile de réaliser des manipulations génétiques dans ce modèle. Ces manipulations transgéniques sont par contre réalisables chez le Zébrafish ou le Medaka. Les connaissances génétiques fondées sur le modèle de *Xiphophorus* sont directement transposées pour les constructions transgéniques sur le modèle de Zébrafish



L'équipe de Patton a créé en 2005 un Zébrafish transgénique porteur de la mutation BRAF V600E dans le but d'étudier plus précisément les interactions gène à gène et les interactions entre gène et environnement (Patton, Zon, 2005). Une version mutée de BRAF a été introduite dans le génome du Zébrafish sous la dépendance transcriptionnelle du promoteur *Mitf* du poisson.

Chez le Zébrafish, il a été montré que la mutation BRAF seule n'entraînait pas l'apparition de mélanome mais conduisait au développement de très nombreuses lésions naeviques bénignes.

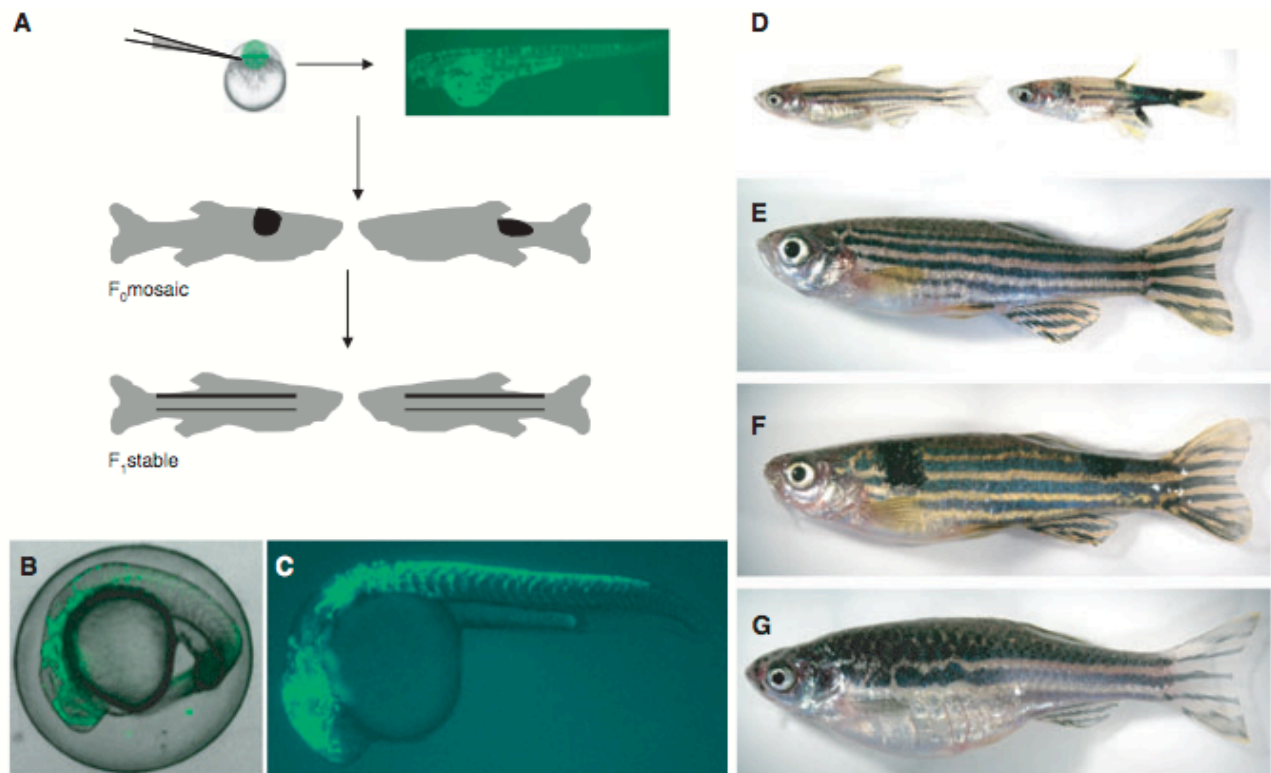


Figure 14 : Modèle transgénique chez le Zébrafish : (A) injection du transgène oncogénique BRAF V600E dans la cellule œuf de Zébrafish au pôle animal permet la création d'un poisson mosaïque F0 qui exprime le transgène dans quelques mélanocytes (poisson-naevus portant des points noirs (F)). Le promoteur du transgène est le gène *Mitfa*. Si ce transgène est couplé à une GFP, ceci le rend clairement visible sur un embryon de 3 jours (B) et (C). Certains des poissons mosaïque intègrent le transgène dans leurs cellules germinales et l'élevage de ces poissons donne une lignée stable F1 qui exprime BRAF V600E dans tous les mélanocytes dérivés de la crête neurale visualisée par la GFP (B) et (C). (E) Zébrafish adulte souche sauvage ; (F) Zébrafish mosaïque F0 ; (G) Zébrafish transgénique stable portant la mutation BRAF V600E (Patton et al., 2010)

## ***b. Le Monodelphis domestica***



Figure 15 : *Monodelphis domestica*, un marsupial d'Amérique du Sud est un modèle utilisé en photobiologie (Vandeberg, Robinson, 1997)

L'opossum d'Amérique du Sud (*Monodelphis domestica*) est un petit marsupial d'environ 100 grammes. Il possède un système de réparation de l'ADN photoactivé. Cette particularité en fait un modèle intéressant pour les études de photobiologie (Vandeberg, Robinson, 1997). L'exposition aux UV produit des dimères de pyrimidine. Le système de réparation que possède l'opossum lui permet d'« effacer » 80-90% de ces dimères de pyrimidine si il est exposé à la lumière visible (Ley et al., 1991). Ainsi chez les opossum soumis à une exposition aux UV, l'exposition à la lumière permet de réduire l'incidence des mélanomes induits expérimentalement de 40% à 100%. Grâce à ce modèle il est possible d'étudier de manière ciblée le rôle des dommages sur l'ADN induits par les UV. De plus c'est la seule espèce non transgénique connue dans laquelle les effets des UV seuls peuvent induire un mélanome (Kusewitt et al., 1991). L'opossum est un petit animal (100g) dont l'élevage est simple. Il a été très bien caractérisé par de nombreuses études centrées sur les dommages causés à l'ADN par les UV. S'il est le plus souvent utilisé comme modèle de tumeurs induites, il peut également être l'hôte de mélanomes murins ou humains car le système immunitaire très immature du jeune opossum (< 5 semaines) laisse se développer des xénogreffes sous-cutanées (Wang et

al., 2003 ; 2009). Les limites de ce modèle est la localisation dermique des tumeurs et le manque de connaissances fondamentales sur le système immunitaire de cette espèce.

### c. Le chien

Le chien est une autre espèce animale utilisée comme modèle dans l'étude du mélanome. Les mélanomes canins se développent dans la cavité buccale, aux jonctions cutanéomuqueuses et aux extrémités distales des membres. Les races prédisposées sont les Golden Retrievers, les Setters Irlandais, les Scottish Terriers, les Pinschers, les Schnauzers (MacEwen, 1990), les Caniches, les Boxers, les Rottweillers et les Labradors. Le développement fréquent de mélanome dans certaines races prédisposées, fait du chien un modèle d'identification et d'étude des gènes de prédisposition.

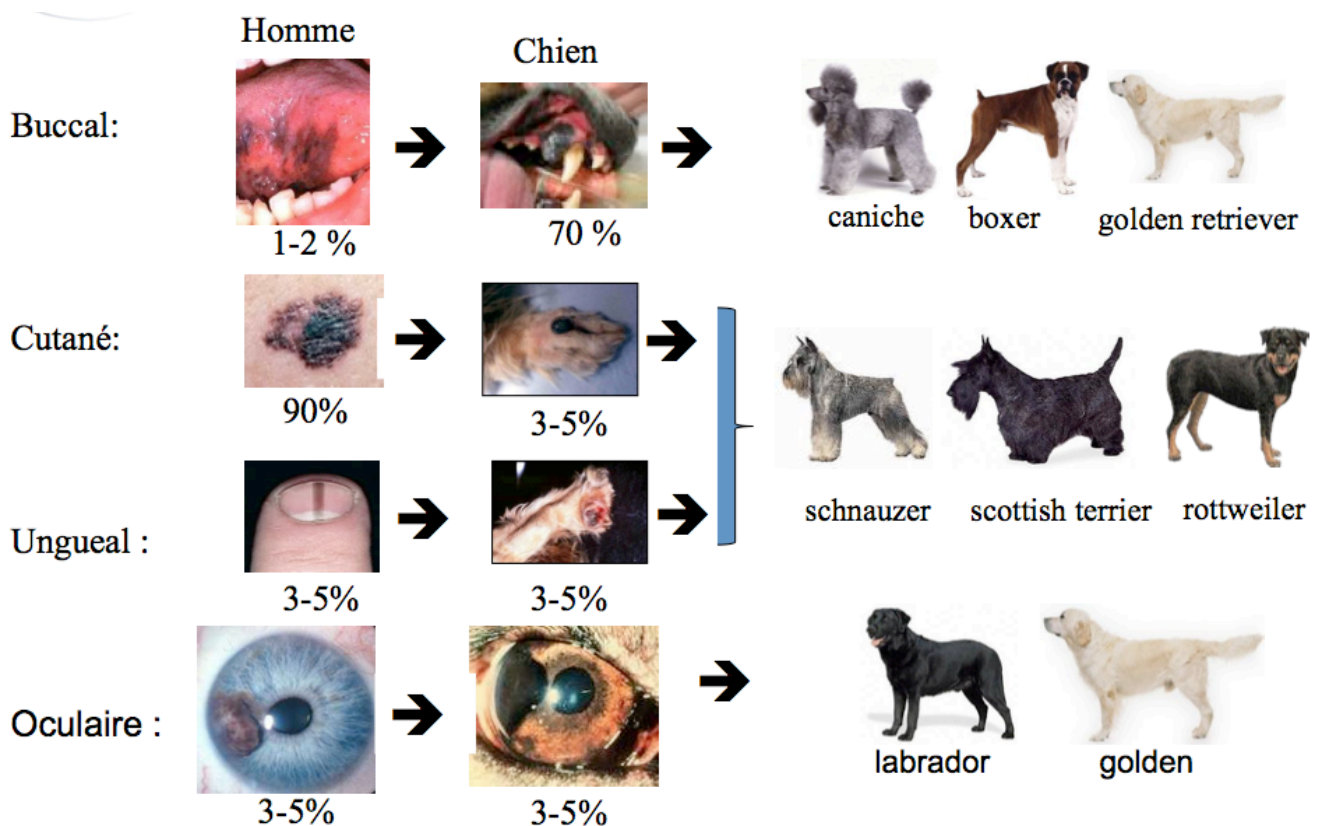


Figure 16 : La prédisposition raciale aux différents types cliniques de mélanomes fait du chien un modèle d'identification et d'étude des gènes de prédisposition (C. André – CNRS – 2012)

Les mélanomes canins sont des tumeurs agressives qui métastasent rapidement par voie lymphophile. Les sujets dont le bilan d'extension est négatif et dont la tumeur primitive est réséquée chirurgicalement de manière large ont une médiane de survie de 3 à 12 mois (Aronsohn, Carpenter, 1990). Comme les tumeurs humaines, les mélanomes métastatiques canins sont peu sensibles aux chimiothérapies conventionnelles et semblent en revanche répondre aux immunothérapies (Moore et al., 1991). Le chien est à ce titre un modèle animal utilisé pour l'étude des immunothérapies du mélanome métastatique (Fairchild, Carson, 2011). Westberg et al. publient en 2013 un essai clinique sur une série de 19 chiens présentant un mélanome spontané traités par un adénovecteur CD40L (AdCD40L) par injection intratumorale. 5 réponses complètes, 8 réponses partielles et 4 stabilisations de la progression tumorale ont été obtenues (Westberg et al., 2013).

#### *d. Le porc*



Figure 17 : porcelet MeLiM (Melanoblastoma-bearing Libechov Minipig), 1 mois, porteur de nombreux mélanomes spontanés dont certains se sont développés in utero

Plusieurs souches de mini-porcs présentent une forte prédisposition au développement de mélanomes cutanés. Il s'agit des souches porcines Sinclair, Hormel, Munich troll et MeLiM (Melanoblastoma-bearing Libechov Minipig) (Misfeldt, Grimm, 1994 ; Hruban et al., 2004). Ce trait génétique peut être renforcé par sélection pour obtenir 50% de porcelets portant un mélanome dès la naissance et 85% dans la première année de vie. De nombreux naevi sont présents dans ces races. Ces modèles ont aidé à l'identification de gènes de prédisposition dans le génome humain (Gomez-Raya et al., 2007). L'évolution naturelle de ces lésions est métastatique dans 25% des cas. Pour les autres individus on observe une régression des lésions et la maladie n'est pas létale (Gomez-Raya et al., 2007). On note alors une dépigmentation et une diminution de la taille des tumeurs. Histologiquement ces lésions sont le siège d'un infiltrat important de lymphocytes et de macrophages pigmentés. Ceci suggère que le système immunitaire intervient pour une grande part dans la régression de ces tumeurs (Greene et al., 1994). Cette particularité en fait un modèle animal d'intérêt pour l'étude de la régression tumorale spontanée (Rambow et al., 2008). Par ailleurs une souche de porc immunodéficient (SCID-like) Yorkshire a été utilisée pour la

première fois en 2012 pour réaliser un modèle de xénogreffe humaine (Basel et al., 2012). Ce déficit immunitaire semble être de transmission autosomique récessive (Ozuna et al., 2013).

## **VI. Les méthodes de suivi et d'évaluation de la réponse aux traitements des modèles murins**

### **A. Suivi clinique de la croissance tumorale**

La méthode la plus simple pour évaluer la croissance tumorale d'une tumeur accessible en sous-cutanée est le calcul d'un volume par la mesure des 3 dimensions de la tumeur : largeur, longueur et épaisseur. Plusieurs formules mathématiques permettent d'approcher ce volume (DiPersio et al., 1979 ; Euhus et al., 1986):

- $L$  (plus grand axe en mm)  $\times$   $l$  (largeur en mm)  $\times$   $H$  (épaisseur en mm)  $\times \pi/6$
- ou  $L^2 \times l \times \pi/6$
- ou  $L \times l^2 \times \frac{1}{2}$

Cette méthode très accessible a ses limites. Il peut s'agir parfois de la mauvaise accessibilité de la tumeur, de sa relative irrégularité de forme et des variations intra et interindividuelles des mesures. Des méthodes de mesure du volume de la tumeur plus automatisées ont été mises au point, notamment à l'aide de scanner laser (Girit et al., 2008). Ceci permet de réduire les variations inter-individuelles et d'augmenter la reproductibilité.

Les autres paramètres cliniques de suivi pour évaluer la réponse au traitement sont fréquemment:

- la croissance relative :  $\% T$  (tumeur traitée) /  $C$ (tumeur contrôle)
- l'inhibition de croissance :  $1 - \% T/C$
- le délai de croissance :  $\% (T - C)/C$
- le taux de régression partielle ou totale (RP ou RT)
- le pourcentage d'animaux indemnes de tumeur
- l'augmentation de la durée de survie

## **B. Histologie**

Traditionnellement l'histologie permet d'évaluer à la fois qualitativement et quantitativement la progression tumorale grâce à différents marqueurs tumoraux. Les variations de multiples marqueurs biologiques sont décelables par différentes techniques standard : l'immunohistochimie, le Southern et le Northern Blot ou encore la qPCR. Ces techniques ne peuvent être utilisées qu'aux points limites de l'expérience et imposent le sacrifice de l'animal xéno greffé car les biopsies sont difficiles à réaliser et facteurs de morbidité et mortalité.

## **C. Marqueurs sériques**

Il est parfois possible de surveiller l'évolution tumorale en dosant un marqueur biologique libéré dans la circulation sanguine de l'hôte porteur de la tumeur. Certains travaux rapportent le suivi de tumeurs préalablement transfectées par un gène marqueur comme le PSA (Prostate Specific Antigen) (Conway et al., 2000). Les taux sériques de PSA mesurés itérativement ont donné la possibilité de quantifier in vivo la progression tumorale.

D'autres marqueurs sont physiologiquement produits par la tumeur et dosables dans le serum de l'hôte. Il s'agit par exemple de la LDH dont l'activité sérique est dosable dans un serum non hémolysé (Arguello et al., 1996). On peut également doser les différentes isoformes de la LDH et leurs variations en fonction de la croissance tumorale. En effet il est intéressant de noter que l'hôte murin ne sécrète pas les mêmes isoformes que la tumeur humaine (Arguello et al., 1996). La LDH5 est ainsi spécifique de la tumeur humaine. Cette particularité en fait un marqueur intéressant. Après injection de cellules de leucémie humaine dans un modèle de souris SCID, la LDH spécifiquement humaine est détectable dans le serum de l'animal dès le 7<sup>e</sup> jours. Le nombre de cellules CD10<sup>+</sup> de leucémie humaine présentes dans la moelle osseuse des souris SCID a été le reflet de la progression tumorale. Les taux de LDH augmentent progressivement parallèlement à la croissance tumorale atteignant 50,000 U/L au 25<sup>e</sup> jour après transplantation. L'étude montre également la réversibilité de ces marqueurs



en traitant les souris par de la toxine diphtérique qui cible uniquement les cellules humaines (les cellules murines ne possédant pas de récepteur à la toxine diphtérique). Les taux de LDH totaux et celui de l'isoenzyme LDH5 diminuent fortement dans le serum des souris traitées.

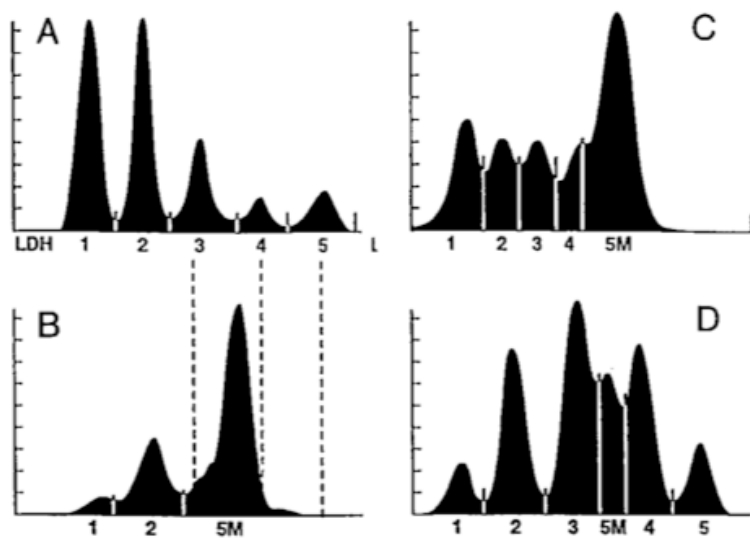


Figure 18 : Profils des différentes isoenzymes de la LDH. (A) serum humain normal ; (B) serum souris SCID saine ; (C) serum d'une souris SCID avec des cellules murines hémolysées ; (D) serum d'une souris SCID porteuse d'une tumeur humaine (Arguello et al., 1996)

## D. Imagerie

Dans la plupart des modèles orthotopiques ou métastatiques la tumeur est rarement accessible à la palpation. Il est donc impossible d'évaluer son volume par des mesures externes pour réaliser son suivi et sa réponse au traitement.

Il peut être intéressant de marquer les cellules tumorales avant de les greffer afin de suivre leur évolution dans l'animal. Ce marquage est réalisé grâce à des marqueurs fluorescents comme la Green Fluorescent Protein (GFP) (Hoffman, 2002) ou luminescents comme la luciférase (Contag et al., 2000) intégrés dans le génome de la cellule tumorale. La bioluminescence et la vidéomicroscopie confocale *in vivo* permettent de localiser la tumeur *in vivo* et d'en faire des mesures itératives tout au long d'un traitement (Naumov et al., 1999 ; Schaer et al., 2011). Ces techniques de microscopies confocale et de fluorescence jouent un rôle important dans l'étude de la biologie tissulaire *in vivo*. Elles permettent d'acquérir des images de sections tissulaires très fines d'un tissu vivant à des profondeurs différentes. L'imagerie *in vivo* non invasive des couches superficielles de certains organes comme la cornée, les muqueuses des organes creux ou la peau (König, 2000 ; Koehler et al., 2006). Ces véritables « microscopes dans le corps » ont une résolution qui permet de voir les détails d'une cellule. Chernyavskiy et al. montrent par des techniques combinées les changements morphologiques au niveau cellulaire d'un mélanome murin soumis à l'hyperthermie (Chernyavskiy et al., 2009). Parmi ces microscopes spécialisés, nous avons réalisé des images *in vivo* de mélanome sous-cutané à l'aide de Cell-Vizio® : un microscope confocal dont les sondes permettent d'acquérir l'autofluorescence des tissus *in vivo*.



Figure 19 : Acquisition d'images en Cell-Vizio sur un animal anesthésié. Cette technique d'imagerie permet un suivi longitudinal des caractéristiques histologiques des tumeurs sans sacrifice de l'animal

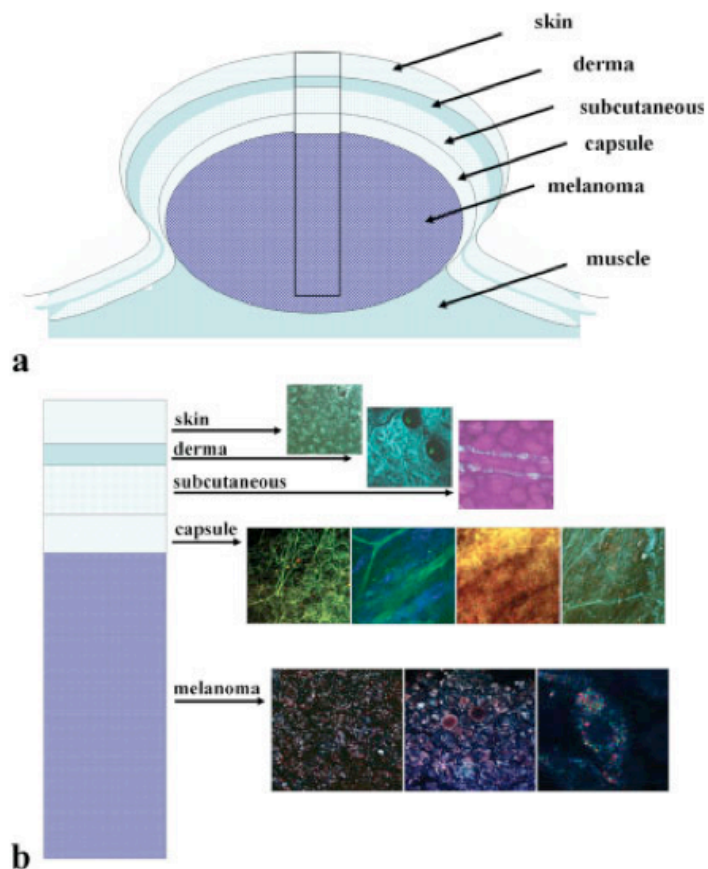


Figure 20 : Section schématique d'une tumeur sous-cutanée de mélanome (a). Le microscope confocal in vivo Cell-Vizio permet d'acquérir des images de définition histologique (b) des différentes couches tissulaires successives (Chernyavskiy et al., 2009)

D'autres technologies permettent actuellement de réaliser de l'imagerie fonctionnelle chez le petit animal. C'est le cas de la microTEP (Tomographie par Emission de Positons) ou encore de la tomographie par emission d'un unique Photon (SPECT) (Waterhouse et al., 1997). De multiples marqueurs radioactifs sont disponibles parmi lesquels le plus répandu est le  $^{18}\text{F}$ -FDG. Ce marqueur est un précurseur du glucose qui reste bloqué dans les organes fixant le glucose pour les besoins de leur métabolisme. Cette imagerie permet par exemple de détecter des métastases pulmonaires de cancer colique d'environ 0.3 mm de diamètre (Sharkey et al., 2008). L'utilisation de la TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG est particulièrement intéressante pour le suivi des cancers dont le métabolisme glycolytique est augmenté. Dans le mélanome métastatique la TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG est utilisée en pratique clinique courante pour le bilan et le suivi des patients. La baisse de marquage au  $^{18}\text{F}$ -FDG d'une tumeur traitée au Vémurafenib (inhibiteur de BRAF) serait un marqueur prédictif précoce de la réponse au traitement (Baudy et al., 2012).

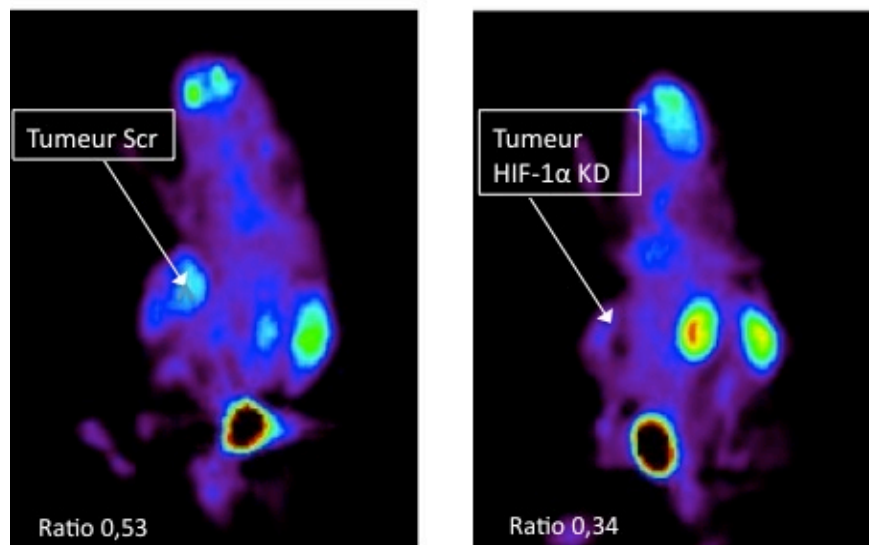


Figure 21 : Xénogreffes d'un mélanome exprimant HIF-1 $\alpha$  (Scr) et d'un clone knock-down HIF-1 $\alpha$  KD. La fixation du  $^{18}\text{F}$ -FDG en TEP est abaissée en l'absence du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$

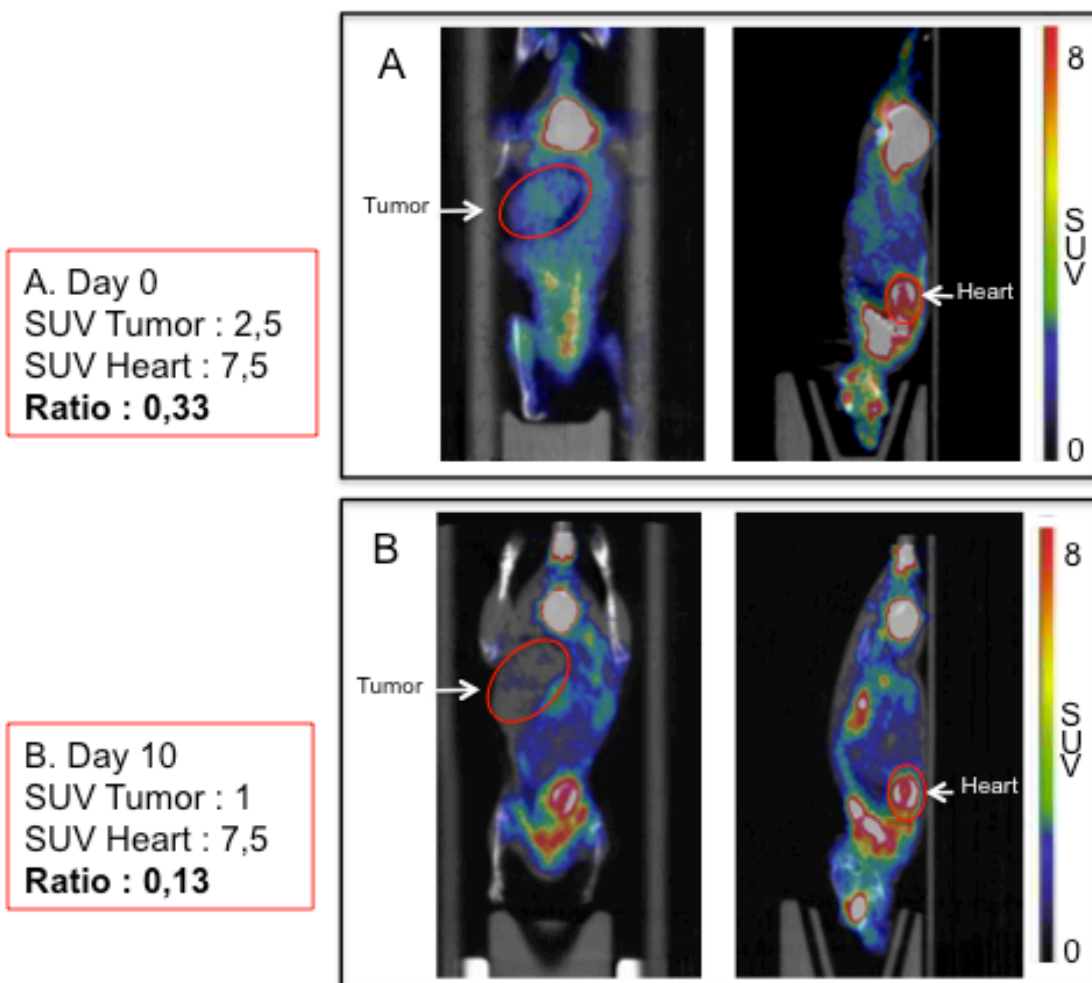


Figure 22 : Baisse de la fixation de  $^{18}\text{F}$ -FDG en microTEP après 3 jours de traitements par Vémurafénib d'une PDTX portant la mutation BRAF V600E

D'autres modèles s'appuient sur l'imagerie en microIRM (Ovrebø et al., 2013). Une tumeur qui répond au traitement antiprolifératif peut ne pas varier de volume global mais être le siège d'une nécrose tissulaire difficile à analyser et quantifier in vivo. La pondération T2 ne permet pas, chez la souris contrairement à la pratique clinique chez l'Homme, d'identifier précisément la nécrose au sein d'une masse tumorale. L'injection intraveineuse de Gadolinium n'améliore pas la qualité des résultats. En revanche, plusieurs équipes ont montré l'intérêt de l'imagerie en IRM dynamique ou DCE-MRI (Dynamic Contrast Enhanced- Magnetic Resonance Imaging)(Gulliksrud et al., 2008 ; Egeland et al., 2011 ; Ovrebø et al., 2013). Un agent de contraste (Gadolinium) est administré par voie intraveineuse en un bolus de 5,0

mL/kg. L'imagerie est réalisée avec une microIRM 1,5 Tesla sur un animal sédaté à l'isoflurane. Ce procédé d'imagerie fonctionnelle donne une bonne résolution de la perfusion tissulaire et donc de la nécrose intratumorale parfois en relation avec une réponse au traitement.

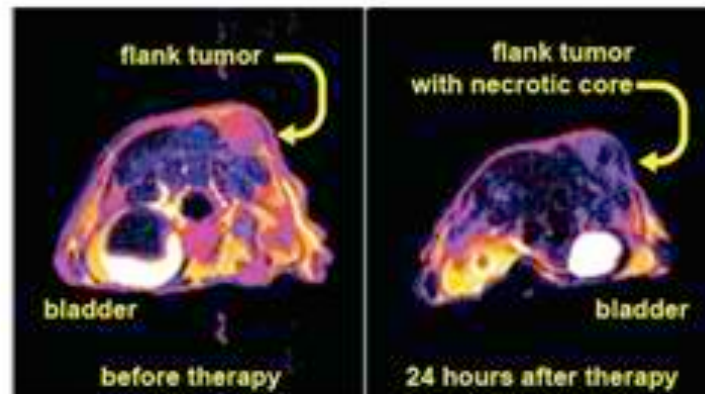


Figure 23: Imagerie fonctionnelle par IRM dynamique (DCE-MRI). Cette technologie permet d'évaluer la perfusion tissulaire et d'identifier précocément la nécrose au sein d'une masse tumorale en cours de traitement (Camel et al., University of Arizona)

Dans le cas de modèles orthotopiques dont l'organe envahi par la tumeur est un organe profond, inaccessible à l'examen clinique, d'autres types d'imagerie ont été proposées. Il s'agit par exemple de l'échographie 3D à haute fréquence pour l'évaluation et le suivi des métastases hépatiques. Graham et al. proposent un suivi longitudinal et non-invasif de métastases hépatiques par échographie 3D à haute fréquence (Graham et al., 2005). Le modèle utilisé est un modèle syngénique de métastases induites par injection de cellules issues de culture (B16) dans la veine mésentérique. Les plus petites métastases détectables au sein du foie par échographie 3D à haute fréquence ont un diamètre de 0,22 mm ce qui correspond à un volume d'environ 0,01 mm<sup>3</sup>. Il est précisé qu'une tumeur de 0,01 mm<sup>3</sup> est constituée d'environ 700 cellules de 15 µm organisées en sphère.

L'échographie doppler est également utilisée, notamment pour évaluer la densité vasculaire, la perméabilité ou la néovascularisation en particulier pour les localisations cérébrales. Pour valider la technique d'imagerie consistant en tracking cellulaire, l'équipe de Heyn et al. utilise un modèle animal de tumeur cérébrale induite par injection des cellules tumorales dans le ventricule gauche d'une souris nude (Heyn et al., 2006). Les cellules greffées sont issues de métastases cérébrales de cancer du sein (MDA-MB-231). Elles ont un fort potentiel métastatique car elles ont été sélectionnées après 6 passages consécutifs dans l'animal. Chaque passage consiste en une injection dans le ventricule gauche puis prélèvement des tumeurs intracérébrales obtenues pour les injecter dans une nouvelle génération de souris après dissociation.

	<b>Tumeur sous-cutanée</b>	<b>Tumeur orthotopique</b>	<b>Métastase</b>	<b>Angiogénèse</b>
Mesure au pied à coulisse	+	-	-	-
Imagerie optique (bioluminescence et fluorescence)	+	+	+	+
IRM, microTEP	+	+	+	-
Echographie	+	+/-	+/-	-
Echographie Doppler/ IRM dynamique	+	+	+	+

Tableau 10 : Techniques in vivo de monitoring de la progression tumorale et de l'efficacité des traitements

## **Objectifs du travail**

Pendant de nombreuses années les traitements du mélanome métastatique par des chimiothérapies cytotoxiques ont été peu efficaces, offrant une médiane de survie de quelques mois aux patients en stade IV. Le développement des immunothérapies d'une part et des thérapies ciblées d'autre part ont changé les possibilités thérapeutiques. Avec ces nouvelles molécules efficaces, les schémas thérapeutiques se multiplient. Un nouvel outil pré-clinique est indispensable aux chercheurs et aux cliniciens.

Les modèles murins sont largement utilisés dans la recherche en cancérologie. Leur génome est proche de celui de l'Homme, leur physiologie également. En outre les bases moléculaires et cellulaires de la tumorigénèse sont similaires. L'ensemble des champs d'utilisation est large : de l'identification de gènes de prédisposition, aux modèles *in vivo* d'induction de mélanomes UV-induits en passant par l'analyse diagnostique et les approches thérapeutique innovantes.

Dans cette optique, à l'instar d'autres équipes, nous avons exploré les possibilités offertes par l'utilisation des modèles murins. Les modèles de xénogreffes de cellules issues de culture ont montré leurs limites en terme de pouvoir prédictif de la réponse au traitement. Ces modèles ont donc évolué. Nous proposons ici la mise au point et les différentes utilisations de modèles de xénogreffes de tumeurs humaines.

Le premier objectif de ce travail est de montrer la plus value des modèles de xénogreffes de tumeurs humaines en complément des études *in vitro* menées dans le laboratoire sur l'efficacité de nouveaux traitements. En particulier l'approche métabolique innovante développée au laboratoire, efficiente sur les cellules *in vitro*, est-elle retrouvée au sein d'un organisme *in vivo* ? Comment les xénogreffes de lignées établies répondent-elles au blocage de la voie HIF-1 $\alpha$ / PI3K ? Les Patient-Derived Tumor Xenograft (PDTX) ou Tumorgraft, plus difficiles à mettre en œuvre, sont plus proches de la tumeur humaine dont elles sont issues. Sont-elles un bon outil préclinique pour tester des associations thérapeutiques innovantes ?



Le second objectif est en lien encore plus étroit avec la pratique clinique. Les modèles de PDTX, porteurs des tumeurs de nos patients, nous aident-ils à améliorer le suivi clinique et la surveillance des traitements ? Est-il possible de les inclure dans l'arsenal thérapeutique pour guider nos choix face aux nouvelles thérapies ciblées et à leurs associations éventuelles ? Peu de marqueurs permettant de prédire la réponse aux différentes molécules et à leurs associations sont à notre disposition. Un modèle murin de PDTX aide-il le clinicien dans ses choix thérapeutiques ?

## **Résultats**

### **I. Article 1**

*Inactivation of the HIF-1 $\alpha$ /PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants*

Cancer Res, 2012 Oct 1 ;72(19) :5035-47

Les cellules cancéreuses ont une possibilité de reprogrammation métabolique qui leur permet de passer de la phosphorylation oxydative à la glycolyse. Elles peuvent ainsi s'adapter à leur microenvironnement pauvre en nutriments, ce qui induit alors la sélection des clones tumoraux les plus agressifs. Cependant les mécanismes de cette reprogrammation ne sont pas entièrement élucidés. A l'aide d'approches complémentaires à partir de lignées cellulaires validées et de prélèvements frais de tumeurs humaines, nous montrons ici que la respiration mitochondriale et la phosphorylation oxydative sont freinées dans le mélanome métastatique, même en condition de normoxie, grâce au maintien d'une expression nucléaire élevée de HIF-1 $\alpha$ . Lorsque la voie de HIF-1 $\alpha$  est bloquée pharmacologiquement ou génétiquement, la glycolyse est freinée au profit de la respiration mitochondriale à travers la réduction spécifique de l'expression de la Pyruvate Déshydrogénase Kinase-3 (PDK3). L'activité de la PDK3 peut être inhibée soit par le DichloroAcétate (DCA) soit par un siRNA. Son atténuation a été suffisante pour permettre l'augmentation de l'activité de la Pyruvate Déshydrogénase (PDH), et l'accroissement de la phosphorylation oxydative et de la génération de ROS mitochondriales. Notons en particulier que le DCA a potentialisé l'effet antitumoral de l'elesclomol, une molécule pro-oxydante en cours de développement clinique, à la fois en limitant la prolifération cellulaire et en provoquant la mort cellulaire. Nous avons également mis en évidence que cette association thérapeutique a été efficace contre des cellules de mélanome portant la mutation

BRAFV600E et devenues résistantes à l'inhibiteur anti-BRAF le vénomrafénib. L'association du DCA et de l'esclomol in vivo a permis d'obtenir une réponse thérapeutique plus longtemps que celles obtenues respectivement avec un seul de ces 2 agents testés séparément. Nos résultats sont une validation pré-clinique d'une nouvelle cible thérapeutique dans la lutte contre le mélanome métastatique : la voie bioénergétique HIF-1 $\alpha$ /PDK3. Ils ouvrent la voie à d'autres combinaisons thérapeutiques innovantes qui pourraient être efficaces contre cette maladie.

## Article 2

### *Patient-derived tumor xenograft model to guide the use of BRAF inhibitors in metastatic melanoma*

Melanoma Res, 2013 Jul 10 [Epub ahead of print]

Les inhibiteurs de BRAF dont le Vémurafénib ont récemment révolutionné les schémas thérapeutiques du mélanome métastatique. Cependant des effets indésirables sont fréquemment observés et l'apparition de résistance est inexorable, limitant ainsi l'efficacité de ce traitement. Des modèles murins de xénogreffes issues directement de tumeurs de patient (Patient-Derived Tumor Xenograft ou PDTX) ont été proposés comme modèles pré-cliniques fiables permettant de prédire la réponse clinique au traitement. Nous avons mis au point dans ce travail un modèle de PDTX de mélanome portant la mutation BRAF-V600E pour tester l'efficacité du Vémurafénib. Nous avons en premier lieu validé la stabilité du modèle par rapport à la tumeur. Les caractéristiques histologiques et immunohistochimiques, le statut mutanionel et l'imagerie fonctionnelle en Tomographie par Emission de Positons (TEP) au  $^{18}\text{F}$ -FDG nous ont permis de comparer la PDTX à la tumeur primitive. D'autre part l'inhibition de la croissance tumorale et la diminution de la fixation du  $^{18}\text{F}$ -FDG en TEP ont mis en évidence la sensibilité des xénogreffes au Vémurafénib. Enfin l'utilisation de ce modèle de PDTX nous a permis de réintroduire le Vémurafénib chez une patiente en poursuite évolutive après un traitement par le Vémurafénib dont la dose avait été abaissée à cause d'un effet indésirable notable puis interrompue complètement. Au total nous avons montré que les modèles de PDTX reproduisent biologiquement le comportement d'une tumeur humaine. Par cette approche nous avons pu prédire la réponse au traitement par Vémurafénib de la tumeur d'une patiente porteuse de la mutation BRAF V600E en poursuite évolutive. Ceci nous a autorisé à réintroduire le Vémurafénib chez cette patiente. Ceci représente le deuxième cas publié de réintroduction d'une thérapie ciblée contre le mélanome. A l'instar des orientations prises dans le traitement du cancer du poumon par thérapie ciblée anti-EGFR, notre expérience clinique, guidée par

l'utilisation d'une PDTX, nous permet de discuter de nouveaux schémas thérapeutiques. Les thérapies ciblées pourraient être administrées de manière discontinue. Les tumeurs, toujours hétérogènes, comportent des clones sensibles et d'autres devenus résistants. Les clones résistants pourraient croître relativement plus lentement du fait de leurs nouvelles caractéristiques métaboliques acquises lors du processus de résistance. Les clones sensibles deviendraient alors à nouveau majoritaires, ce qui permettrait d'observer une nouvelle réponse thérapeutique clinique lors de la réintroduction de la thérapie ciblée. L'utilisation de modèles murins de xénogreffes issues directement de patients peut aider dans les choix des nouveaux schémas thérapeutiques proposés dans la lutte contre le mélanome métastatique.

## II. Article 3

### *Personalized care management using Patient-Derived Tumor Xenografts (PDTX): review of concept, implementations and perspectives*

(en cours de soumission)

Le mélanome métastatique stade IV avait jusqu'à présent une médiane de survie très faible d'environ 6 à 8 mois. Le développement de thérapies ciblées dont l'inhibiteur de BRAF Vémurafénib a amélioré, initialement de manière spectaculaire, la durée de survie des mélanomes porteurs de la mutation BRAF V600. Malheureusement les récurrences sont inexorables du fait de mécanismes de résistance acquis complexes. Nous présentons dans ce travail l'apport original d'un modèle animal de xénogreffes de tumeurs issues directement de patients (Patient-Derived Tumor Xenografts ou PDTX). La revue de la littérature sur la place des modèles animaux dans le mélanome métastatique fait état de nombreux modèles de xénogreffes de lignées cellulaires établies ou de cellules de patients après passage en culture. En revanche peu de PDTX sont publiées et leur taux de prise de greffe sont faibles. Nous présentons une synthèse des règles et des contraintes nous ayant permis d'obtenir un modèle stable et reproductible. Les métastases cutanées ou sous-cutanées porteuses de la mutation BRAF V600 issues directement de 7 patients ont été xénogreffées en sous-cutané dans un modèle murin de souris CB17-SCID avec adjonction d'une pseudo-membrane basale Matrigel®. Le taux de prise était de 91%. Les tumeurs développées ont été traitées par l'anti-BRAF Vémurafénib à la dose de 75 mg/kg/jour. Une surveillance clinique, biologique et d'imagerie métabolique par <sup>18</sup>F-FDG TEP/CT ont permis d'évaluer la réponse tumorale après 20 jours de traitement. La réponse tumorale observée dans le modèle murin était similaire aux observations cliniques à l'exception d'un patient. Dans ce cas particulier les doses de Vémurafénib pour le patient ont été diminuées suite à une phototoxicité majeure. Puis le traitement a été arrêté devant une poursuite évolutive. Grâce à une nouvelle PDTX réalisée sur des prélèvements de métastases récemment apparues, la sensibilité au Vémurafénib a été mise en évidence autorisant la réintroduction du traitement malgré l'impression clinique de résistance. Les marqueurs histologiques PS-100, HBM45 et MelanA ont été systématiquement

retrouvés dans les xénogreffes développées chez la souris. Par ailleurs une analyse par imagerie métabolique ( $^{18}\text{F}$ -FDG TEP/CT ) a montré une baisse significative de la fixation du marqueur dans les tumeurs après 10 jours de traitement (baisse de la SUV de 14,9% en moyenne). Notre étude montre la faisabilité, la reproductibilité et la concordance d'un modèle murin de xénogreffes issues directement de patients. Cette proposition originale est un outil utile autant en recherche fondamentale qu'en pratique clinique quotidienne.

## Personalized care management using patient-derived tumor xenografts (PDTX): review of concept, implementations and perspectives

P. Guerreschi<sup>1,3,4</sup>, A. Qassemyar<sup>1,3,4\*</sup>, C. Scalbert<sup>2,3</sup>, L. Pasquesoone<sup>1</sup>, J. Kluza<sup>3</sup>, L. Mortier<sup>2,3</sup>, P. Marchetti<sup>3</sup>

1. Service de Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, Hôpital Roger Salengro, rue Emile Laine 59037 Lille, France.
2. Service de Dermatologie, Hôpital Claude Huriez, 1 Place de Verdun 59037 Lille Cedex, France
3. UMR 837 – INSERM, Université de Lille 2 & CHRU LILLE, Lille, France
4. these authors all contributed in equal parts to this work.

\* Corresponding author :

e-mail : aqassemyar@gmail.com

With a median survival of 6 to 8 months, metastatic melanoma has a poor prognosis. The development of vemurafenib, a targeted therapy for the BRAFV600E mutation, has increased patient's survival but tumor resistance is ineluctable after 6 to 8 months in average. We present here the development of an original study model for metastatic melanoma using a patient-derived tumor xenograft (PDTX). The relevance of PDTX has been validated to study different types of cancers and we have used the guidelines and xenograft design reported in several publications. Patients with BRAFV600E mutations were included. Xenografts were performed in SCID-CB17 mice. The xenograft was implanted into a mouse subcutaneously. Thus, the model can be considered as orthotopic. Mice were treated with vemurafenib 75mg/kg twice a day. Clinical, biological and radiological analysis were performed. All models responded to the vemurafenib and the tumor volume was significantly different compared to controls after 20 days of treatment. We

observed a similar sensitivity in the patient and the animal. The three diagnostic markers of melanoma (PS100, HBM45 and MelanA) were found in the model. All xenografts presented the mutations corresponding to the respective patients. The search for the Ki67 marker of cellular proliferation showed a significant decrease in tumor proliferation in treated mice compared to controls. Radiological analysis (positron emission tomography) showed, at the beginning of the treatment, a mean Standardized Uptake Value (SUV) of 36.6% (R: 33%-40%). At 10 days into the treatment we noticed a significant decrease of SUV with a mean of 14.9% (R: 12%-18%). Our study validated the feasibility of PDTX in melanoma with a high rate of tumor graft and good concordance between the animal model and the patient. The relevance of these animal models in several types of cancers led our team to implement this technique in the study of metastatic melanoma.

### Introduction

With a median survival of 6 to 8 months, metastatic melanoma has a poor prognosis<sup>1</sup>. Up to 2011, the standard treatment for metastatic melanoma has been dacarbazine. Great hopes have been raised with targeted therapies. These new therapeutic approaches are based on

oncogenic molecular targets activating MAP Kinases (MAPK) and PI3K-AKT signaling pathways. In fact, some mutations such as BRAF, NRAS or CKIT activate the signaling pathways and tumor transformation. (Figure 1)

Thus, the BRAFV600E mutation is found in 50% of melanomas. The development of



vemurafenib, a targeted therapy for this mutation, has increased patient's survival by 6 to 8 months. Tumor resistance is ineluctable after 6 to 8 months in average. Resistance pathways can be explored in vivo. In vitro it has been demonstrated that BRAF mutant cell lines with increased cyclin D1 (CCND1) are more resistant to a BRAF inhibiting treatment. Another mechanism is the loss of PTEN tumor suppressor<sup>1</sup>. More recently, teams have underlined the importance of the relationship between the hepatocyte growth factor and its CMET receptor in the onset of treatment resistance<sup>35</sup>. Finally, one of the important mechanisms underlying the onset of resistance is the ERK disruption<sup>36</sup>.

How can we improve the effectiveness of these targeted therapies while promoting their sequential or combined use as well as their reintroduction? Physicians need tools to test the sensitivity of the tumor to the different therapeutic options available. Similarly to antibiotics therapy being prescribed based on an antibiogram having tested the sensitivity of an isolated bacterial strain to different antibiotics, the implementation of targeted therapy would need to be based on a tumorgram.

We present here the development of an original study model for metastatic melanoma using a patient-derived tumor xenograft. After having reviewed the main models developed in other cancers, we will present our approach for obtaining a reliable and reproducible animal model for melanoma.

### **Patient-derived tumor xenograft: Review of concept in metastatic melanoma therapies**

In animal models, tumor implants can stem from cellular lines developed in vitro, or more directly by harvesting a tumor from the patient and implanting it directly into

the animal, i.e. the concept of patient-derived tumor xenograft (PDTX).

The development of PDTX is highly relevant for two reasons. First, these models reproducing the physiology of cancer and patient's tumors can help us increase our knowledge in various types of cancers. Secondly, by studying their specific metabolism and underlying mechanisms we can better comprehend their resistance to therapeutic agents and in comparing and testing different treatments we can offer our patients the best therapeutic strategy available<sup>2</sup>.

However, most studies are based on models developed from cell lines<sup>3</sup>. These cells, after several cell cultures, are grafted into animals using subcutaneous injections. What are the advantages of PDTX models?

First, we know that tumor cells acquire genomic changes during in vitro cell line culturing. In fact, there are great genomic differences between cell lines from a tumor compared to the same human tumor xenografts<sup>4</sup>. Thus it is essential to develop real PDTX, i.e. xenografts of tumor tissues harvested in the patient and transferred immediately into the animal model.

Another advantage in using PDTX is the preservation of the tumor's microenvironment<sup>5</sup>, such as neovascularization or support tissues like fibroblasts and inflammation cells<sup>6</sup>. These non-tumor cells have shown their relevance and importance in carcinogenesis and therapeutic efficacy<sup>7</sup>.

The relevance of PDTX has been validated to study different types of cancers.

The development and use of patient-derived tumor xenografts is common in colorectal cancer and has been applied to different types of cancers<sup>8-11</sup>. It has been reported that PDTX models retain histopathological and molecular characteristics of their primary tumor<sup>10</sup>. Moreover, the primary tumor and corresponding PDTX exhibit similar therapeutic responses<sup>11,12</sup>.

Technical advances resulted in the design of orthotopic models<sup>13</sup>, thus improving the development of metastases as shown by Fu et al in pancreatic cancer<sup>14</sup>. One approach was to test several therapeutic agents on PDTX models while the patient received first-line treatment. If the disease progressed with the first-line treatment then patients were administered the treatment most effective on their PDTX model<sup>15</sup>. As validated, the modulation of peritumoral stroma could increase intratumoral concentration of gemcitabine<sup>7,16</sup>. PDTX pancreatic models treated with gemcitabine and nablitaxel resulted in decreased tumor volume compared to other treatments used. Authors used this model in a Phase II clinical trial and reported a median survival of 12.2 months in 44 patients<sup>16</sup>. Furthermore, PDTX are useful to better understand action and resistance mechanisms of targeted therapies. It has been reported that tumors with HER2 amplification were resistant to cetuximab and thus the association of anti-HER2 with cetuximab promoted tumor regression<sup>17</sup>.

For melanomas, the first xenografts in guinea pigs were reported in 1971<sup>18</sup>. There are very few achieved PDTX models for melanomas present in the literature<sup>19,20</sup>. In uveal melanomas, one study reported the use of a PDTX model in SCID mice with a 28% rate of transplantable grafts. In these xenografts, authors highlighted a correspondence between the patient's tumor and the animal model in terms of histology, genetic profile and expression of tumor-specific antigens. Furthermore, the clinical response to temozolomide was similar in these xenografts and in the patient<sup>20</sup>. Recently, the same team showed a high degree of genetic conservation between primary tumors and xenograft tumors over multiple in vivo passages<sup>19</sup>. Another important study in the refinement of orthotopic xenografts showed the importance of associating human melanoma cells and a collagen matrix

substitute dermis colonized beforehand by fibroblasts and human microenvironment<sup>21</sup>. PDTX can help with pre-clinical tests. Having xenografts with characteristics similar to the primary tumor can help test new molecules and obtain results closer to the patient's response than with the use of cell lines.

Furthermore, it has been recognized that tumor growth is faster in animals than in humans<sup>37</sup>. Thus, resistance can be predicted and the treatment adapted using several molecules from second-line treatments, alone or combined, to determine the best complementary treatment for the patient.

## **PDTX in Metastatic Melanoma: How to design it?**

### Patients:

To obtain reliable models before severe disease progression, we chose patients with slow-progressing metastatic melanoma with preferably one single subcutaneous lesion, that way once the lesion was resected the patient could be considered in clinical remission. Inclusion of patients was based on a multidisciplinary consensus with dermatology, plastic surgery and research teams. In all, seven patients were included from 2011 to 2012.

Before inclusion, we looked at the mutation status of the patient as well as history of previous and ongoing treatments. All patient procedures were approved by the Institutional Review Board of the University of Lille 2.

### Choice of the animal: relevance and limits:

To work directly with human tumors, the host must be immunosuppressed unless tumors are to be grafted under the kidney capsule. These first models which took advantages of the specific immune-privileged status of the kidney capsule were hard to manipulate during tumor implantation but also when monitoring for tumor proliferation and treatment

Technical advances resulted in the design of orthotopic models<sup>13</sup>, thus improving the development of metastases as shown by Fu et al in pancreatic cancer<sup>14</sup>. One approach was to test several therapeutic agents on PDTX models while the patient received first-line treatment. If the disease progressed with the first-line treatment then patients were administered the treatment most effective on their PDTX model<sup>15</sup>. As validated, the modulation of peritumoral stroma could increase intratumoral concentration of gemcitabine<sup>7,16</sup>. PDTX pancreatic models treated with gemcitabine and nablitaxel resulted in decreased tumor volume compared to other treatments used. Authors used this model in a Phase II clinical trial and reported a median survival of 12.2 months in 44 patients<sup>16</sup>. Furthermore, PDTX are useful to better understand action and resistance mechanisms of targeted therapies. It has been reported that tumors with HER2 amplification were resistant to cetuximab and thus the association of anti-HER2 with cetuximab promoted tumor regression<sup>17</sup>.

For melanomas, the first xenografts in guinea pigs were reported in 1971<sup>18</sup>. There are very few achieved PDTX models for melanomas present in the literature<sup>19,20</sup>. In uveal melanomas, one study reported the use of a PDTX model in SCID mice with a 28% rate of transplantable grafts. In these xenografts, authors highlighted a correspondence between the patient's tumor and the animal model in terms of histology, genetic profile and expression of tumor-specific antigens. Furthermore, the clinical response to temozolomide was similar in these xenografts and in the patient<sup>20</sup>. Recently, the same team showed a high degree of genetic conservation between primary tumors and xenograft tumors over multiple in vivo passages<sup>19</sup>. Another important study in the refinement of orthotopic xenografts showed the importance of associating human melanoma cells and a collagen matrix

substitute dermis colonized beforehand by fibroblasts and human microenvironment<sup>21</sup>. PDTX can help with pre-clinical tests. Having xenografts with characteristics similar to the primary tumor can help test new molecules and obtain results closer to the patient's response than with the use of cell lines.

Furthermore, it has been recognized that tumor growth is faster in animals than in humans<sup>37</sup>. Thus, resistance can be predicted and the treatment adapted using several molecules from second-line treatments, alone or combined, to determine the best complementary treatment for the patient.

## **PDTX in Metastatic Melanoma: How to design it?**

### Patients:

To obtain reliable models before severe disease progression, we chose patients with slow-progressing metastatic melanoma with preferably one single subcutaneous lesion, that way once the lesion was resected the patient could be considered in clinical remission. Inclusion of patients was based on a multidisciplinary consensus with dermatology, plastic surgery and research teams. In all, seven patients were included from 2011 to 2012.

Before inclusion, we looked at the mutation status of the patient as well as history of previous and ongoing treatments. All patient procedures were approved by the Institutional Review Board of the University of Lille 2.

### Choice of the animal: relevance and limits:

To work directly with human tumors, the host must be immunosuppressed unless tumors are to be grafted under the kidney capsule. These first models which took advantages of the specific immune-privileged status of the kidney capsule were hard to manipulate during tumor implantation but also when monitoring for tumor proliferation and treatment

order to work on the large final cohort in phase 3.

- Treatment phase or phase 3:

During this phase we constituted the mice cohorts in order to conduct comparative and metabolic studies. We divided the cohort into two groups (treatment and controls) once the tumor volume had reached 400 mm<sup>3</sup>.

A larger cohort can be constituted from the start if the initial harvested tumor volume is important and when therapeutic tests must be conducted in a prompt manner.

According to the mutation observed in our different patients we studied vemurafenib's effect on mice.

Analysis:

1. Clinical analysis

Tumor size was determined thrice weekly by caliper according to Workman's to compare treatment response between the treated and control groups with PDTX kinetics acting as early markers of a positive treatment response

2. Biological analysis

Serological tumor markers were used to monitor treatment response. Older publications have shown the predictive value of lactate dehydrogenase (LDH) levels, on cancer treatment response by chemotherapy in nude mice bearing human cell lineage<sup>33</sup>. The total LDH/LDH5 ratio can easily be measured in mice models by needle punctures of the retro-orbital sinus or tail.

3. Imaging

To compare subsequent metabolic responses and concordance between patient and animal model Positron emission tomography scans were performed on a microPET-Scan (Inveon, Siemens). Measurements of tumor cell kinetics in the model and metabolic response exhibited on the PET-Scan can be considered as early markers of treatment response<sup>34</sup>.

A bolus injection of <sup>18</sup>F-FDG (15 MBq;

150 µl volume) was administered into the tail vein while the animal was conscious but restricted into a handmade customized device. After the injection, the mouse was returned to its cage to promote biodistribution for approximately 30 minutes. Afterwards, the mouse was anesthetized with isoflurane (5% for induction and 1.5% for maintenance in 100% O<sub>2</sub> at a flow rate of 1 L.min<sup>-1</sup>) using a nose cone as an anesthesia mask and placing the animal in a prone position on the scanner platform. Using a laser alignment device mounted onto the scanner, the mouse was positioned so the center of the image field focused on the tumor mass. A CT-scan (80KV and 500 mA) was performed right before the mouse was moved into the PET field-of-view. PET scan was initiated 45 minutes after the radiotracer injection. Total scan duration amounted to 15 minutes. PET image data were in DICOM format and 3 separate frames were extracted and images were reconstructed using 2D OSEM iterative software and corrected for scatter and attenuation. Scan-detected counts were converted into Bq/mL using the Inveon Research Workflow (IRW version 3.0, Siemens). This software enables PET-CT image co-registration and manual selection and drawing of regions of interest (ROIs). ROIs were placed on the tumor region. 18-FDG fixation was computed in neutral organs at a distance from the tumor in order to allow for inter and intra-individual comparison by activity ratios. Cardiac microcirculation is chosen as a target organ after radiotracer biodistribution (45 min). Background noise was also recorded. In all cases, the apparent activity in the background regions reflected contributions from random coincidental events, and scatter was found to be very minimal throughout the course of the studies. Tumor-to-heart activity ratios were compared among other PET studies.

Results were analyzed using GraphPad Prism® version 4.00 (GraphPad Software,

order to work on the large final cohort in phase 3.

- Treatment phase or phase 3:

During this phase we constituted the mice cohorts in order to conduct comparative and metabolic studies. We divided the cohort into two groups (treatment and controls) once the tumor volume had reached 400 mm<sup>3</sup>.

A larger cohort can be constituted from the start if the initial harvested tumor volume is important and when therapeutic tests must be conducted in a prompt manner.

According to the mutation observed in our different patients we studied vemurafenib's effect on mice.

Analysis:

1. Clinical analysis

Tumor size was determined thrice weekly by caliper according to Workman's to compare treatment response between the treated and control groups with PDTX kinetics acting as early markers of a positive treatment response

2. Biological analysis

Serological tumor markers were used to monitor treatment response. Older publications have shown the predictive value of lactate dehydrogenase (LDH) levels, on cancer treatment response by chemotherapy in nude mice bearing human cell lineage<sup>33</sup>. The total LDH/LDH5 ratio can easily be measured in mice models by needle punctures of the retro-orbital sinus or tail.

3. Imaging

To compare subsequent metabolic responses and concordance between patient and animal model Positron emission tomography scans were performed on a microPET-Scan (Inveon, Siemens). Measurements of tumor cell kinetics in the model and metabolic response exhibited on the PET-Scan can be considered as early markers of treatment response<sup>34</sup>.

A bolus injection of <sup>18</sup>F-FDG (15 MBq;

150 µl volume) was administered into the tail vein while the animal was conscious but restricted into a handmade customized device. After the injection, the mouse was returned to its cage to promote biodistribution for approximately 30 minutes. Afterwards, the mouse was anesthetized with isoflurane (5% for induction and 1.5% for maintenance in 100% O<sub>2</sub> at a flow rate of 1 L.min<sup>-1</sup>) using a nose cone as an anesthesia mask and placing the animal in a prone position on the scanner platform. Using a laser alignment device mounted onto the scanner, the mouse was positioned so the center of the image field focused on the tumor mass. A CT-scan (80KV and 500 mA) was performed right before the mouse was moved into the PET field-of-view. PET scan was initiated 45 minutes after the radiotracer injection. Total scan duration amounted to 15 minutes. PET image data were in DICOM format and 3 separate frames were extracted and images were reconstructed using 2D OSEM iterative software and corrected for scatter and attenuation. Scan-detected counts were converted into Bq/mL using the Inveon Research Workflow (IRW version 3.0, Siemens). This software enables PET-CT image co-registration and manual selection and drawing of regions of interest (ROIs). ROIs were placed on the tumor region. 18-FDG fixation was computed in neutral organs at a distance from the tumor in order to allow for inter and intra-individual comparison by activity ratios. Cardiac microcirculation is chosen as a target organ after radiotracer biodistribution (45 min). Background noise was also recorded. In all cases, the apparent activity in the background regions reflected contributions from random coincidental events, and scatter was found to be very minimal throughout the course of the studies. Tumor-to-heart activity ratios were compared among other PET studies.

Results were analyzed using GraphPad Prism® version 4.00 (GraphPad Software,

At the beginning of the treatment (Day 0) we observed a mean Standardized Uptake Value (SUV) of 36.6% (R: 33%-40%).

At 10 days into the treatment we noticed a significant decrease of SUV with a mean of 14.9% (R: 12%-18%). It is interesting to note that at this same period the volume difference analyzed by PET-Scan between treated mice and controls was not significant.

This element validates the metabolic effect of vemurafenib on tumor tissue mutated for the BRAFV600E protein, and the 18-FDG SUV decrease could be considered a predictive factor of the clinical response to the treatment. Conducting early PET-scans in animal models can reveal early response markers.

## CONCLUSION:

PDTX is a very useful tool in oncology to develop personalized care management, test new therapeutics, search for response or resistance biomarkers or study the in-vivo tumor metabolism. The relevance of these animal models in several types of cancers led our team to implement this technique in the study of metastatic melanoma. Our study validated the feasibility of PDTX in melanoma with a high rate of tumor graft and good concordance between the animal model and the patient.

Recent advances in the knowledge of melanoma oncogenesis processes underline the real need to work on models very close to clinical situations. The reliability and effectiveness of these PDTX models promote their use in the care management of patients with metastatic melanoma in order to evaluate targeted therapies. The feasibility of this model has been validated in metastatic melanoma and other studies are needed to expand our knowledge, refine the model and develop new therapeutic pathways.

## References :

1. Tas, F. Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors. *J Oncol* 2012, 647684 (2012).
2. Kerbel, R. S. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol. Ther.* 2, S134-139 (2003).
3. Quintana, E. *et al.* Human melanoma metastasis in NSG mice correlates with clinical outcome in patients. *Sci Transl Med* 4, 159ra149 (2012).
4. Daniel, V. C. *et al.* A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Res.* 69, 3364-3373 (2009).
5. Mbeunkui, F. & Johann, D. J., Jr. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63, 571-582 (2009).
6. Weber, C. E. & Kuo, P. C. The tumor microenvironment. *Surg Oncol* 21, 172-177 (2012).
7. Olive, K. P. *et al.* Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324, 1457-1461 (2009).
8. Linnebacher, M. *et al.* Cryopreservation of human colorectal carcinomas prior to xenografting. *BMC Cancer* 10, 362 (2010).
9. Dangles-Marie, V. *et al.* Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: comparison of success rate and cell line features. *Cancer Res.* 67, 398-407 (2007).
10. Guenot, D. *et al.* Primary tumour genetic alterations and intra-tumoral heterogeneity are maintained in xenografts of human colon cancers showing chromosome instability. *J. Pathol.* 208, 643-652 (2006).
11. Fichtner, I. *et al.* Anticancer drug response and expression of molecular markers in early-passage xenotransplanted colon carcinomas. *Eur. J. Cancer* 40, 298-307 (2004).
12. Julien, S. *et al.* Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 18, 5314-5328 (2012).
13. Killion, J. J., Radinsky, R. & Fidler, I. J. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev.* 17, 279-284 (1998).
14. Fu, X., Guadagni, F. & Hoffman, R. M. A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 5645-5649 (1992).
15. Hidalgo, M. *et al.* A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer. *Mol. Cancer Ther.* 10, 1311-1316 (2011).
16. Von Hoff, D. D. *et al.* Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. *J. Clin. Oncol.* 29, 4548-4554 (2011).
17. Bertotti, A. *et al.* A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ('xenopatients') identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov* 1, 508-523 (2011).
18. Manuelidis, E. E. Heterologous transplantation of a tissue culture line of a human melanoma (TC491). *Yale J Biol Med* 43, 307-322 (1971).
19. Laurent, C. *et al.* Patient-derived xenografts recapitulate molecular features of human uveal melanomas. *Mol Oncol* (2013). doi:10.1016/j.molonc.2013.02.004
20. Némati, F. *et al.* Establishment and characterization of a panel of human uveal melanoma xenografts derived from primary and/or metastatic tumors. *Clin. Cancer Res.* 16, 2352-2362 (2010).
21. Kiowski, G. *et al.* Engineering Melanoma Progression in a Humanized Environment In Vivo. *J Invest Dermatol* 132, 144-153 (2012).

22. Aamdal, S., Fodstad, O. & Pihl, A. Human tumor xenografts transplanted under the renal capsule of conventional mice. Growth rates and host immune response. *Int. J. Cancer* 34, 725–730 (1984).
23. Bogden, A. E. The subrenal capsule assay (SRCA) and its predictive value in oncology. *Ann Chir Gynaecol Suppl* 199, 12–27 (1985).
24. Becker, J. C. *et al.* Mouse models for melanoma: a personal perspective. *Exp. Dermatol.* 19, 157–164 (2010).
25. Morton, C. L. & Houghton, P. J. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc* 2, 247–250 (2007).
26. Fridman, R. *et al.* Enhanced tumor growth of both primary and established human and murine tumor cells in athymic mice after coinjection with Matrigel. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 769–774 (1991).
27. Benton, G., Kleinman, H. K., George, J. & Arnaoutova, I. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *Int. J. Cancer* 128, 1751–1757 (2011).
28. Tentler, J. J. *et al.* Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 9, 338–350 (2012).
29. Rubio-Viqueira, B. & Hidalgo, M. Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 85, 217–221 (2009).
30. Sausville, E. A. & Burger, A. M. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res.* 66, 3351–3354, discussion 3354 (2006).
31. Jin, K. *et al.* Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review. *Clin Transl Oncol* 12, 473–480 (2010).
32. Rubio-Viqueira, B. *et al.* An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 4652–4661 (2006).
33. DiPersio, L., Kyriazis, A. P., Michael, J. G. & Pesce, A. J. Monitoring the therapy of human tumor xenografts in nude mice by the use of lactate dehydrogenase. *J. Natl. Cancer Inst.* 62, 375–379 (1979).
34. Baudy, A. R. *et al.* FDG-PET is a good biomarker of both early response and acquired resistance in BRAFV600 mutant melanomas treated with vemurafenib and the MEK inhibitor GDC-0973. *EJNMMI Res* 2, 22 (2012).
35. Wilson, T. R. *et al.* Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 487, 505–509 (2012).
36. Bollag, G. *et al.* Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467, 596–599 (2010).
37. Kopetz, S., Lemos, R. & Powis, G. The promise of patient-derived xenografts: the best laid plans of mice and men. *Clin. Cancer Res.* 18, 5160–5162 (2012).
38. Das Thakur, M. *et al.* Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature* 494, 251–255 (2013).

Figure 1 :

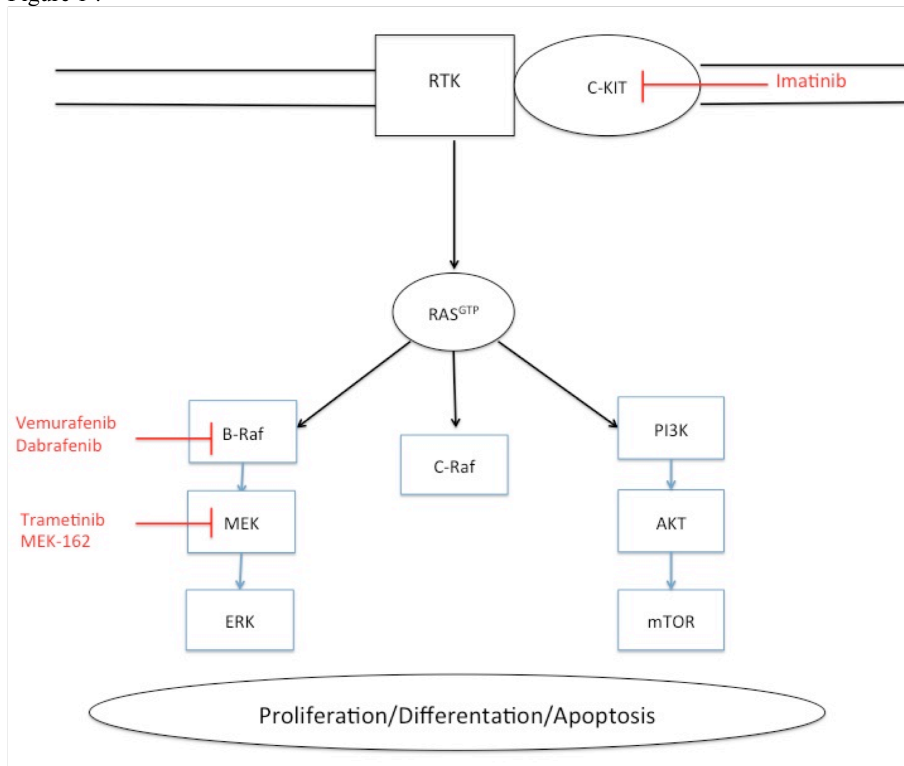


Figure 1 : Principales voies de l'oncogénèse impliquées dans le mélanome et inhibiteurs spécifiques.



Figure 2 :

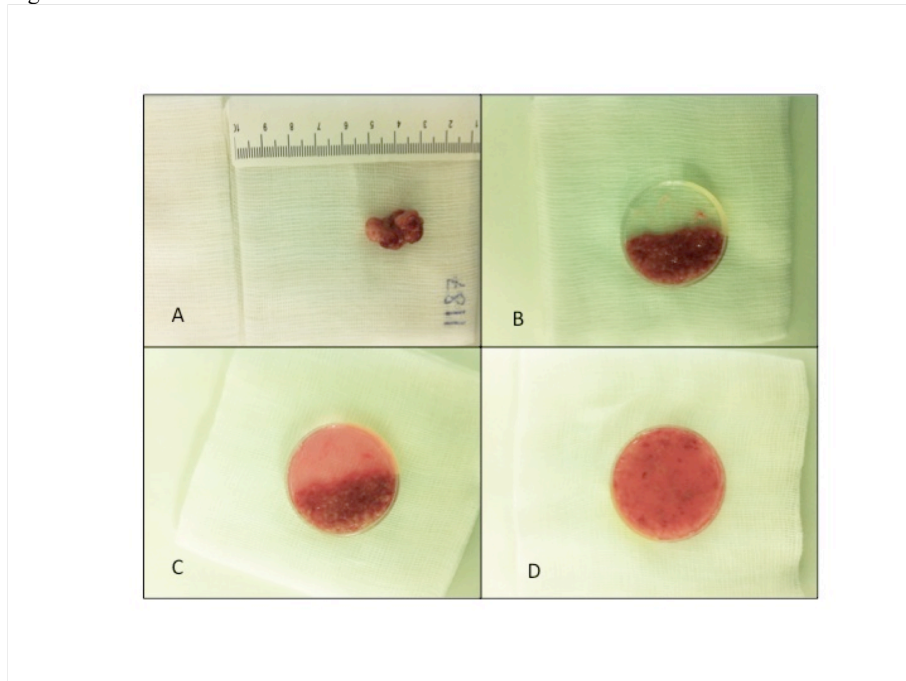


Figure 2 : Préparation de la greffe. A : prélèvement du nodule. B : Le nodule est finement broyé. C : Disposition du Matrigel® pour un volume équivalent au matériel tumoral. D : Mélange final.

Figure 3 :

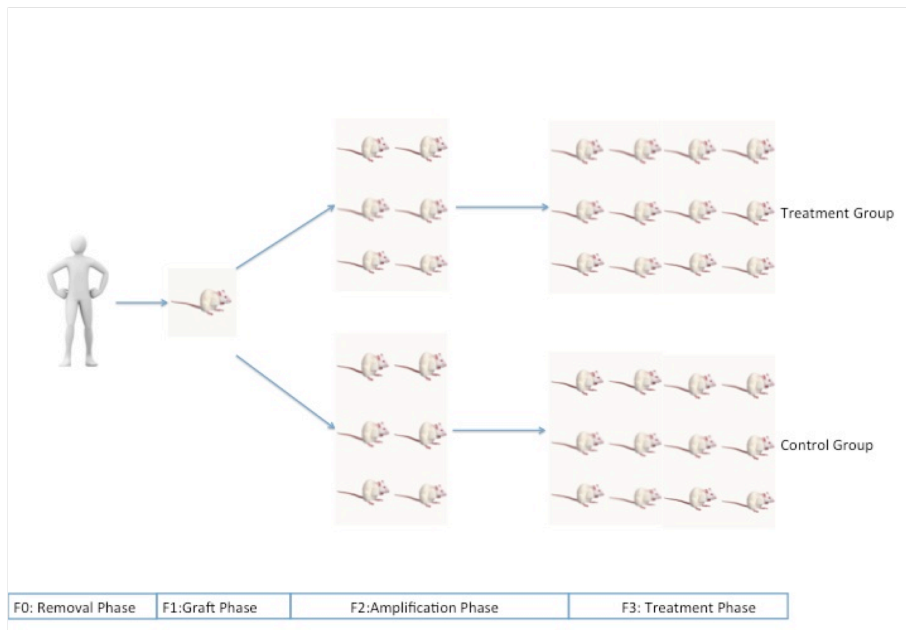


Figure 3 : Représentation schématique du plan de xénogreffe : du prélèvement primaire à la phase de traitement.

Figure 4 :

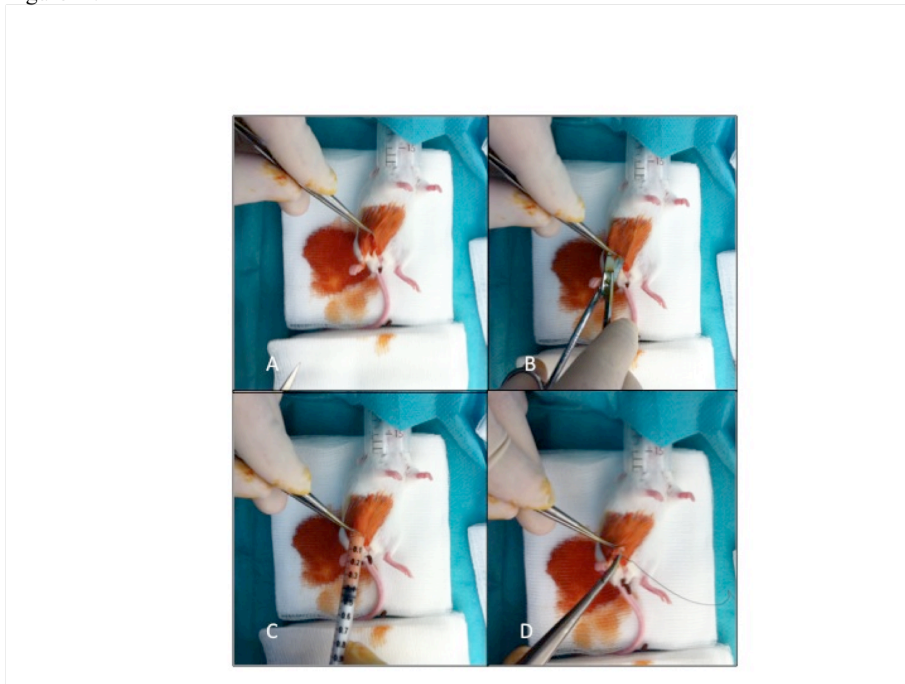


Figure 4 : Xénogreffe sous-cutanée orthotopique. A : Préparation du site de greffe. B : Dissection sous-cutanée stricte. C : Xénogreffe tumorale orthotopique. D : Fermeture cutanée.

Figure 5:

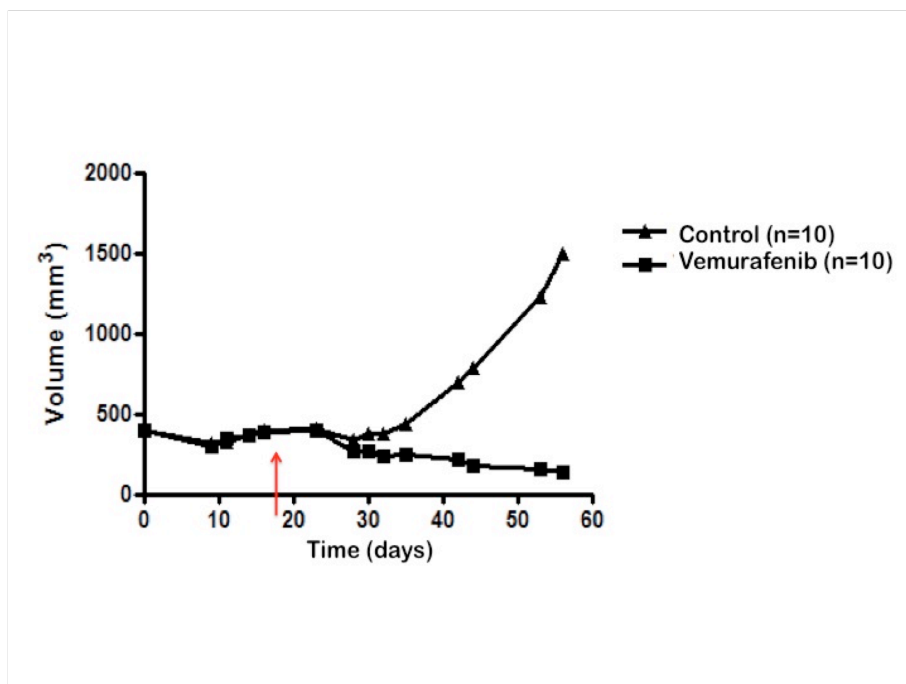


Figure 5 : Variation significative du volume tumoral chez les souris traitées en comparaison aux témoins. Notez la décroissance initiale du volume liée à la résorption du Matrigel. (Flèche rouge : début du traitement)

Figure 6:

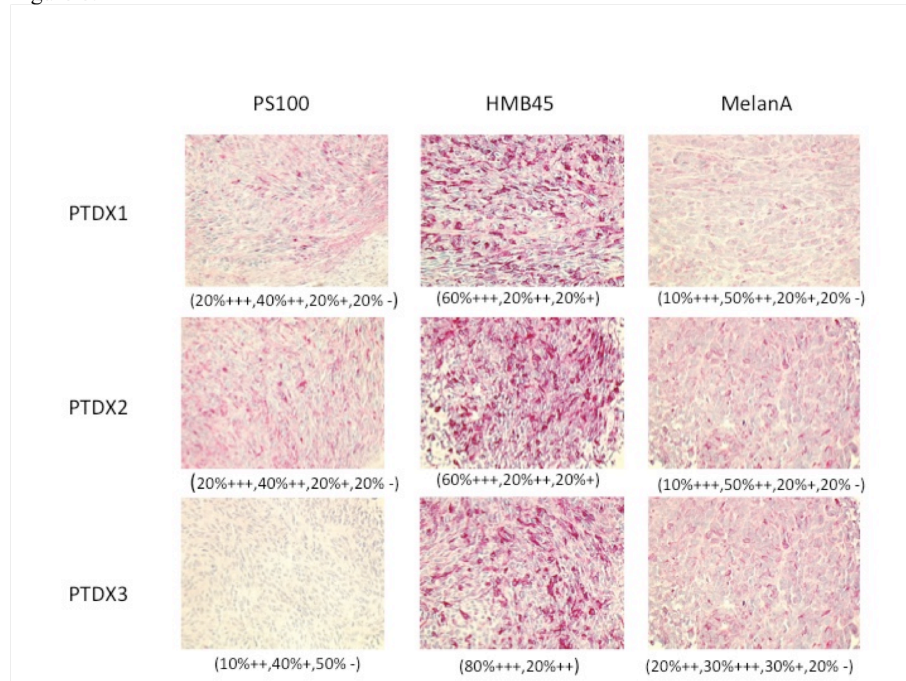


Figure 6 : Présence des trois marqueurs mélaniques aux différents stades de xénogreffe confirmant la nature du tissu tumoral. +++ : fixation intense ; ++ : fixation forte ; + : fixation modérée ; - : fixation faible.

Figure 7 :

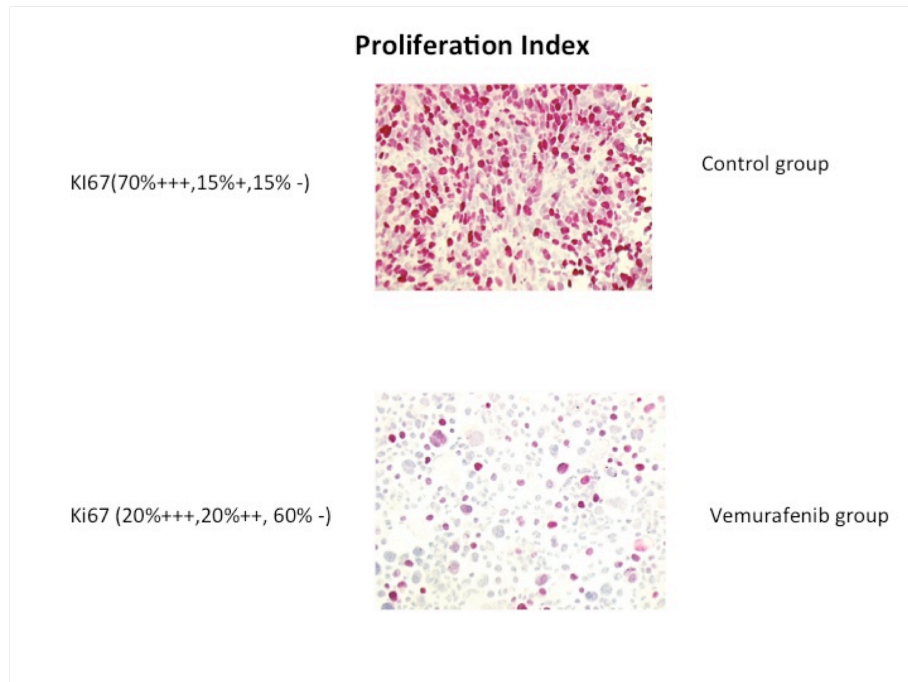


Figure 7 : Diminution du taux de Ki67 après traitement par vemurafenib en comparaison au groupe témoin. +++ : fixation intense ; ++ : fixation forte ; + : fixation modérée ; - : fixation faible.

Figure 8 :

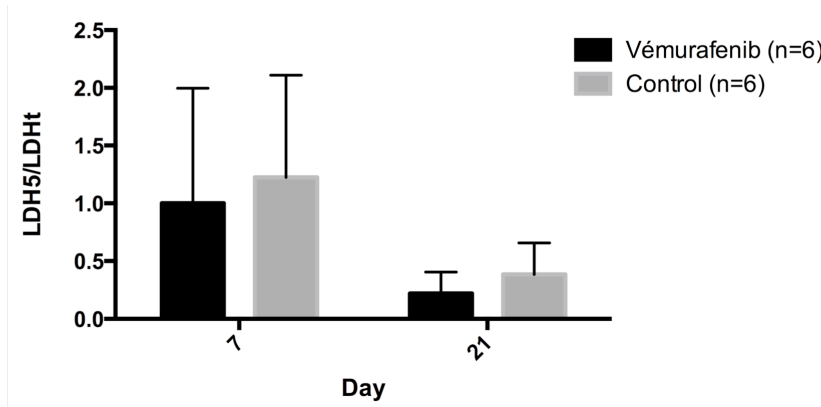


Figure 8 : Variation du ratio LDH5/LDHtotal à 7 jours post greffe et 21 jours post greffe. Il n'existe pas de variation significative du taux de LDH dans les deux groupes. En revanche la présence de LDH5 prouve la présence de tissu humain.

## **Discussion**

### **I. Originalité des modèles de xénogreffes issues directement de la tumeur du patient.**

Le coût du développement d'une molécule anticancéreuse est estimé à 800 millions de dollars. Pas moins de 10 ans sont nécessaires entre la conception d'un nouveau médicament et son autorisation de mise sur le marché (DiMasi et al., 2003). Les modèles murins ont toujours été très utilisés dans la recherche en cancérologie. Ils permettent d'apporter un niveau de connaissances et de preuves complémentaires aux investigations in vitro. 90% des molécules en développement ne seront pas testées chez l'Homme faute d'efficacité prouvée chez l'animal (Hoff, 1998). Les modèles les plus accessibles sont des xénogreffes de cellules issues de culture en laboratoire. Ces études visent à tester de nouvelles molécules sur l'animal avant les essais cliniques chez l'Homme. Si une première étape est franchie pour se rapprocher de l'Homme, ces modèles n'en restent pas moins des souris atteintes d'un cancer murin ou parfois humain. Cet éloignement explique les déceptions causées par le manque de reproductibilité et de fiabilité des études pré-cliniques. Les modèles murins ont montré alors toutes leurs faiblesses, s'exposant même parfois aux sarcasmes.

En effet les souris ne sont pas les Hommes et le microenvironnement tumoral est considéré comme de première importance dans la progression tumorale, le potentiel métastatique et la réponse aux traitements. De plus les cellules humaines greffées ne gardent pas toujours leurs caractéristiques géniques et moléculaires. Les cellules en culture subissent une pression de sélection et deviennent moins différenciées et plus homogènes que les cellules d'une tumeur de patient. De grandes revues rétrospectives du National Cancer Institute (2001) ou du National Cancer Institute of Canada (2003) arrivent aux mêmes conclusions : les traitements actifs sur les xénogreffes de cellules issues de culture sont rarement efficaces pour les patients atteints de la même tumeur.




Si les modèles murins ont certaines limites liées à l'éloignement de l'hôte et à la déviation génomique des cellules cancéreuses humaines greffées, pourquoi relancer des études sur les modèles murins en cancérologie ? De nouvelles approches thérapeutiques sont apparues, de nombreuses molécules ont été mises au point. Les schémas thérapeutiques se sont multipliés. La lutte contre le cancer se personnalise avec le développement des thérapies ciblées sur des anomalies moléculaires oncogéniques. Il faut pouvoir disposer de tissus tumoraux humains les plus proches possibles des tumeurs des patients à traiter. Les modèles animaux peuvent répondre à ces nouveaux besoins si ils sont encore raffinés.

On voit donc apparaître dans tout le champs de la cancérologie des propositions de modèles animaux de xénogreffes de tissu tumoral humain frais. Ils s'appuient sur des souches de souris immunodéficientes : majoritairement les souris nude ou souris SCID parfois NOD-SCID. La principale avancée de ces nouveaux modèles est la greffe immédiate de la tumeur humaine sans dissociation, sans passage par la culture cellulaire garantissant ainsi le maximum d'homologie entre la tumeur du patient et la xénogreffe. On peut trouver dans la littérature différentes terminologies ou néologismes pour définir ces nouveaux modèles : « Patient-Derived Tumor Xenograft » (PDX), « Patient-Derived Orthotopic Xenograft » (PDOX), « Tumorgraft », « in direct transfert » ou « explant » ou bien encore « avatar ». Tous les noms qui les désignent soulignent le caractère direct de la greffe pour une plus grande similitude entre la tumeur du patient et la xénogreffe de l'animal. Au Johns Hopkins Hospital, des chercheurs ont créé des xénogreffes de tumeurs pancréatiques dans la souris nude et tester 10 traitements connus ou innovants (Garber, 2007). De manière systématique depuis 2005, un fragment de tumeur est prélevé au cours du geste chirurgical de pancréatectomie. Des xénogreffes sont réalisées immédiatement avec un taux de prise d'environ 80%. Les tumeurs sont ensuite propagées sur 2 à 3 générations consécutives d'animaux puis incluses dans les différents protocoles thérapeutiques qui pourraient être proposés au patient en cas de rechute de la maladie. Au total 6 à 8 mois sont requis pour mener à bien ce protocole. Or les récurrences de cancer pancréatique surviennent en moyenne 9 à 12 mois après le traitement primaire. Ce calendrier permet d'avoir une réponse clinique fiable pour guider le choix du traitement de seconde ligne (Garber, 2009). Même si le modèle Hopkins semble satisfaisant, il est difficile de baser le traitement d'un patient sur des résultats obtenus à partir d'une

tumeur prélevée 6 à 9 mois auparavant. En effet on connaît l'extrême hétérogénéité des clones tumoraux et leur grande labilité au cours du temps. En particulier lorsqu'une métastase apparaît, ses caractéristiques génomiques et moléculaires sont très probablement différentes de celles de la tumeur primitive. Il est donc indispensable de pouvoir donner une réponse rapide et fiable sur un tissu le plus proche possible de celui que l'on veut combattre chez le patient.

Fiebig et al. en Allemagne travaillent dans ce sens depuis les années 1970. Dans une publication de 2004, leurs PDTX ont permis de prédire la réponse au traitement dans 90% des cas (19 sur 21 tumeurs) et ont prévu la résistance dans 97% des cas (57 sur 59)(Fiebig et al., 2004). L'équipe de Freiburg possède une très longue expérience des PDTX qui ont pu être développées sur 12 types de cancers différents dont le mélanome depuis 1988. Fiebig et al. cherchent à réduire le temps nécessaire pour donner au clinicien une réponse fiable concernant la réponse aux traitements des tumeurs. Des tests de monoclono-genicité sur les cellules souches tumorales isolées des PDTX permettent de rendre un résultat reproductible et fiable plus rapidement.

L'industrie s'empare également de ces outils et offre depuis peu de temps le service PDTX aux cliniciens. La Patient-Derived Orthotopic Xenograft ou PDOX™ est une marque déposée par un industriel d'animaux d'expérimentation animale. Il s'agit de préparer pour le client une banque de tumeurs prêtes à être amplifiées pour tester des traitements particuliers. Les arguments mis en avant sont la personnalisation du traitement et la rapidité de l'évaluation de la réponse au traitement guidée par des techniques d'imagerie.



**PDOX™ Patient-Derived  
Orthotopic Xenografts**

**Making treatment personal**

**A/C Patient Xenograft Services  
A Unit of AntiCancer, Inc.**

**PDOX™ now available for all patients**

**Inventors of PDOX™**

**25 years experience in PDOX™**

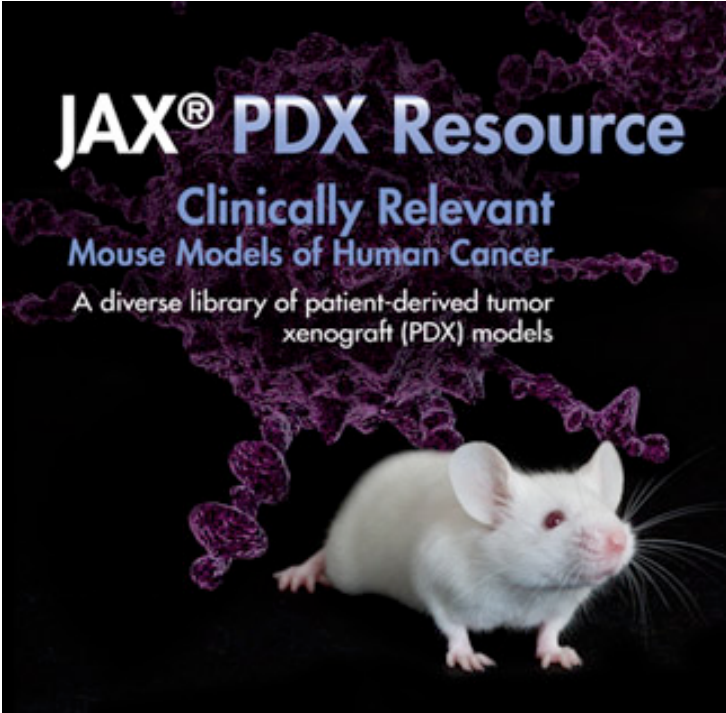
**400 pharmaceutical company contracts**

**Pharmaceutical company standard for  
patients not elsewhere available**

**PDOX™ models are Imageable for rapid  
drug evaluation**

**One of the worlds' leading cancer  
research labs with 600 scientific  
publications including 145 on mouse  
models of cancer and 150 patents**

**Economical**



**JAX® PDX Resource**

**Clinically Relevant  
Mouse Models of Human Cancer**

A diverse library of patient-derived tumor  
xenograft (PDX) models

Figure 24 : Deux propositions commerciales pour la production industrielle de Patient-Derived Tumor Xenograft (PDTX)

Il est important de concevoir un programme de PDTX à visée de recherche fondamentale ou clinique qui soit le plus complet et efficace possible. Ceci passe par la mise au point de techniques d'imagerie permettant l'évaluation précoce de la réponse aux traitements. Dans le cas du mélanome, la Tomographie à Emission de Positions (TEP) au  $^{18}\text{F}$ -FDG est un moyen peu invasif pour surveiller l'activité métabolique de la tumeur. Le mélanome fixe de manière intense le glucose et le marqueur analogue, le  $^{18}\text{F}$ -FDG, car il a un métabolisme glycolytique exacerbé. L'effet du traitement peut alors être mis en évidence avant de percevoir un changement sur la progression du volume tumoral.

Baudy et al. étudient les variations de fixation du  $^{18}\text{F}$ -FDG en TEP sur un modèle de mélanome muté BRAF V600E. Le modèle animal utilisé est une souris nude greffée

en sous-cutanée par des cellules de mélanomes issues de culture (A375). In vitro le Vémurafénib entraîne une diminution de la fixation de  $^{18}\text{F}$ FDG par les cellules BRAF mutées. A l'inverse, certaines tumeurs BRAF mutées se développant au sein du modèle animal et traitées au Vémurafénib ont augmenté leur fixation au  $^{18}\text{F}$ -FDG dès la première semaine de traitement (Baudy et al., 2012). Cette augmentation de 15% à 30% de la fixation de FDG est paradoxale. Il pourrait s'agir d'un effet prolifératif induit par le Vémurafénib et un métabolisme augmenté. Par ailleurs la même équipe montrent que l'imagerie TEP est aussi un bon marqueur de la résistance acquise au traitement.

D'autres modèles s'appuient sur l'imagerie en microIRM (Ovrebø et al., 2013). Une tumeur qui répond au traitement antiprolifératif peut ne pas varier de volume global mais être le siège d'une nécrose tissulaire difficile à analyser et quantifier in vivo. En imagerie du petit animal, la pondération T2 ne permet pas d'identifier précisément la nécrose au sein d'une masse tumorale. L'injection intraveineuse de Gadolinium n'améliore pas la précision des résultats. En revanche, plusieurs équipes ont montré l'intérêt de l'imagerie en IRM dynamique ou DCE-MRI (Dynamic Contrast Enhanced- Magnetic Resonance Imaging)(Gulliksrud et al., 2008 ; Egeland et al., 2011 ; Ovrebø et al., 2013). Un agent de contraste, le Gadolinium, est administré par voie intraveineuse en un bolus de 5,0 mL/kg. L'imagerie est réalisée avec une microIRM 1,5 Tesla sur un animal sédaté à l'isoflurane. Ce procédé d'imagerie fonctionnelle donne une bonne résolution de la perfusion tissulaire et donc de la nécrose intratumorale parfois en relation avec une réponse au traitement.

Dans le cas de modèles orthotopiques dont l'organe envahi par la tumeur est un organe profond, d'autres types d'imagerie ont été proposées. Il s'agit par exemple de l'échographie haute fréquence 3D pour l'évaluation et le suivi des métastases hépatiques. Les plus petites métastases détectables au sein du foie par cette technique ont un diamètre de 0,22 mm ce qui correspond à un volume d'environ 0,01 mm<sup>3</sup>. Il est précisé qu'une tumeur de 0,01 mm<sup>3</sup> est constituée d'environ 700 cellules de 15 µm organisées en sphère (Graham et al., 2005).

## **II. Les PDTX pour l'étude et la prise en charge du mélanome**

Dans le champs particulier du mélanome métastatique un outil préclinique aussi proche du patient possible est indispensable dans le contexte des nouvelles modalités thérapeutiques. En effet depuis peu de nouvelles propositions de traitement sont apparues, parmi elles les immunothérapies et les thérapies ciblées. Elles reposent sur une meilleure caractérisation moléculaire des tumeurs. 50% des mélanomes sont porteurs d'une mutation activatrice sur la voie de signalisation des MAPKinases : la mutation BRAF V600. Des inhibiteurs de BRAF sont aujourd'hui disponibles : le vémurafenib et la dabrafénib. Les schémas thérapeutiques sont multiples. Les modèles murins peuvent être une aide (i) pour mieux comprendre les mécanismes d'action et d'échappement de ces traitements, (ii) pour tester des alternatives thérapeutiques innovantes, (iii) pour trouver des biomarqueurs de la réponse au traitement, (iv) et pour guider le choix du clinicien dans les différentes options thérapeutiques.

Au laboratoire le travail sur un matériel le plus proche possible de la réalité clinique est primordial. Les PDTX restent hétérogènes et bien différenciées. Elles peuvent être maintenues dans plusieurs générations d'animaux successifs, une dizaine, sans perdre leurs caractéristiques histologiques, moléculaires et génétiques (Tentler et al., 2012 ; Fiebig et al., 2004). Pour identifier et faire la preuve de la valeur d'un biomarqueur, la PDTX donne l'avantage par rapport aux travaux cliniques d'être beaucoup plus disponible. Les expériences peuvent être répétées et les conditions contrôlées (Fichtner et al., 2008).

Si le premier modèle de xénogreffes de mélanome a été publié en 1950 (Greene, 1950), il n'existe pour autant que très peu de modèles de PDTX de mélanome. Une étude française a rapporté l'établissement et la caractérisation d'un modèle de PDTX de mélanome uvéal dans la souris SCID (Nemati et al., 2010). Dans cette étude, 90 fragments tumoraux différents de mélanomes uvéaux ont été greffés sur de souris SCID femelles. 73 fragments provenaient d'une énucléation contenant une tumeur primitive et 17 de l'excérèse d'une métastase. Les pièces tumorales fraîches ont été greffées en sous-cutané dans la région interscapulaire permettant un examen clinique régulier.

Après amplification tumorale dans 3 générations de souris consécutives, les xénogreffes, considérées comme stables, sont utilisées pour les protocoles de caractérisations et de test thérapeutiques. Sur les 90 tumeurs de patients prélevées, 25 ont abouti à une xénogreffe viable soit un taux de prise de 28%. Il est intéressant de noter que le taux de prise était plus important dans le sous-groupe de tumeurs issues de métastases (53%). Pour 4 tumeurs, deux chimiothérapies cytotoxiques ont été administrées : fotémustine (Muphoran®) et témozolomide (Temodal®). Trois d'entre elles ont répondu et une tumeur a continué de progresser. Ces résultats étaient similaires à l'évolution clinique observée chez les patients.

Nous avons publié le cas d'une patiente dont le traitement par l'anti-BRAF Vémurafénib a pu être réintroduit alors que l'impression clinique orientait vers une résistance secondaire de la tumeur. D'autres cas de réintroduction d'un inhibiteur antiBRAF ont été publiés (Seghers et al., 2012). Ces observations permettent de proposer des traitements séquentiels dans une approche similaire au traitement par anti-EGFR (Gefitinib et Erlotinib) des cancers du poumon non à petites cellules (Chmielecki et al., 2011). L'hypothèse de ce nouveau concept d'administration séquentielle est basée sur la progression plus rapide des clones sensibles sous chimiothérapie standard. Ainsi lorsque le premier traitement par anti-EGFR n'est cliniquement plus efficace, des contingents hétérogènes de tumeur persistent : certains sont des clones encore sensibles et d'autres sont devenus résistants. Sous une chimiothérapie de seconde ligne, ces clones sensibles à l'anti-EGFR prolifèrent plus rapidement que les résistants. Alors les clones sensibles redeviennent plus nombreux que les résistants et la réintroduction de l'anti-EGFR est à nouveau efficace cliniquement (Oxnard et al., 2011).

Les PDTX pourraient être l'outil idéal pour établir un véritable tumorogramme du cancer à traiter. En effet on pourrait faire un parallèle entre la cellule cancéreuse et les bactéries, virus ou autres agents pathogènes, tous capables de mutations et d'adaptation face à la pression des traitements. A quelle thérapie ciblée ou à quelle association médicamenteuse, le mélanome d'un patient particulier est-il « sensible » ? Une cohorte de souris toutes xénogreffées directement à partir d'un fragment tumoral du patient permettrait de répondre à de telles questions cliniques. Depuis 2005 le modèle Hopkins tente de remplir cette mission pour le cancer du pancréas. Dans le

contexte de la prise en charge du mélanome, l'évolution au stade métastatique est parfois très rapide. Il faut donc développer des outils (biomarqueurs, imagerie) pour raccourcir le délai de réponse des PDTX à différents traitements. Dans notre expérience, la réintroduction du vémurafénib (inhibiteur de BRAF) a eu un effet clinique positif alors que la patiente semblait résistante quelques mois plus tôt. Sidransky et al. ont publié le cas similaire d'un patient traité d'un cancer du pancréas (Olive et al., 2009). La PDTX a permis dans ce cas d'identifier précocément la résistance au traitement de première intention, la gemcitabine. Une molécule moins utilisée, la mitomycine C a montré son efficacité sur le modèle animal permettant de traiter le patient rapidement et efficacement pendant 2 ans.

### III. Les limites des modèles de PDTX

Les PDTX ont toutefois des limites techniques et économiques. Le taux d'échec de transplantation peut être important pour certaines tumeurs. Dans la large expérience de Fiebig, les taux de prise pour le cancer du colon, le cancer du poumon non à petites cellules et le mélanome culminent à 40% à 60%. Pour le cancer du sein ce taux baisse à 12%-20%. Il n'est plus que de 3% pour le cancer de la prostate (Fiebig et al., 2004). Dans le modèle proposé par Nemati et al. les taux de prise des mélanomes uvéaux sont également très bas (28%) (Némati et al., 2010).

Notre taux de prise sur une série de 7 patients différents prélevés et 58 xénogreffes a été de 91%. Nous expliquons ce bon taux de prise par la rapidité de la mise en place de la tumeur dans l'animal. Une bonne coordination des équipes chirurgicales et de laboratoire permet une xénogreffe dans l'heure qui suit l'exérèse au bloc opératoire. La tumeur est conservée à 4°C puis greffée en sous-cutanée en présence d'une pseudo-membrane basale (BD Matrigel). Le choix du degré d'immunodéficience impacte également le taux de prise. Nous utilisons des souris de souche SCID qui ne possèdent ni lymphocytes B, ni lymphocytes T. Ces souris sont plus immunodéprimées que les souris nude. Elles sont malgré tout assez robustes pour supporter les traitements et les investigations complémentaires comme un prélèvement sanguin hebdomadaire pour la recherche de biomarqueurs (LDH et ses isoformes) ou un examen en TEP au <sup>18</sup>F-FDG.

Par ailleurs le facteur temps peut également être un frein à l'utilisation de tels outils. Nous estimons à environ 1 mois la prise et la croissance significative de la xénogreffe dans la première génération de souris greffées. Mais d'autres équipes décrivent des temps plus long encore : de 2 mois à 4 mois (Morton, Houghton, 2007). Pour d'autres encore il faudrait attendre 6 mois pour conclure que la prise de la xénogreffe a échoué (Jin et al., 2010). Il est souvent indispensable d'amplifier le nombre de souris du fait de la relative faible quantité de matériel tumoral disponible chez le patient. Cette amplification est réalisée sur 2 à 3 générations successives d'animaux. Dans le modèle du John Hopkins Hospital, 9 mois sont nécessaires pour mener la totalité du protocole sur des PDTX de cancer du pancréas (Garber, 2009). On



remarque, comme l'a souligné Tentler et al. (Tentler et al., 2012), que la croissance tumorale est plus rapide dans la 2<sup>e</sup> génération que dans la première et encore plus rapide dans la troisième.

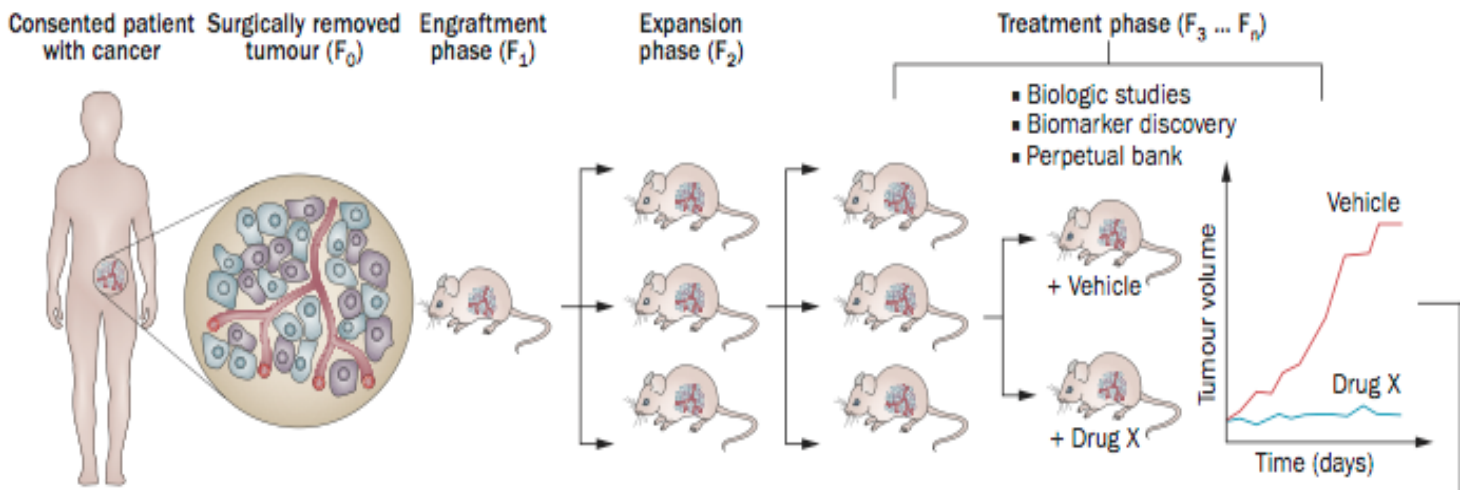


Figure 25 : Amplification de la tumeur dans 2 à 3 générations de souris successives. La phase de traitement ne peut commencer que 2 à 3 mois en moyenne après le prélèvement de la tumeur sur le patient (Baudy et al., 2012)

Au total il faut au minimum 6 à 8 semaines et en moyenne 2 à 3 mois pour obtenir une cohorte suffisante d'animaux. Il faut ensuite traiter les animaux 10 à 20 jours pour évaluer la réponse au traitement. Pour une utilisation clinique, la réponse au traitement peut être définie au minimum 3 mois après le prélèvement des fragments tumoraux chez le patient.

Ce facteur temps peut parfois être réduit. La cohorte initiale d'animaux greffés (F<sub>0</sub>) peut parfois être importante d'emblée si le matériel tumoral est disponible. Pour réaliser une xéno greffe on estime que 200 mm<sup>3</sup> de tissu tumoral suffisent. A partir d'un nodule de perméation de 1 cm de diamètre, 2 souris peuvent être greffées. Certains patients présentent d'emblée de très nombreux nodules accessibles à une exérèse simple. On estime qu'il faut environ 10 animaux xéno greffés pour fournir une réponse

fiable quant à la réponse au traitement. Une autre manière de réduire ce facteur temps est l'imagerie fonctionnelle par TEP ou DCE-MRI ou d'autres biomarqueurs.

La mise en place et l'utilisation en clinique d'une telle approche nécessite beaucoup de temps de manipulation. L'organisation logistique est primordiale. Elle commence par une excellente coordination de l'équipe chirurgicale qui réalise l'excision de la tumeur et celle qui réalise la xénogreffe dans l'animal. Pour améliorer le taux de prise de greffes, le temps pour réaliser la xénogreffe doit être le plus court possible. Au sein d'une équipe entraînée on estime à une heure ce temps de manipulation initiale. Lorsque les tumeurs ont atteint un volume significatif d'environ 400 mm<sup>3</sup>, les animaux sont traités. Certains traitements sont administrés par voie intraveineuse deux fois par jour tous les jours pendant 20 jours. Traiter 5 souris par voie intra-veineuse demande une heure de manipulation en routine. Ces exemples concrets illustrent bien les limites d'une utilisation des PDTX à grande échelle.

Il est évident que ce type d'approche personnalisée du traitement anticancéreux est non seulement très coûteux en terme de temps mais aussi financièrement. Les souris employées pour une PDTX sont immunodéficientes pour tolérer la xénogreffe d'un tissu tumoral humain. Les animaux utilisés sont produits industriellement de façon très contrôlée afin de leur garantir un statut sanitaire exempt de tout pathogène (statut Specific and Opportunistic Pathogen Free ou SOPF). Ils sont stabulés dans des milieux stériles et clos. Ils sont nourris avec des aliments irradiés. Les animaleries qui peuvent les accueillir sont soumises à des contrôles stricts et réguliers de leur statut sanitaire. L'ensemble de cet environnement est bien sûr très coûteux.

Par ailleurs il est important de noter que les PDTX ne peuvent pas répondre à une des grandes problématiques fondamentales et cliniques : le rôle du système immunitaire dans la lutte contre le cancer. En effet les PDTX sont basées sur l'emploi d'animaux immunodéficients afin qu'ils puissent tolérer la xénogreffe d'un tissu humain. Or le système immunitaire joue un rôle très important dans la lutte contre la maladie. De plus certaines approches thérapeutiques s'appuient sur ce système immunitaire pour détruire la tumeur. Il s'agit des immunothérapies, largement développées, notamment dans le traitement du mélanome : les cytokines comme l'interféron ou l'interleukine 2, les vaccins ou encore les anticorps monoclonaux tels que l'ipilimumab. L'ipilimumab est le premier anti-corps anti-CTLA-4 ayant permis une

augmentation de la durée de survie dans plusieurs essais randomisés (Hodi et al., 2010 ; Robert et al., 2011 ; Attia et al., 2005). Le taux de réponse n'est que d'environ 15%, mais des durées de rémissions remarquables ont été rapportées chez des patients en stade IV. Aux Etats-Unis l'ipilimumab est autorisé en première ligne.

## **IV. Les limites des modèles développés dans ce travail**

Aux inconvénients intrinsèques des PDTX déjà développés de manière générale, deux autres limites des modèles mis en place par ce travail doivent être soulignées.

Tout d'abord nos modèles de PDTX ne sont pas métastatiques spontanément. Ils utilisent du matériel tumoral issu de métastases cutanées ou sous-cutanées de mélanome. Ce tissu est ensuite xéno greffé en sous-cutané dans la souris SCID. Dans notre expérience de PDTX nous n'avons jamais retrouvé de métastases dans les organes examinés après euthanasie de l'animal. Il faut noter que le temps d'évolution de la maladie dans l'animal n'est que de quelques semaines, environ 6 à 8 semaines. Pour voir apparaître des métastases spontanées le temps minimum nécessaire est de l'ordre de 3 mois (Welch, 1997).

Nous avons en revanche pu obtenir des métastases induites par injection intraveineuse de cellules tumorales. Ces cellules sont piégées dans la microcirculation pulmonaire et on a pu ainsi mettre en évidence des métastases pulmonaires. Pour autant ce type de modèle de métastases induites n'est pas pertinent pour le suivi de l'évolution d'un patient. Il pourrait l'être si on cherchait à évaluer l'efficacité d'un traitement sur une métastase localisée à un organe particulier pour un patient particulier. On pourrait alors construire une PDTX ayant une métastase hépatique, pulmonaire, cérébrale ou une carcinose péritonéale. Ce type de PDTX est réalisable par les techniques de métastases induites décrites par de nombreux auteurs. Le modèle le plus répandu est l'injection de cellules tumorales dans la circulation sanguine par la veine caudale de l'animal. Dans ce cas les métastases sont principalement localisées au poumon par un phénomène mécanique de piègeage des cellules dans le lit capillaire pulmonaire. Curieusement les métastases dans ce type de modèle ne sont pas toujours reproductibles et le taux d'échec est important (Welch, 1997). D'autres méthodes ont été proposées pour obtenir des modèles métastatiques. Des cellules tumorales peuvent être injectées dans la circulation portale pour favoriser les métastases hépatiques ou dans le ventricule gauche pour cibler l'os. L'injection intra-splénique est plus simple que le cathétérisme de la veine porte ou de la veine mésentérique pour envoyer les cellules coloniser le foie. Le modèle présenté par Kuo et al. est une injection

intrasplénique de 5 millions de cellules COL-2-JCK en intrasplénique. Les cellules tumorales humaines injectées sont issues d'une sélection métastatique dans plusieurs générations de souris nude (Kuo et al., 1993). L'injection intra-carotidienne peut favoriser l'émergence de métastases cérébrales (Schackert, Fidler, 1988). Certains miment une dissémination métastatique par injection directe par voie transcutanée dans le parenchyme hépatique (L Chen et al., 1998) ou pulmonaire, dans la cavité pleurale ou péritonéale, dans le cerveau (Randazzo et al., 1995) ou la moelle osseuse. La morbidité est importante et la reproductibilité difficile (Liu, Hicklin, 2011). Dans le cas de métastases spontanées, les cellules greffées ont été sélectionnées dans plusieurs générations successives d'animaux. Seuls les clones à haut pouvoir métastatique sont conservés et amplifiés (Man et al., 2007). Cette approche, certes utile pour l'étude des mécanismes métastatiques, ne reflète pas l'hétérogénéité tumorale toujours retrouvée chez le patient. Ce type de modèle est trop éloigné de la réalité du patient pour répondre à des réponses cliniques de médecine personnalisée.

Par ailleurs nos modèles ne sont pas capables de prédire la toxicité et la tolérance aux traitements administrés. Ainsi un des effets indésirables majeurs des inhibiteurs de BRAF récemment développés (Vémurafénib) est l'augmentation de l'incidence de carcinomes épidermoïdes cutanés (Su et al., 2012). Grâce à un modèle murin de tumeur cutanée publié préalablement (Abel et al., 2009), Su et al. montrent que l'inhibition de BRAF active paradoxalement la voie des MAPKinases et aboutit à l'augmentation des mutations HRAS-Q61L dans les kératinocytes (Su et al., 2012). Le modèle utilisé a été mis au point par l'équipe de Abel et al. Il s'agit d'un modèle de carcinome épidermoïde induit par l'exposition séquentielle à plusieurs carcinogènes cutanés. Su et al. indiquent que le vémurafenib joue le rôle d'un potentialisateur chez les individus prédisposés. Ceci explique que cette complication ne soit retrouvée que dans la sous-population des patients traités.

## **V. Les alternatives à l'utilisation de modèles murins en pratique clinique**

L'utilisation des PDTX à grande échelle en pratique clinique courante semble illusoire tant sur le plan financier que sur la disponibilité technique des équipes. Il est important d'en cibler les indications et de développer des alternatives.

La caractérisation des tumeurs en biologie moléculaire a permis d'identifier un grand nombre de types tumoraux très différents alors qu'ils se développent dans le même organe et parfois sous le même aspect histologique. Cette connaissance approfondie des cellules cancéreuses a conduit à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Les stratégies de traitement sont devenues multiples. Il est donc indispensable de pouvoir préciser les indications. L'identification de biomarqueurs fiables est cruciale. Ces biomarqueurs peuvent être définis en biologie moléculaire par certaines mutations oncogéniques du tissu tumoral lui-même.

Il s'agit par exemple de la mutation BRAF V600E qui s'accompagne couramment d'une réponse clinique aux inhibiteurs de BRAF comme le Vémurafénib. De la même manière dans le cancer du colon, il a été montré que les tumeurs présentant une amplification de HER2 étaient résistantes au cetuximab et que l'association d'un anti-HER2 au cetuximab pouvait mener à une régression tumorale (Bertotti et al., 2011).

Le biomarqueur peut également être détecté dans le serum de l'animal. L'activité sérique élevée de la Lactate Déshydrogénase est un facteur pronostic défavorable dans le cadre de la surveillance d'un mélanome métastatique. Cette activité LDH pourrait être un marqueur de réponse au traitement. Cette hypothèse n'est pas démontrée actuellement. Pour le suivi des métastases hépatiques d'un cancer du colon, l'équipe de Kuo fait la même hypothèse. Ils indiquent que l'isoforme LDH5 détectée dans le serum de souris SCID développant ces métastases augmente avec le nombre et le volume des métastases hépatiques (Kuo et al., 1993).

Dans certains types de cancers, le tissu tumoral sécrète des antigènes circulant dans le sang. Ces derniers sont alors de bons biomarqueurs pour la surveillance et l'évaluation de la réponse au traitement. C'est le cas du PSA dont le taux sérique

augmente lors de la progression d'un cancer de la prostate. Un biomarqueur spécifique d'un cancer, peut également être dévoyé et permettre le suivi d'une tumeur d'un autre type histologique. C'est le cas d'un modèle mis au point par Conway et al. Il s'agit de cellules tumorales issues d'un cancer du poumon dans le génome desquelles a été transfecté le gène codant pour l'antigène PSA humain (Conway et al., 2000). Le taux sérique de PSA a augmenté parallèlement avec le volume des tumeurs sous-cutanées et des métastases induites par injection dans la circulation veineuse.

## **VI. Place et indication des modèles murins dans le traitement des mélanomes métastatiques**

La possibilité de développer des modèles de PDTX est un atout indéniable pour la recherche fondamentale, la recherche pré-clinique et la prise en charge des patients en situation métastatique. Toutefois les limites de ce type d'approche nous obligent à définir précisément les indications de l'utilisation d'un tel outil.

En recherche fondamentale les PDTX sont une amélioration très positive des modèles de xénogreffes à partir de cellules issues de culture. Les PDTX sont un meilleur reflet du tissu tumoral des patients. Ils conservent en particulier le tissu stromal qui les entourent et leur capacité d'interaction avec leur microenvironnement. Par ailleurs l'établissement d'une PDTX permet d'amplifier le tissu tumoral d'un patient sans passer par la culture cellulaire. Nous possédons un modèle PDTX d'un patient dont le mélanome métastatique est porteur de la double mutation C-KIT et BRAF. Dans certaines études de caractérisation, il est important de réaliser de très nombreux essais et le matériel tumoral directement issu de patient est limité. A partir de 102 prélèvements tumoraux de patients, Fichtner et al. parviennent à établir 25 PDTX de cancer du poumon non-à-petites cellules. Ce matériel hétérogène leur permet d'identifier des biomarqueurs de la réponse tumorale à différents anti-EGFR. Les conditions sont multiples et peuvent être répétées de très nombreuses fois. Ceci n'aurait pas été possible à partir des fragments de tumeurs initialement prélevés chez le patient (Fichtner et al., 2008).

Une nouvelle utilisation des PDTX pour une médecine plus personnalisée serait l'aide au choix des traitements proposés au patient. La preuve du concept a été faite par notre étude présentant une PDTX permettant la réintroduction du Vémurafénib alors que la patiente avait évolué sous ce même traitement quelques mois plus tôt. Cette même démonstration a été publiée par Sidransky et al. à propos d'un patient traité d'un cancer du pancréas (Olive et al., 2009). La PDTX a mené dans ce cas à l'identification précoce de la résistance au traitement de première intention, la



gemcitabine. Une molécule moins utilisée, la mitomycine C a montré son efficacité sur le modèle animal permettant de traiter le patient rapidement et efficacement pendant 2 ans.

Dans cette indication il nous semble indispensable de bien sélectionner les patients éligibles à une PDTX.

Un des critères est la vitesse de progression de la maladie métastatique. Il est en effet illusoire de pouvoir donner une réponse clinique en moins de 3 mois avec l'aide d'une PDTX. Il faut donc choisir des patients dont la maladie semble progresser lentement.

De plus il est indispensable de pouvoir prélever du tissu tumoral facilement et en quantité suffisante. L'exérèse doit être acceptée par le patient sans difficulté. C'est souvent le cas des nodules de perméation qui deviennent douloureux et dont l'exérèse – suture est possible sous anesthésie locale sans préjudice physique pour le patient. Le volume tumoral prélevable doit être supérieur à 1 cm<sup>3</sup> pour espérer pouvoir xénotransplanter avec succès 2 souris.

Enfin le patient ne doit pas être éligible à un traitement par immunothérapies car ces approches thérapeutiques ne sont pas transposables aux animaux immunodéficients.

## **Conclusion**

En premier lieu, notre travail a eu pour objectif la mise au point de modèles murins de xénogreffes de tumeurs humaines de mélanome. Le développement de tels modèles implique tout d'abord le choix d'une souche de souris immunodéficientes. Il s'agit d'un compromis entre la relative robustesse de l'animal face aux infections et sa capacité à tolérer les tumeurs humaines greffées. Après quelques xénogreffes chez la souris NMRI-Nude et selon les données de la littérature, notre choix définitif s'est porté sur la souche CB17-SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency). Les liens étroits entre le bloc opératoire et le laboratoire ainsi que l'adjonction d'une pseudo-membrane basale Matrigel® nous permettent d'obtenir un taux de prise de greffe d'environ 90%.

Ces modèles nous ont apporté une plus value dans la validation de nouvelles approches thérapeutiques face au mélanome métastatique. Une association thérapeutique innovante, efficace in vitro, a pu être testée in vivo sur des tumeurs issues de lignées cellulaires établies d'une part, et sur des tumeurs de patients suivis dans notre centre d'autre part. Il s'agit d'une approche métabolique du traitement du mélanome métastatique. En effet le mélanome est une tumeur très glycolytique dont le métabolisme mitochondrial est switché aux dépens de la glycolyse anaérobie. In vitro, l'effet du DichloroAcétate (DCA) a montré sa capacité à accélérer la phosphorylation mitochondriale des cellules de mélanomes. L'adjonction d'une molécule pro-oxydante, l'elesclomol, a un effet synergique menant à la mort par apoptose des cellules tumorales. Un modèle murin de PDTX a confirmé l'effet antitumoral de cette association in vivo.

Enfin le modèle de PDTX, établi en lien étroit avec la clinique de dermatologie et le service de chirurgie plastique, a montré toute sa place dans le suivi et l'orientation thérapeutique de quelques patients. Cette indication ciblée a notamment donné l'opportunité au clinicien de réintroduire un inhibiteur antiBRAF, le Vémurafénib chez une patiente dont l'évolution clinique était en faveur d'un échappement tumoral à ce traitement.

## **Perspectives**

La phase initiale de mise au point technique des xénogreffes de cellules puis de tumeurs directement issues de patients a fait l'objet de notre travail. Nous avons pu proposer des applications concrètes tant sur le plan de la recherche fondamentale que sur les indications cliniques.

Ce travail initié en 2009 doit être poursuivi de manière plus systématisée et à plus grande échelle. Les patients pouvant bénéficier de cet outil thérapeutique original et novateur doivent être sélectionnés sur des critères cliniques précis par notre équipe médico-chirurgicale. Le statut métastatique, le nombre et la localisation des métastases doivent permettre d'inclure les patients éligibles. En effet les métastases sous-cutanées doivent être en assez grand nombre et situées dans des localisations anatomiques permettant une exérèse chirurgicale simple. Le performans status du patient doit être bon pour que les délais de construction du modèle murin soient compatibles avec la survie du patient. Le modèle permettra alors de guider l'orientation vers une seconde ligne de traitement en cas de récurrence.

Le nombre de patients suivis à l'aide de PDTX doit être compatible avec les possibilités financières et humaines du laboratoire. Un technicien ou un chercheur doivent être présents chaque jour pour l'administration biquotidienne de certains traitements. Un financement pérenne devrait être dégagé au même titre que pour l'imagerie métabolique ou la recherche de biomarqueurs moléculaires.

Enfin ces modèles doivent rester à la disposition des chercheurs pour valider des hypothèses plus fondamentales et donner plus de poids aux avancées de la connaissance sur le comportement des mélanomes métastatiques, les nouvelles molécules développées et les mécanismes de résistance aux différents traitements.

## **Références Bibliographiques**

AAMDAL, S, FODSTAD, O et PIHL, A, 1984. Human tumor xenografts transplanted under the renal capsule of conventional mice. Growth rates and host immune response. In : *International Journal of Cancer*. 15 novembre 1984. Vol. 34, n° 5, p. 725–730.

AAMDAL, S, FODSTAD, O et PIHL, A, 1985. The six-day subrenal capsule assay (SRCA) for testing the response of human tumours to anticancer agents. Validity and usefulness in cancer research and treatment. In : *Ann Chir Gynaecol Suppl*. 1985. Vol. 199, p. 51–59–59.

ABEL, Erika L, ANGEL, Joe M, KIGUCHI, Kaoru et DIGIOVANNI, John, 2009. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications. In : *Nature protocols*. 27 août 2009. Vol. 4, n° 9, p. 1350–1362. DOI 10.1038/nprot.2009.120.

AGARWALA, Sanjiv, 2003. Improving survival in patients with high-risk and metastatic melanoma: immunotherapy leads the way. In : *American journal of clinical dermatology*. 2003. Vol. 4, n° 5, p. 333–346.

ALEXANDRESCU, Doru T, ICHIM, Thomas E, RIORDAN, Neil H, MARINCOLA, Francesco M, DI NARDO, Anna, KABIGTING, Filamer D et DASANU, Constantin A, 2010. Immunotherapy for Melanoma: Current Status and Perspectives. In : *Journal of Immunotherapy*. juillet 2010. Vol. 33, n° 6, p. 570–590. DOI 10.1097/CJI.0b013e3181e032e8.

ALLEN, I E, KUPELNICK, B, KUMASHIRO, M, LUO, D et ROSS, S D, 1998. Efficacy of interleukin-2 in the treatment of metastatic melanoma: systematic review and meta-analysis. In : *Cancer Ther*. 1998. Vol. 1, p. 168–173.

ANDERS, F, SCHARTL, M, BARNEKOW, A et ANDERS, A, 1984. Xiphophorus as an in vivo model for studies on normal and defective control of oncogenes. In : *Advances in cancer research*. 1984. Vol. 42, p. 191–275.

ARGUELLO, F, STERRY, J A, ZHAO, Y Z, ALEXANDER, M R, SHOEMAKER, R H et COHEN, H J, 1996. Two serologic markers to monitor the engraftment, growth, and treatment response of human leukemias in severe combined immunodeficient mice. In : *Blood*. 15 mai 1996. Vol. 87, n° 10, p. 4325–4332.

ARMSTRONG, Bruce K et KRICKER, Anne, 2001a. Chapter 7 The epidemiology of solar radiation and skin cancer. In : *Comprehensive Series in Photosciences*. S.l. : Elsevier. Comprehensive Series in Photosciences. p. 131–153.

ARMSTRONG, Bruce K et KRICKER, Anne, 2001b. The epidemiology of UV induced skin cancer. In : *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001b. Vol. 63, n° 1, p. 8–18.

ARONSOHN, M G et CARPENTER, J L, 1990. Distal extremity melanocytic nevi and malignant melanomas in dogs. In : *Journal of the American Animal Hospital Association*.

1990. Vol. 26, n° 6, p. 605–612.

ASCIERTO, Paolo A, GOGAS, Helen J, GROB, Jean-Jacques, ALGARRA, Salvador Martín, MOHR, Peter, HANSSON, Johan et HAUSCHILD, Axel, 2013. Adjuvant interferon alfa in malignant melanoma: an interdisciplinary and multinational expert review. In : *Critical reviews in oncology/hematology*. février 2013. Vol. 85, n° 2, p. 149–161.

DOI 10.1016/j.critrevonc.2012.07.004.

ASCIERTO, Paolo A, NAPOLITANO, Maria, CELENTANO, Egidio, SIMEONE, Ester, GENTILCORE, Giusy, DAPONTE, Antonio, CAPONE, Mariaelena, CARACÒ, Corrado, CALEMMMA, Rosa, BENEDEUCE, Gerardo, CERRONE, Margherita, DE ROSA, Vincenzo, PALMIERI, Giuseppe, CASTELLO, Giuseppe, KIRKWOOD, John M, MARINCOLA, Francesco M et MOZZILLO, Nicola, 2010. Regulatory T cell frequency in patients with melanoma with different disease stage and course, and modulating effects of high-dose interferon-alpha 2b treatment. In : *Journal of translational medicine*. 2010. Vol. 8, p. 76. DOI 10.1186/1479-5876-8-76.

ATKINS, M B, KUNKEL, L, SZNOL, M et ROSENBERG, S A, 2000. High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. In : *The cancer journal from Scientific American*. février 2000. Vol. 6 Suppl 1, p. S11–4.

ATTIA, Peter, PHAN, Giao Q, MAKER, Ajay V, ROBINSON, Michael R, QUEZADO, Martha M, YANG, James C, SHERRY, Richard M, TOPALIAN, Suzanne L, KAMMULA, Udai S, ROYAL, Richard E, RESTIFO, Nicholas P, HAWORTH, Leah R, LEVY, Catherine, MAVROUKAKIS, Sharon A, NICHOL, Geoff, YELLIN, Michael J et ROSENBERG, Steven A, 2005. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1 septembre 2005. Vol. 23, n° 25, p. 6043–6053. DOI 10.1200/JCO.2005.06.205.

BALCH, C M, SOONG, S J, GERSHENWALD, J E, THOMPSON, J F, REINTGEN, D S, CASCINELLI, N, URIST, M, MCMASTERS, K M, ROSS, M I, KIRKWOOD, J M, ATKINS, M B, THOMPSON, J A, COIT, D G, BYRD, D, DESMOND, R, ZHANG, Y, LIU, P Y, LYMAN, G H et MORABITO, A, 2001. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. In : *Journal of Clinical Oncology*. 15 août 2001. Vol. 19, n° 16, p. 3622–3634.

BALCH, Charles M, GERSHENWALD, Jeffrey E, SOONG, Seng-jaw, THOMPSON, John F, ATKINS, Michael B, BYRD, David R, BUZAID, Antonio C, COCHRAN, Alistair J, COIT, Daniel G, DING, Shouluan, EGGERMONT, Alexander M, FLAHERTY, Keith T, GIMOTTY, Phyllis A, KIRKWOOD, John M, MCMASTERS, Kelly M, MIHM, Martin C, MORTON, Donald L, ROSS, Merrick I, SOBER, Arthur J et SONDAK, Vernon K, 2009. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 20 décembre 2009. Vol. 27, n° 36, p. 6199–6206. DOI 10.1200/JCO.2009.23.4799.

BASEL, Matthew T, BALIVADA, Sivasai, BECK, Amanda P, KERRIGAN, Maureen A, PYLE, Marla M, DEKKERS, Jack C M, WYATT, Carol R, ROWLAND, Robert R R, ANDERSON, David E, BOSSMANN, Stefan H et TROYER, Deryl L, 2012. Human xenografts are not

rejected in a naturally occurring immunodeficient porcine line: a human tumor model in pigs. In : *BioResearch open access*. avril 2012. Vol. 1, n° 2, p. 63–68. DOI 10.1089/biores.2012.9902.

BAUDY, Andreas R, DOGAN, Taner, FLORES-MERCADO, Judith E, HOEFLICH, Klaus P, SU, Fei, VAN BRUGGEN, Nicholas et WILLIAMS, Simon-Peter, 2012. FDG-PET is a good biomarker of both early response and acquired resistance in BRAFV600 mutant melanomas treated with vemurafenib and the MEK inhibitor GDC-0973. In : *EJNMMI research*. 2012. Vol. 2, n° 1, p. 22. DOI 10.1186/2191-219X-2-22.

BAURAIN, Jean-François, VAN DER BRUGGEN, Pierre, VAN DEN EYNDE, Benoît J, COULIE, Pierre G et VAN BAREN, Nicolas, 2008. [General principles and first clinical trials of therapeutic vaccines against cancer]. In : *Bulletin du Cancer*. mars 2008. Vol. 95, n° 3, p. 327–335. DOI 10.1684/bdc.2008.0588.

BEDIKIAN, A Y, DECONTI, R C, CONRY, R, AGARWALA, S, PAPADOPOULOS, N, KIM, K B et ERNSTOFF, M, 2011. Phase 3 study of docosahexaenoic acid-paclitaxel versus dacarbazine in patients with metastatic malignant melanoma. In : *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* [en ligne]. avril 2011. Vol. 22, n° 4, p. 787–793. DOI 10.1093/annonc/mdq438. Disponible à l'adresse : <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=20855467&retmode=ref&cmd=prlinks>.

BEDIKIAN, Agop Y, MILLWARD, Michael, PEHAMBERGER, Hubert, CONRY, Robert, GORE, Martin, TREFZER, Uwe, PAVLICK, Anna C, DECONTI, Ronald, HERSH, Evan M, HERSEY, Peter, KIRKWOOD, John M, HALUSKA, Frank GOBLIMERSEN MELANOMA STUDY GROUP, 2006. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 10 octobre 2006. Vol. 24, n° 29, p. 4738–4745. DOI 10.1200/JCO.2006.06.0483.

BELUM, Viswanath Reddy, FISCHER, Alyssa, CHOI, Jennifer Nam et LACOUTURE, Mario E, 2013. Dermatological adverse events from BRAF inhibitors: a growing problem. In : *Current oncology reports*. juin 2013. Vol. 15, n° 3, p. 249–259. DOI 10.1007/s11912-013-0308-6.

BENTON, Gabriel, KLEINMAN, Hynda K, GEORGE, Jay et ARNAOUTOVA, Irina, 2011. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. In : *International Journal of Cancer*. 15 avril 2011. Vol. 128, n° 8, p. 1751–1757. DOI 10.1002/ijc.25781.

BERKELHAMMER, J, OXENHANDLER, R W, HOOK, R R et HENNESSY, J M, 1982. Development of a new melanoma model in C57BL/6 mice. In : *Cancer Research*. août 1982. Vol. 42, n° 8, p. 3157–3163.

BERTOTTI, A, MIGLIARDI, G, GALIMI, F, SASSI, F, TORTI, D, ISELLA, C, CORA, D, DI NICOLANTONIO, F, BUSCARINO, M, PETTI, C, RIBERO, D, RUSSOLILLO, N, MURATORE, A, MASSUCCO, P, PISACANE, A, MOLINARO, L, VALTORTA, E, SARTORE-BIANCHI, A, RISIO, M, CAPUSSOTTI, L, GAMBACORTA, M, SIENA, S, MEDICO, E, SAPINO, A, MARSONI, S, COMOGLIO, P M, BARDELLI, A et TRUSOLINO, L, 2011. A Molecularly

Annotated Platform of Patient-Derived Xenografts (« Xenopatient ») Identifies HER2 as an Effective Therapeutic Target in Cetuximab-Resistant Colorectal Cancer. In : *Cancer Discovery*. 16 novembre 2011. Vol. 1, n° 6, p. 508–523. DOI 10.1158/2159-8290.CD-11-0109.

BHATT, Kavita V, SPOFFORD, Laurie S, ARAM, Gazelle, MCMULLEN, Meghan, PUMIGLIA, Kevin et APLIN, Andrew E, 2005. Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling. In : *Oncogene*. 12 mai 2005. Vol. 24, n° 21, p. 3459–3471. DOI 10.1038/sj.onc.1208544.

BISHOP, Julia Newton, HARLAND, Mark, RANDERSON-MOOR, Juliette et BISHOP, D Timothy, 2007. Management of familial melanoma. In : *The lancet oncology*. 2007. Vol. 8, n° 1, p. 46–54.

BLEEHEN, N M, NEWLANDS, E S, LEE, S M, THATCHER, N, SELBY, P, CALVERT, A H, RUSTIN, G J, BRAMPTON, M et STEVENS, M F, 1995. Cancer Research Campaign phase II trial of temozolomide in metastatic melanoma. In : *Journal of Clinical Oncology*. avril 1995. Vol. 13, n° 4, p. 910–913.

BOAZIZ, C, BREAU, J L, MORERE, J F et ISRAËL, L, 1991. [Brain metastases of malignant melanomas]. In : *Bulletin du Cancer*. 1991. Vol. 78, n° 4, p. 347–353.

BOGDEN, A E, 1985. The subrenal capsule assay (SRCA) and its predictive value in oncology. In : *Annales chirurgiae et gynaecologiae Supplementum*. 1985. Vol. 199, p. 12–27.

BONIOL, M, AUTIER, P, BOYLE, P et GANDINI, S, 2012. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. In : *BMJ*. 24 juillet 2012. Vol. 345, n° jul24 2, p. e4757–e4757. DOI 10.1136/bmj.e4757.

BONNET, Sébastien, ARCHER, Stephen L, ALLALUNIS-TURNER, Joan, HAROMY, Alois, BEAULIEU, Christian, THOMPSON, Richard, LEE, Christopher T, LOPASCHUK, Gary D, PUTTAGUNTA, Lakshmi, BONNET, Sandra, HARRY, Gwyneth, HASHIMOTO, Kyoko, PORTER, Christopher J, ANDRADE, Miguel A, THEBAUD, Bernard et MICHELAKIS, Evangelos D, 2007. A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. In : *Cancer Cell*. janvier 2007. Vol. 11, n° 1, p. 37–51. DOI 10.1016/j.ccr.2006.10.020.

BOSMA, Gayle C, CUSTER, R Philip et BOSMA, Melvin J, 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. In : *Nature*. 10 février 1983. Vol. 301, n° 5900, p. 527–530. DOI 10.1038/301527a0.

BOSSERHOFF, A K, KAUFMANN, M, KALUZA, B, BARTKE, I, ZIRNGIBL, H, HEIN, R, STOLZ, W et BUETTNER, R, 1997. Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. In : *Cancer Research*. 1 août 1997. Vol. 57, n° 15, p. 3149–3153.

BOSSERHOFF, Anja-Katrin, 2011. *Melanoma Development*. S.l. : Springer.

BUHLER, K R, SANTUCCI, R A, ROYAL, R A, WHITNEY, S C, VESSELLA, R L, LANGE, P H et ELLIS, W J, 2000. Intermittent androgen suppression in the LuCaP 23.12 prostate

cancer xenograft model. In : *The Prostate*. 1 avril 2000. Vol. 43, n° 1, p. 63–70.

BUIJS, Manon, VOSSEN, Josephina A, GESCHWIND, Jean-Francois H, ISHIMORI, Takayoshi, ENGLER, James M, ACHA-NGWODO, Obele, WAHL, Richard L et VALI, Mustafa, 2009. Specificity of the anti-glycolytic activity of 3-bromopyruvate confirmed by FDG uptake in a rat model of breast cancer. In : *Investigational new drugs*. avril 2009. Vol. 27, n° 2, p. 120–123. DOI 10.1007/s10637-008-9145-0.

BUZAID, A C, LEGHA, S S, WINN, R, BELT, R et POLLOCK, T, 1993. Cisplatin (C), vinblastine (V), dacarbazine (D)(CVD) versus dacarbazine alone in metastatic melanoma: preliminary results phase III cancer community oncology program (CCOP). In : *Proc Am Soc Clin Oncol*. 1993. Vol. 12, p. 389.

CALABRESI, F, AAPRO, M, BECQUART, D, DIRIX, L, WILS, J, ARDIZZONI, A et GERARD, B, 1991. Multicenter phase II trial of the single agent fotemustine in patients with advanced malignant melanoma. In : *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. mai 1991. Vol. 2, n° 5, p. 377–378.

CANGEMI, Giuliana, MORANDI, Barbara, D'AGOSTINO, Antonella, PERI, Cristiano, CONTE, Romana, DAMONTE, Gianluca, FERLAZZO, Guido, BIASSONI, Roberto et MELIOLI, Giovanni, 2003. IFN-alpha mediates the up-regulation of HLA class I on melanoma cells without switching proteasome to immunoproteasome. In : *International immunology*. décembre 2003. Vol. 15, n° 12, p. 1415–1421.

CARVAJAL, Richard D, ANTONESCU, Cristina R, WOLCHOK, Jedd D, CHAPMAN, Paul B, ROMAN, Ruth-Ann, TEITCHER, Jerrold, PANAGEAS, Katherine S, BUSAM, Klaus J, CHMIELOWSKI, Bartosz, LUTZKY, Jose, PAVLICK, Anna C, FUSCO, Anne, CANE, Lauren, TAKEBE, Naoko, VEMULA, Swapna, BOUVIER, Nancy, BASTIAN, Boris C et SCHWARTZ, Gary K, 2011. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. In : *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 8 juin 2011. Vol. 305, n° 22, p. 2327–2334. DOI 10.1001/jama.2011.746.

CHAN, R, MULLER, W J et SIEGEL, P M, 1999. Oncogenic activating mutations in the neu/erbB-2 oncogene are involved in the induction of mammary tumors. In : *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999. Vol. 889, p. 45–51.

CHAPMAN, P B PB, EINHORN, L H LH, MEYERS, M L ML, SAXMAN, S S, DESTRO, A N AN, PANAGEAS, K S KS, BEGG, C B CB, AGARWALA, S S SS, SCHUCHTER, L M LM, ERNSTOFF, M S MS, HOUGHTON, A N AN et KIRKWOOD, J M JM, 1999. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. In : *Journal of Clinical Oncology*. 31 août 1999. Vol. 17, n° 9, p. 2745–2751.

CHAPMAN, Paul B, HAUSCHILD, Axel, ROBERT, Caroline, HAANEN, John B, ASCIERTO, Paolo, LARKIN, James, DUMMER, Reinhard, GARBE, Claus, TESTORI, Alessandro, MAIO, Michele, HOGG, David, LORIGAN, Paul, LEBBE, Celeste, JOUARY, Thomas, SCHADENDORF, Dirk, RIBAS, Antoni, O'DAY, Steven J, SOSMAN, Jeffrey A, KIRKWOOD, John M, EGGERMONT, Alexander M M, DRENO, Brigitte, NOLOP, Keith, LI, Jiang, NELSON, Betty, HOU, Jeannie, LEE, Richard J, FLAHERTY, Keith T, MCARTHUR, Grant ABRIM-3 STUDY GROUP, 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with



BRAF V600E mutation. In : *New England Journal of Medicine*. 30 juin 2011. Vol. 364, n° 26, p. 2507–2516. DOI 10.1056/NEJMoa1103782.

CHEN, L, HAAR, TER, G, HILL, C R, ECCLES, S A et BOX, G, 1998. Treatment of implanted liver tumors with focused ultrasound. In : *Ultrasound in medicine & biology*. novembre 1998. Vol. 24, n° 9, p. 1475–1488.

CHEN, X, YANG, G y, DING, W Y, BONDOC, F, CURTIS, S K et YANG, C S, 1999. An esophagogastroduodenal anastomosis model for esophageal adenocarcinogenesis in rats and enhancement by iron overload. In : *Carcinogenesis*. septembre 1999. Vol. 20, n° 9, p. 1801–1808.

CHERNYAVSKIY, Oleksandr, VANNUCCI, Luca, BIANCHINI, Paolo, DIFATO, Francesco, SAIEH, Mustafa et KUBÍNOVÁ, Lucie, 2009. Imaging of mouse experimental melanoma in vivo and ex vivo by combination of confocal and nonlinear microscopy. In : *Microscopy research and technique*. 1 juin 2009. Vol. 72, n° 6, p. 411–423. DOI 10.1002/jemt.20687.

CHIN, L, GARRAWAY, L A et FISHER, D E, 2006. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. In : *Genes & development*. 2006.

CHIN, L, POMERANTZ, J, POLSKY, D, JACOBSON, M, COHEN, C, CORDON-CARDO, C, HORNER, J W et DEPINHO, R A, 1997. Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. In : *Genes & development*. 1 novembre 1997. Vol. 11, n° 21, p. 2822–2834.

CHMIELECKI, Juliann J, FOO, Jasmine J, OXNARD, Geoffrey R GR, HUTCHINSON, Katherine K, OHASHI, Kadoaki K, SOMWAR, Romel R, WANG, Lu L, AMATO, Katherine R KR, ARCILA, Maria M, SOS, Martin L ML, SOCCI, Nicholas D ND, VIALE, Agnes A, DE STANCHINA, Elisa E, GINSBERG, Michelle S MS, THOMAS, Roman K RK, KRIS, Mark G MG, INOUE, Akira A, LADANYI, Marc M, MILLER, Vincent A VA, MICHOR, Franziska F et PAO, William W, 2011. Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling. In : *Science Translational Medicine*. 5 juillet 2011. Vol. 3, n° 90, p. 90ra59–90ra59. DOI 10.1126/scitranslmed.3002356.

CLOUDMAN, A M, 1941. THE EFFECT OF AN EXTRA-CHROMO-SOMAL INFLUENCE UPON TRANSPLANTED SPONTANEOUS TUMORS IN MICE. In : *Science (New York, N.Y.)*. 18 avril 1941. Vol. 93, n° 2416, p. 380–381. DOI 10.1126/science.93.2416.380.

COATES, A S et SEGELOV, E, 1994. Long term response to chemotherapy in patients with visceral metastatic melanoma. In : *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. mars 1994. Vol. 5, n° 3, p. 249–251.

COLOMBINO, Maria, CAPONE, Mariaelena, LISSIA, Amelia, COSSU, Antonio, RUBINO, Corrado, DE GIORGI, Vincenzo, MASSI, Daniela, FONSATTI, Ester, STAIBANO, Stefania et NAPPI, Oscar, 2012. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. In : *Journal of Clinical Oncology*. 2012. Vol. 30, n° 20, p. 2522–2529.

COMBEST, Austin J, ROBERTS, Patrick J, DILLON, Patrick M, SANDISON, Katie, HANNA, Suzan K, ROSS, Charlene, HABIBI, Sohrab, ZAMBONI, Beth, MÜLLER, Markus,

- BRUNNER, Martin, SHARPLESS, Norman E et ZAMBONI, William C, 2012. Genetically engineered cancer models, but not xenografts, faithfully predict anticancer drug exposure in melanoma tumors. In : *The Oncologist*. 2012. Vol. 17, n° 10, p. 1303–1316. DOI 10.1634/theoncologist.2012-0274.
- CONTAG, C H, JENKINS, D, CONTAG, P R et NEGRIN, R S, 2000. Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo. In : *Neoplasia (New York, N.Y.)*. janvier 2000. Vol. 2, n° 1-2, p. 41–52.
- CONWAY, T F, SABEL, M S, SUGANO, M, FRELINGER, J G, EGILMEZ, N K, CHEN, F et BANKERT, R B, 2000. Growth of human tumor xenografts in SCID mice quantified using an immunoassay for tumor marker protein in serum. In : *Journal of immunological methods*. 13 janvier 2000. Vol. 233, n° 1-2, p. 57–65.
- CORBETT, T H, GRISWOLD, D P, ROBERTS, B J, PECKHAM, J C et SCHABEL, F M, 1975. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. In : *Cancer Research*. septembre 1975. Vol. 35, n° 9, p. 2434–2439.
- CORBETT, T H, ROBERTS, B J, LEOPOLD, W R, PECKHAM, J C, WILKOFF, L J, GRISWOLD, D P et SCHABEL, F M, 1984. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. In : *Cancer Research*. février 1984. Vol. 44, n° 2, p. 717–726.
- CRITCHLEY-THORNE, Rebecca J, YAN, Ning, NACU, Serban, WEBER, Jeffrey, HOLMES, Susan P et LEE, Peter P, 2007. Down-regulation of the interferon signaling pathway in T lymphocytes from patients with metastatic melanoma. In : *PLoS medicine*. mai 2007. Vol. 4, n° 5, p. e176. DOI 10.1371/journal.pmed.0040176.
- DAI, Derek L, MARTINKA, Magdalena et LI, Gang, 2005. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. In : *Journal of Clinical Oncology*. 1 mars 2005. Vol. 23, n° 7, p. 1473–1482. DOI 10.1200/JCO.2005.07.168.
- DALLAS B FLIES, Britt J Sandler Mario Sznol Lieping Chen, 2011. Blockade of the B7-H1/PD-1 Pathway for Cancer Immunotherapy. In : *The Yale journal of biology and medicine*. 1 décembre 2011. Vol. 84, n° 4, p. 409.
- DANIEL, Vincent C, MARCHIONNI, Luigi, HIERMAN, Jared S, RHODES, Jonathan T, DEVEREUX, Wendy L, RUDIN, Charles M, YUNG, Rex, PARMIGIANI, Giovanni, DORSCH, Marion, PEACOCK, Craig D et WATKINS, D Neil, 2009. A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. In : *Cancer Research*. 15 avril 2009. Vol. 69, n° 8, p. 3364–3373. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-08-4210.
- DANKORT, David, CURLEY, David P, CARTLIDGE, Robert A, NELSON, Betsy, KARNEZIS, Anthony N, DAMSKY, William E, YOU, Mingjian J, DEPINHO, Ronald A, MCMAHON, Martin et BOSENBERG, Marcus, 2009. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. In : *Nature genetics*. mai 2009. Vol. 41, n° 5, p. 544–552. DOI 10.1038/ng.356.

DAVIES, Helen, BIGNELL, Graham R, COX, Charles, STEPHENS, Philip, EDKINS, Sarah, CLEGG, Sheila, TEAGUE, Jon, WOFFENDIN, Hayley, GARNETT, Mathew J, BOTTOMLEY, William, DAVIS, Neil, DICKS, Ed, EWING, Rebecca, FLOYD, Yvonne, GRAY, Kristian, HALL, Sarah, HAWES, Rachel, HUGHES, Jaime, KOSMIDOU, Vivian, MENZIES, Andrew, MOULD, Catherine, PARKER, Adrian, STEVENS, Claire, WATT, Stephen, HOOPER, Steven, WILSON, Rebecca, JAYATILAKE, Hiran, GUSTERSON, Barry A, COOPER, Colin, SHIPLEY, Janet, HARGRAVE, Darren, PRITCHARD-JONES, Katherine, MAITLAND, Norman, CHENEVIX-TRENCH, Georgia, RIGGINS, Gregory J, BIGNER, Darell D, PALMIERI, Giuseppe, COSSU, Antonio, FLANAGAN, Adrienne, NICHOLSON, Andrew, HO, Judy W C, LEUNG, Suet Y, YUEN, Siu T, WEBER, Barbara L, SEIGLER, Hilliard F, DARROW, Timothy L, PATERSON, Hugh, MARAIS, Richard, MARSHALL, Christopher J, WOOSTER, Richard, STRATTON, Michael R et FUTREAL, P Andrew, 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. In : *Nature*. 27 juin 2002. Vol. 417, n° 6892, p. 949–954. DOI 10.1038/nature00766.

DECKER, S, HOLLINGSHEAD, M, BONOMI, C A, CARTER, J P et SAUSVILLE, E A, 2004. The hollow fibre model in cancer drug screening: the NCI experience. In : *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. avril 2004. Vol. 40, n° 6, p. 821–826. DOI 10.1016/j.ejca.2003.11.029.

DEICHMANN, M, BENNER, A, BOCK, M, JÄCKEL, A, UHL, K, WALDMANN, V et NÄHER, H, 1999. S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. juin 1999. Vol. 17, n° 6, p. 1891–1896.

DIMASI, Joseph A, HANSEN, Ronald W et GRABOWSKI, Henry G, 2003. The price of innovation: new estimates of drug development costs. In : *Journal of health economics*. mars 2003. Vol. 22, n° 2, p. 151–185. DOI 10.1016/S0167-6296(02)00126-1.

DIPERSIO, L, KYRIAZIS, A P, MICHAEL, J G et PESCE, A J, 1979. Monitoring the therapy of human tumor xenografts in nude mice by the use of lactate dehydrogenase. In : *Journal of the National Cancer Institute*. février 1979. Vol. 62, n° 2, p. 375–379.

DÍEZ-TORRE, Alejandro, ANDRADE, Ricardo, EGUIZÁBAL, Cristina, LÓPEZ, Elixabete, ARLUZZA, Jon, SILIÓ, Margarita et ARÉCHAGA, Juan, 2009. Reprogramming of melanoma cells by embryonic microenvironments. In : *The International journal of developmental biology*. 2009. Vol. 53, n° 8-10, p. 1563–1568. DOI 10.1387/ijdb.093021ad.

DUSZA, Stephen W, DELGADO, Ruby, BUSAM, Klaus J, MARGHOOB, Ashfaq A et HALPERN, Allan C, 2006. Treatment of dysplastic nevi with 5% imiquimod cream, a pilot study. In : *Journal of drugs in dermatology : JDD*. janvier 2006. Vol. 5, n° 1, p. 56–62.

EGELAND, Tormod A M, GAUSTAD, Jon-Vidar, GALAPPATHI, Kanthi et ROFSTAD, Einar K, 2011. Magnetic resonance imaging of tumor necrosis. In : *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. avril 2011. Vol. 50, n° 3, p. 427–434. DOI 10.3109/0284186X.2010.526633.

EIGENTLER, Thomas K, CAROLI, Ulrich M, RADNY, Peter et GARBE, Claus, 2003. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. In : *The lancet oncology*. décembre 2003. Vol. 4, n° 12, p. 748–759.

ENGELL-NOERREGAARD, Lotte, HANSEN, Troels Holz, ANDERSEN, Mads Hald, THOR STRATEN, Per et SVANE, Inge Marie, 2008. Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. In : *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 22 août 2008. Vol. 58, n° 1, p. 1–14. DOI 10.1007/s00262-008-0568-4.

EUHUS, David M, HUDD, Charles, LAREGINA, Marie C et JOHNSON, Frank E, 1986. Tumor measurement in the nude mouse. In : *J Surg Oncol*. avril 1986. Vol. 31, n° 4, p. 229–234. DOI 10.1002/jso.2930310402.

FAIRCHILD, Ene T et CARSON, William E, III, 2011. Animal Models of Melanoma. In : *Cancer Drug Discovery and Development*. 2011. p. 259–285. DOI 10.1007/978-1-60761-968-0-11.

FAIS, Stefano, DE MILITO, Angelo, YOU, Haiyan et QIN, Wenxin, 2007. Targeting vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases as a new strategy against cancer. In : *Cancer Research*. 15 novembre 2007. Vol. 67, n° 22, p. 10627–10630. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-07-1805.

FALKSON, C I CI, IBRAHIM, J J, KIRKWOOD, J M JM, COATES, A S AS, ATKINS, M B MB et BLUM, R H RH, 1998. Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. In : *Journal of Clinical Oncology*. 30 avril 1998. Vol. 16, n° 5, p. 1743–1751.

FANTIN, Valeria R, ST-PIERRE, Julie et LEDER, Philip, 2006. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. In : *Cancer Cell*. juin 2006. Vol. 9, n° 6, p. 425–434. DOI 10.1016/j.ccr.2006.04.023.

FICHTNER, Iduna, ROLFF, Jana, SOONG, Richie, HOFFMANN, Jens, HAMMER, Stefanie, SOMMER, Anette, BECKER, Michael et MERK, Johannes, 2008. Establishment of Patient-Derived Non-Small Cell Lung Cancer Xenografts as Models for the Identification of Predictive Biomarkers. In : *Clinical Cancer ....* 2008.

FIDLER, I J, 1973. Selection of successive tumour lines for metastasis. In : *Nature: New biology* [en ligne]. 4 avril 1973. Vol. 242, n° 118, p. 148–149. Disponible à l'adresse : <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=4512654&retmode=ref&cmd=prlinks>.

FIDLER, I J, 1975. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. In : *Cancer Research*. janvier 1975. Vol. 35, n° 1, p. 218–224.

FIDLER, I J, 1991. Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice

provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis. In : *Cancer metastasis reviews*. octobre 1991. Vol. 10, n° 3, p. 229–243.

FIDLER, Isaiah J et KRIPKE, Margaret L, 1977. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. In : *Science (New York, N.Y.)*. 1977. Vol. 197, n° 4306, p. 893–895.

FIEBIG, H H, MAIER, A et BURGER, A M, 2004. Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. In : *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. avril 2004. Vol. 40, n° 6, p. 802–820. DOI 10.1016/j.ejca.2004.01.009.

FLANAGAN, S P, 1966. « Nud »', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. In : *Genetical Research [en ligne]*. décembre 1966. Vol. 8, n° 3, p. 295–309. Disponible à l'adresse : <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=5980117&retmode=ref&cmd=prlinks>.

FLEISCHMANN, C M, STANTON, G J et FLEISCHMANN, W R, 1994. Enhanced in vivo sensitivity to interferon with in vitro resistant B16 tumor cells in mice. In : *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. septembre 1994. Vol. 39, n° 3, p. 148–154.

FRIDMAN, R, KIBBEY, M C, ROYCE, L S, ZAIN, M, SWEENEY, T M, JICHA, D L, YANNELLI, J R, MARTIN, G R et KLEINMAN, H K, 1991. Enhanced Tumor Growth of Both Primary and Established Human and Murine Tumor Cells in Athymic Mice After Coinjection With Matrigel. In : *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 5 juin 1991. Vol. 83, n° 11, p. 769–774. DOI 10.1093/jnci/83.11.769.

FUTREAL, P Andrew, COIN, Lachlan, MARSHALL, Mhairi, DOWN, Thomas, HUBBARD, Timothy, WOOSTER, Richard, RAHMAN, Nazneen et STRATTON, Michael R, 2004. A census of human cancer genes. In : *Nature Reviews Cancer*. mars 2004. Vol. 4, n° 3, p. 177–183. DOI 10.1038/nrc1299.

GANDINI, Sara, SERA, Francesco, CATTARUZZA, Maria Sofia, PASQUINI, Paolo, ZANETTI, Roberto, MASINI, Cinzia, BOYLE, Peter et MELCHI, Carmelo Francesco, 2005. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. In : *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. septembre 2005. Vol. 41, n° 14, p. 2040–2059. DOI 10.1016/j.ejca.2005.03.034.

GARBE, Claus, PERIS, Ketty, HAUSCHILD, Axel, SAIAG, Philippe, MIDDLETON, Mark, SPATZ, Alan, GROB, Jean-Jacques, MALVEHY, Josep, NEWTON-BISHOP, Julia, STRATIGOS, Alexander, PEHAMBERGER, Hubert, EGGERMONT, Alexander M, EUROPEAN DERMATOLOGY FORUM, EUROPEAN ASSOCIATION OF DERMATO-ONCOLOGYEUROPEAN ORGANIZATION OF RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER, 2012. *Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline--Update 2012*. octobre 2012. S.l. : s.n.

GARBER, Ken, 2007. Personal mouse colonies give hope for pancreatic cancer patients. In : *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 17 janvier 2007. p. 105–107.

GARBER, Ken, 2009. From human to mouse and back: « tumorgraf »' models surge in

popularity. In : *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 7 janvier 2009. p. 6–8.

GARNETT, Mathew J et MARAIS, Richard, 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. In : *Cancer Cell*. octobre 2004. Vol. 6, n° 4, p. 313–319. DOI 10.1016/j.ccr.2004.09.022.

GARRAWAY, Levi A, WIDLUND, Hans R, RUBIN, Mark A, GETZ, Gad, BERGER, Aaron J, RAMASWAMY, Sridhar, BEROUKHIM, Rameen, MILNER, Danny A, GRANTER, Scott R, DU, Jinyan, LEE, Charles, WAGNER, Stephan N, LI, Cheng, GOLUB, Todd R, RIMM, David L, MEYERSON, Matthew L, FISHER, David E et SELLERS, William R, 2005. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. In : *Nature*. 7 juillet 2005. Vol. 436, n° 7047, p. 117–122. DOI 10.1038/nature03664.

GATTONI-CELLI, S, BYERS, R H, CALORINI, L et FERRONE, S, 1993. Organ-specific metastases in melanoma: experimental animal models. In : *Pigment Cell Res*. décembre 1993. Vol. 6, n° 6, p. 381–384.

GAUDY-MARQUESTE, Caroline, REGIS, Jean-Marie, MURACCIOLE, Xavier, LAURANS, Renaud, RICHARD, Marie-Aleth, BONERANDI, Jean-Jacques et GROB, Jean-Jacques, 2006. Gamma-Knife radiosurgery in the management of melanoma patients with brain metastases: a series of 106 patients without whole-brain radiotherapy. In : *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*. 1 juillet 2006. Vol. 65, n° 3, p. 809–816. DOI 10.1016/j.ijrobp.2006.01.024.

GELINEAU, M C, BADEL, N, DENIS, I, THOMAS, L et POGGI, B, 2002. Suivi biologique du mélanome humain par deux marqueurs sériques : MIA et PS100  $\beta$ . In : *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. juin 2002. Vol. 17, n° 3, p. 153–159. DOI 10.1016/S0923-2532(02)01185-7.

GHISSASSI, EL, Fatiha, BAAN, Robert, STRAIF, Kurt, GROSSE, Yann, SECRETAN, Béatrice, BOUVARD, Véronique, BENBRAHIM-TALLAA, Lamia, GUHA, Neela, FREEMAN, Crystal, GALICHET, Laurent, COGLIANO, Vincent WHO INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER MONOGRAPH WORKING GROUP, 2009. A review of human carcinogens--part D: radiation. In : *The lancet oncology*. août 2009. p. 751–752.

GILLICK, J, MORTELL, A, DAWRANT, M, GILES, S, BANNIGAN, J et PURI, P, 2008. The Adriamycin rat/mouse model and its importance to the paediatric surgeon. In : *Pediatric surgery international*. janvier 2008. Vol. 24, n° 1, p. 113–118. DOI 10.1007/s00383-007-2035-2.

GIOVANELLA, B C, STEHLIN, J S, WILLIAMS, L J, LEE, S S et SHEPARD, R C, 1978. Heterotransplantation of human cancers into nude mice: a model system for human cancer chemotherapy. In : *Cancer*. novembre 1978. Vol. 42, n° 5, p. 2269–2281.

GIRIT, Ibrahim Cem, JURE-KUNKEL, Maria et MCINTYRE, Kim W, 2008. A structured light-based system for scanning subcutaneous tumors in laboratory animals. In : *Comparative medicine*. juin 2008. Vol. 58, n° 3, p. 264–270.

GLADUE, R P, COLE, S H et DONOVAN, C, 2006. In vivo efficacy of the CD40 agonist antibody CP-870,893 against a broad range of tumor types: Impact of tumor CD40

expression, dendritic cells, and chemotherapy -- Gladue et al. 24 (18 Supplement): 2514 -- ASCO Meeting Abstracts. In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006.

GOMEZ-RAYA, L, OKOMO-ADHIAMBO, M, BEATTIE, C, OSBORNE, K, RINK, A et RAUW, W M, 2007. Modeling inheritance of malignant melanoma with DNA markers in Sinclair swine. In : *Genetics*. mai 2007. Vol. 176, n° 1, p. 585–597. DOI 10.1534/genetics.106.070268.

GORDON, M, 1927. The Genetics of a Viviparous Top-Minnow *Platyopocilus*; the Inheritance of Two Kinds of Melanophores. In : *Genetics*. mai 1927. Vol. 12, n° 3, p. 253–283.

GRAHAM, Kevin C, WIRTZFELD, Lauren A, MACKENZIE, Lisa T, POSTENKA, Carl O, GROOM, Alan C, MACDONALD, Ian C, FENSTER, Aaron, LACEFIELD, James C et CHAMBERS, Ann F, 2005. Three-dimensional high-frequency ultrasound imaging for longitudinal evaluation of liver metastases in preclinical models. In : *Cancer Research*. 15 juin 2005. Vol. 65, n° 12, p. 5231–5237. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-05-0440.

GREENE, H S N, 1950. The heterologous transplantation of human melanomas. In : *The Yale journal of biology and medicine*. juillet 1950. Vol. 22, n° 6, p. 611–620.

GREENE, J F, TOWNSEND, J S et AMOSS, M S, 1994. Histopathology of regression in sinclair swine model of melanoma. In : *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. juillet 1994. Vol. 71, n° 1, p. 17–24.

GRISWOLD, D P et CORBETT, T H, 1975. A colon tumor model for anticancer agent evaluation. In : *Cancer*. décembre 1975. Vol. 36, n° 6 Suppl, p. 2441–2444.

GROB, J J, GOVERNET, J, AYMAR, D, MOSTAQUE, A, ROMANO, M H, COLLET, A M, NOE, M C, DICONSTANZO, M P et BONERANDI, J J, 1990. Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma. In : *Cancer* [en ligne]. 15 juillet 1990. Vol. 66, n° 2, p. 387–395. Disponible à l'adresse : [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(19900715\)66:2%3C387::AID-CNCR2820660232%3E3.0.CO;2-J/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(19900715)66:2%3C387::AID-CNCR2820660232%3E3.0.CO;2-J/abstract).

GULLIKSRUD, Kristine, VESTVIK, Ida K, GALAPPATHI, Kanthi, MATHIESEN, Berit et ROFSTAD, Einar K, 2008. Detection of Different Hypoxic Cell Subpopulations in Human Melanoma Xenografts by Pimonidazole Immunohistochemistry. In : *Radiation Research*. novembre 2008. Vol. 170, n° 5, p. 638–650. DOI 10.1667/RR1400.1.

GUO, H B, STOFFEL-WAGNER, B, BIERWIRTH, T, MEZGER, J et KLINGMÜLLER, D, 1995. Clinical significance of serum S100 in metastatic malignant melanoma. In : *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. juin 1995. Vol. 31A, n° 6, p. 924–928.

GUO, Jun, SI, Lu, KONG, Yan, FLAHERTY, Keith T, XU, Xiaowei, ZHU, Yanyan, CORLESS, Christopher L, LI, Li, LI, Haifu et SHENG, Xinan, 2011. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. In : *Journal of Clinical Oncology*. 2011. Vol. 29, n° 21, p. 2904–2909.

GUY, C T, CARDIFF, R D et MULLER, W J, 1992. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. In : *Molecular and cellular biology*. mars 1992. Vol. 12, n° 3, p. 954–961.

HA, W S, KIM, C K, SONG, S H et KANG, C B, 2001. Study on mechanism of multistep hepatotumorigenesis in rat: development of hepatotumorigenesis. In : *Journal of veterinary science*. avril 2001. Vol. 2, n° 1, p. 53–58.

HARDING, Harold E et PASSEY, R D, 1930. A transplantable melanoma of the mouse. In : *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1930. Vol. 33, n° 2, p. 417–427. DOI 10.1002/path.1700330219.

HERSEY, Peter, WATTS, Ralph Neal, ZHANG, Xu Dong et HACKETT, John, 2009. Metabolic approaches to treatment of melanoma. In : *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1 novembre 2009. Vol. 15, n° 21, p. 6490–6494. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-09-0251.

HEYN, Chris, RONALD, John A, RAMADAN, Soha S, SNIR, Jonatan A, BARRY, Andrea M, MACKENZIE, Lisa T, MIKULIS, David J, PALMIERI, Diane, BRONDER, Julie L, STEEG, Patricia S, YONEDA, Toshiyuki, MACDONALD, Ian C, CHAMBERS, Ann F, RUTT, Brian K et FOSTER, Paula J, 2006. In vivo MRI of cancer cell fate at the single-cell level in a mouse model of breast cancer metastasis to the brain. In : *Magnetic Resonance in Medicine*. novembre 2006. Vol. 56, n° 5, p. 1001–1010. DOI 10.1002/mrm.21029.

HINGORANI, Sunil R, JACOBETZ, Michael A, ROBERTSON, Gavin P, HERLYN, Meenhard et TUVESON, David A, 2003. Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. In : *Cancer Research*. 1 septembre 2003. Vol. 63, n° 17, p. 5198–5202.

HODI, F Stephen, O'DAY, Steven J, MCDERMOTT, David F, WEBER, Robert W, SOSMAN, Jeffrey A, HAANEN, John B, GONZALEZ, Rene, ROBERT, Caroline, SCHADENDORF, Dirk, HASSEL, Jessica C, AKERLEY, Wallace, VAN DEN EERTWEGH, Alfons J M, LUTZKY, Jose, LORIGAN, Paul, VAUBEL, Julia M, LINETTE, Gerald P, HOGG, David, OTTENSMEIER, Christian H, LEBBE, Celeste, PESCHEL, Christian, QUIRT, Ian, CLARK, Joseph I, WOLCHOK, Jedd D, WEBER, Jeffrey S, TIAN, Jason, YELLIN, Michael J, NICHOL, Geoffrey M, HOOS, Axel et URBA, Walter J, 2010. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. In : *New England Journal of Medicine*. 19 août 2010. Vol. 363, n° 8, p. 711–723. DOI 10.1056/NEJMoa1003466.

HOFF, VON, D D, 1998. There are no bad anticancer agents, only bad clinical trial designs--twenty-first Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. In : *Clinical Cancer Research*. 1998.

HOFFMAN, R M, 1999. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. In : *Investigational new drugs*. 1999. Vol. 17, n° 4, p. 343–359.

HOFFMAN, Robert, 2002. Green fluorescent protein imaging of tumour growth, metastasis, and angiogenesis in mouse models. In : *The lancet oncology*. septembre 2002. Vol. 3, n° 9, p. 546–556.



HRUBAN, V, HORAK, V, FORTYN, K, HRADECKY, J, KLAUDY, J, SMITH, D M, REISNEROVA, H et MAJZLIK, I, 2004. Inheritance of malignant melanoma in the MeLiM strain of miniature pigs. In : *Veterinarni Medicina-UZPI*. 2004. Vol. 49.

HSU, M Y, MEIER, F E, NESBIT, M, HSU, J Y, VAN BELLE, P, ELDER, D E et HERLYN, M, 2000. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. In : *The American journal of pathology*. mai 2000. Vol. 156, n° 5, p. 1515–1525. DOI 10.1016/S0002-9440(10)65023-7.

HUANG, Feng-Ju, STEEG, Patricia S, PRICE, Janet E, CHIU, Wen-Tai, CHOU, Ping-Chieh, XIE, Keping, SAWAYA, Raymond et HUANG, Suyun, 2008. Molecular basis for the critical role of suppressor of cytokine signaling-1 in melanoma brain metastasis. In : *Cancer Research*. 1 décembre 2008. Vol. 68, n° 23, p. 9634–9642. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-08-1429.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2006. *Exposure to artificial UV radiation and skin cancer*. S.l. : World Health Organization.

JACQUILLAT, C, KHAYAT, D, BANZET, P, WEIL, M, FUMOLEAU, P, AVRIL, M F, NAMER, M, BONNETERRE, J, KERBRAT, P, BONERANDI, J J, BUGAT, R, MONTCUQUET, P, CUISSOL, D, LAUVIN, R, VILMER, C, PRACHE, C et BIZZARI, J P, 1990. Final report of the french multicenter phase II study of the nitrosourea fotemustine in 153 evaluable patients with disseminated malignant melanoma including patients with cerebral metastases. In : *Cancer* [en ligne]. 1 novembre 1990. Vol. 66, n° 9, p. 1873–1878. DOI 10.1002/1097-0142(19901101)66:9<1873::AID-CNCR2820660904>3.0.CO;2-5. Disponible à l'adresse : <http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0142%2819901101%2966%3A9%3C1873%3A%3AAID-CNCR2820660904%3E3.0.CO%3B2-5>.

JIN, Ketao, TENG, Lisong, SHEN, Yanping, HE, Kuifeng, XU, Zhenzhen et LI, Guangliang, 2010. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review. In : *Clinical and Translational Oncology*. 20 juillet 2010. Vol. 12, n° 7, p. 473–480. DOI 10.1007/s12094-010-0540-6.

JOHANNESSEN, Cory M, BOEHM, Jesse S, KIM, So Young, THOMAS, Sapana R, WARDWELL, Leslie, JOHNSON, Laura A, EMERY, Caroline M, STRANSKY, Nicolas, COGDILL, Alexandria P et BARRETINA, Jordi, 2010. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. In : *Nature*. 2010. Vol. 468, n° 7326, p. 968–972.

JUHASZ, I, ALBELDA, S M, ELDER, D E, MURPHY, G F, ADACHI, K, HERLYN, D, VALYI-NAGY, I T et HERLYN, M, 1993. Growth and invasion of human melanomas in human skin grafted to immunodeficient mice. In : *The American journal of pathology*. août 1993. Vol. 143, n° 2, p. 528–537.

KARASARIDES, Maria, CHILOECHES, Antonio, HAYWARD, Robert, NICULESCU-DUVAZ, Dan, SCANLON, Ian, FRIEDLOS, Frank, OGILVIE, Lesley, HEDLEY, Douglas, MARTIN, Jan, MARSHALL, Christopher J, SPRINGER, Caroline J et MARAIS, Richard, 2004. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. In : *Oncogene*. 19 août 2004. Vol. 23, n° 37, p. 6292–

6298. DOI 10.1038/sj.onc.1207785.

KEILHOLZ, U U, CONRADT, C C, LEGHA, S S SS, KHAYAT, D D, SCHEIBENBOGEN, C C, THATCHER, N N, GOEY, S H SH, GORE, M M, DORVAL, T T, HANCOCK, B B, PUNT, C J CJ, DUMMER, R R, AVRIL, M F MF, BRÖCKER, E B EB, BENHAMMOUDA, A A, EGGERMONT, A M AM et PRITSCH, M M, 1998. Results of interleukin-2-based treatment in advanced melanoma: a case record-based analysis of 631 patients. In : *Journal of Clinical Oncology*. 31 août 1998. Vol. 16, n° 9, p. 2921–2929.

KERBEL, R S, CORNIL, I et THEODORESCU, D, 1991. Importance of orthotopic transplantation procedures in assessing the effects of transfected genes on human tumor growth and metastasis. In : *Cancer metastasis reviews*. octobre 1991. Vol. 10, n° 3, p. 201–215.

KIOWSKI, Gregor, BIEDERMANN, Thomas, WIDMER, Daniel S, CIVENNI, Gianluca, BURGER, Charlotte, DUMMER, Reinhard, SOMMER, Lukas et REICHMANN, Ernst, 2012. Engineering melanoma progression in a humanized environment in vivo. In : *The Journal of investigative dermatology*. janvier 2012. Vol. 132, n° 1, p. 144–153. DOI 10.1038/jid.2011.275.

KLEEBERG, U R, ENGEL, E, ISRAELS, P, BRÖCKER, E B, TILGEN, W, KENNES, C, GERARD, B, LEJEUNE, F, GLABBEKE, M V et LENTZ, M A, 1995. Palliative therapy of melanoma patients with fotemustine. Inverse relationship between tumour load and treatment effectiveness. A multicentre phase II trial of the EORTC-Melanoma Cooperative Group (MCG). In : *Melanoma research*. juin 1995. Vol. 5, n° 3, p. 195–200.

KLEINMAN, Hynda K et MARTIN, George R, 2005. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. In : *Seminars in cancer biology*. octobre 2005. Vol. 15, n° 5, p. 378–386. DOI 10.1016/j.semcan.2005.05.004.

KLUZA, Jérôme, CORAZAO-ROZAS, Paola, TOUIL, Yasmine, JENDOUBI, Manel, MAIRE, Cyril, GUERRESCHI, Pierre, JONNEAUX, Aurélie, BALLOT, Caroline, BALAYSSAC, Stéphane, VALABLE, Samuel, CORROYER-DULMONT, Aurélien, BERNAUDIN, Myriam, MALET-MARTINO, Myriam, DE LASSALLE, Elisabeth Martin, MABOUDOU, Patrice, FORMSTECHE, Pierre, POLAKOWSKA, Renata, MORTIER, Laurent et MARCHETTI, Philippe, 2012. Inactivation of the HIF-1 $\alpha$ /PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants. In : *Cancer Research*. 1 octobre 2012. Vol. 72, n° 19, p. 5035–5047. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-12-0979.

KO, Young H, SMITH, Barbara L, WANG, Yuchuan, POMPER, Martin G, RINI, David A, TORBENSON, Michael S, HULLIHEN, Joanne et PEDERSEN, Peter L, 2004. Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. In : *Biochemical and biophysical research communications*. 5 novembre 2004. Vol. 324, n° 1, p. 269–275. DOI 10.1016/j.bbrc.2004.09.047.

KOEHLER, Martin Johannes, KÖNIG, Karsten, ELSNER, Peter, BÜCKLE, Rainer et KAATZ, Martin, 2006. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. In : *Optics letters*. 1 octobre 2006. Vol. 31, n° 19, p. 2879–2881.

KÖNIG, K, 2000. Multiphoton microscopy in life sciences. In : *Journal of Microscopy*.

novembre 2000. Vol. 200, n° 2, p. 83–104. DOI 10.1046/j.1365-2818.2000.00738.x.

KREGER, Alicia, LISTER, Richard, TRACHET, Erin et URBAN, Frank, 2007. Preclinical models of tumor growth and response. In : 2007. p. 13–32.

KUO, T H, KUBOTA, T, NISHIBORI, H, WATANABE, M, FURUKAWA, T, KASE, S, TANINO, H, SAIKAWA, Y, TERAMOTO, T et KITAJIMA, M, 1993. Experimental cancer chemotherapy using a liver metastatic model of human colon cancer transplanted into the spleen of severe combined immunodeficient mice. In : *J Surg Oncol*. 19 février 1993. Vol. 52, n° 2, p. 92–96.

KUSEWITT, D F, APPELEGATE, L A et LEY, R D, 1991. Ultraviolet radiation-induced skin tumors in a South American opossum (*Monodelphis domestica*). In : *Veterinary pathology*. janvier 1991. Vol. 28, n° 1, p. 55–65.

KYRIAZIS, A P, DIPERSIO, L, MICHAEL, J G et PESCE, A J, 1979. Influence of the mouse hepatitis virus (MHV) infection on the growth of human tumors in the athymic mouse. In : *International Journal of Cancer*. 15 mars 1979. Vol. 23, n° 3, p. 402–409.

LAISNEY, J A G C, MUELLER, T D, SCHARTL, M et MEIERJOHANN, S, 2013. Hyperactivation of constitutively dimerized oncogenic EGF receptors by autocrine loops. In : *Oncogene*. 9 mai 2013. Vol. 32, n° 19, p. 2403–2411. DOI 10.1038/onc.2012.267.

LEGHA, S S, RING, S, PAPADOPOULOS, N, PLAGER, C, CHAWLA, S et BENJAMIN, R, 1989. A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine, and dacarbazine (CVD) for metastatic melanoma. In : *Cancer*. 15 novembre 1989. Vol. 64, n° 10, p. 2024–2029.

LEVY, Carmit, KHALED, Mehdi et FISHER, David E, 2006. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. In : *Trends in molecular medicine*. septembre 2006. Vol. 12, n° 9, p. 406–414. DOI 10.1016/j.molmed.2006.07.008.

LEY, R D, APPELEGATE, L A, FRY, R J et SANCHEZ, A B, 1991. Photoreactivation of ultraviolet radiation-induced skin and eye tumors of *Monodelphis domestica*. In : *Cancer Research*. 15 décembre 1991. Vol. 51, n° 24, p. 6539–6542.

LIFSTED, T, LE VOYER, T, WILLIAMS, M, MULLER, W, KLEIN-SZANTO, A, BUETOW, K H et HUNTER, K W, 1998. Identification of inbred mouse strains harboring genetic modifiers of mammary tumor age of onset and metastatic progression. In : *International Journal of Cancer*. 12 août 1998. Vol. 77, n° 4, p. 640–644.

LIU, Ming et HICKLIN, Daniel, 2011. Human tumor xenograft efficacy models. In : *Cancer Drug Discovery and Development*. 2011. p. 99–124.

LONG, Georgina V, MENZIES, Alexander M, NAGRIAL, Adnan M, HAYDU, Lauren E, HAMILTON, Anne L, MANN, Graham J, HUGHES, T Michael, THOMPSON, John F, SCOLYER, Richard A et KEFFORD, Richard F, 2011. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1 avril 2011. Vol. 29, n° 10, p. 1239–1246. DOI 10.1200/JCO.2010.32.4327.

M WATANABE, K L McCormick K Volker J R Ortaldo J M Wigginton M J Brunda R H Wiltrott W E Fogler, 1997. Regulation of local host-mediated anti-tumor mechanisms by cytokines: direct and indirect effects on leukocyte recruitment and angiogenesis. In : *The American journal of pathology*. 1 mai 1997. Vol. 150, n° 5, p. 1869.

MACEWEN, E Gregory, 1990. Spontaneous tumors in dogs and cats: Models for the study of cancer biology and treatment. In : *CANCER AND METASTASIS REVIEW*. septembre 1990. Vol. 9, n° 2, p. 125–136. DOI 10.1007/BF00046339.

MALTHIÈRY, Y et SAVAGNER, F, 2006. Métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse: exemple des tumeurs endocrines riches en mitochondries: Conférence donnée lors de la réunion annuelle du GTE Angers—17 novembre 2005. In : 2006. Vol. 67, n° 3, p. 205–213. DOI 10.1016/S0003-4266(06)72588-4.

MAN, Shan, MUNOZ, Raquel et KERBEL, Robert S, 2007. On the development of models in mice of advanced visceral metastatic disease for anti-cancer drug testing. In : *Cancer metastasis reviews*. décembre 2007. Vol. 26, n° 3-4, p. 737–747. DOI 10.1007/s10555-007-9087-6.

MARINCOLA, F M, WHITE, D E, WISE, A P et ROSENBERG, S A, 1995. Combination therapy with interferon alfa-2a and interleukin-2 for the treatment of metastatic cancer. In : *Journal of Clinical Oncology*. mai 1995. Vol. 13, n° 5, p. 1110–1122.

MARINO, M L, FAIS, S, DJAVAHERI-MERGNY, M, VILLA, A, MESCHINI, S, LOZUPONE, F, VENTURI, G, MINA, DELLA, P, PATTINGRE, S, RIVOLTINI, L, CODOGNO, P et DE MILITO, A, 2010. Proton pump inhibition induces autophagy as a survival mechanism following oxidative stress in human melanoma cells. In : *Cell death & disease*. 2010. Vol. 1, p. e87. DOI 10.1038/cddis.2010.67.

MARKERT, Clement L et URSPRUNG, Heinrich, 1962. The ontogeny of isozyme patterns of lactate dehydrogenase in the mouse. In : *Developmental Biology*. 1962. Vol. 5, n° 3, p. 363–381.

MARKOVIC, Svetomir N et MURASKO, Donna M, 1991. Role of Natural Killer and T-Cells in Interferon Induced Inhibition of Spontaneous Metastases of the B16F10L Murine Melanoma. In : *Cancer Research*. 1991.

MÄUELER, Winfried, SCHARTL, Angelika et SCHARTL, Manfred, 1993. Different expression patterns of oncogenes and proto-oncogenes in hereditary and carcinogen-induced tumors of xiphophorus. In : *International Journal of Cancer*. 9 septembre 1993. Vol. 55, n° 2, p. 288–296. DOI 10.1002/ijc.2910550220.

MCGILL, Gaël G, HAQ, Rizwan, NISHIMURA, Emi K et FISHER, David E, 2006. c-Met expression is regulated by Mitf in the melanocyte lineage. In : *Journal of Biological Chemistry*. 14 avril 2006. Vol. 281, n° 15, p. 10365–10373. DOI 10.1074/jbc.M513094200.

MENZIES, Alexander M, LONG, Georgina V et MURALI, Rajmohan, 2012. Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. In : *Drug design, development and therapy*. 2012. Vol. 6, p. 391–405. DOI 10.2147/DDDT.S38998.

MIDDLETON, M R, GROB, J J, AARONSON, N, FIERLBECK, G, TILGEN, W, SEITER, S, GORE, M, AAMDAL, S, CEBON, J, COATES, A, DRENO, B, HENZ, M, SCHADENDORF, D, KAPP, A, WEISS, J, FRAASS, U, STATKEVICH, P, MULLER, M et THATCHER, N, 2000. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. janvier 2000. Vol. 18, n° 1, p. 158–166.

MINTZ, B et SILVERS, W K, 1993. Transgenic mouse model of malignant skin melanoma. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1 octobre 1993. Vol. 90, n° 19, p. 8817–8821.

MISFELDT, M L et GRIMM, D R, 1994. Sinclair miniature swine: an animal model of human melanoma. In : *Veterinary immunology and immunopathology*. octobre 1994. Vol. 43, n° 1-3, p. 167–175.

MITCHELL, Malcolm S, ABRAMS, Judith, THOMPSON, John A, KASHANI-SABET, Mohammed, DECONTI, Ronald C, HWU, Wen-Jen, ATKINS, Michael B, WHITMAN, Eric, ERNSTOFF, Marc S, HALUSKA, Frank G, JAKOWATZ, James G, GUPTA, DAS, Tapas K, RICHARDS, Jon M, SAMLOWSKI, Wolfram E, COSTANZI, John J, ARONSON, Frederick R, DEISSEROTH, Albert B, DUDEK, Arkadiusz Z et JONES, Vicky E, 2007. Randomized trial of an allogeneic melanoma lysate vaccine with low-dose interferon Alfa-2b compared with high-dose interferon Alfa-2b for Resected stage III cutaneous melanoma. In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 20 mai 2007. Vol. 25, n° 15, p. 2078–2085. DOI 10.1200/JCO.2006.10.1709.

MITRA, Devarati, LUO, Xi, MORGAN, Ann, WANG, Jin, HOANG, Mai P, LO, Jennifer, GUERRERO, Candace R, LENNERZ, Jochen K, MIHM, Martin C, WARGO, Jennifer A, ROBINSON, Kathleen C, DEVI, Suprabha P, VANOVER, Jillian C, D'ORAZIO, John A, MCMAHON, Martin, BOSENBERG, Marcus W, HAIGIS, Kevin M, HABER, Daniel A, WANG, Yinsheng et FISHER, David E, 2012. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. In : *Nature*. 15 novembre 2012. Vol. 491, n° 7424, p. 449–453. DOI 10.1038/nature11624.

MOCELLIN, Simone, LENS, Marko B, PASQUALI, Sandro, PILATI, Pierluigi et CHIARION SILENI, Vanna, 2013. Interferon alpha for the adjuvant treatment of cutaneous melanoma. In : *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013. Vol. 6, p. CD008955. DOI 10.1002/14651858.CD008955.pub2.

MOORE, A S, THEILEN, G H, NEWELL, A D, MADEWELL, B R et RUDOLF, A R, 1991. Preclinical study of sequential tumor necrosis factor and interleukin 2 in the treatment of spontaneous canine neoplasms. In : *Cancer Research*. 1 janvier 1991. Vol. 51, n° 1, p. 233–238.

MORRIS, H P, 1965. Studies on the development, biochemistry, and biology of experimental hepatomas. In : *Advances in cancer research* [en ligne]. 1965. Vol. 9, p. 227–302. Disponible à l'adresse : <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=4285261&retmode=ref&cmd=prlinks>.

MORRIS, H P et SLAUGHTER, L J, 1977. Historical development of transplantable hepatomas. In : *Advances in experimental medicine and biology*. mai 1977. Vol. 92, p. 1–19.

MORTON, Christopher L et HOUGHTON, Peter J, 2007. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. In : *Nature protocols*. 2007. Vol. 2, n° 2, p. 247–250. DOI 10.1038/nprot.2007.25.

NAIRN, R S, KAZIANIS, S, COLETTA, DELLA, L, TRONO, D, BUTLER, A P, WALTER, R B et MORIZOT, D C, 2001. Genetic analysis of susceptibility to spontaneous and UV-induced carcinogenesis in Xiphophorus hybrid fish. In : *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*. juin 2001. Vol. 3, n° Supplement 1, p. S24–36. DOI 10.1007/s1012601-0004-7.

NATALI, P G, NICOTRA, M R, DI RENZO, M F, PRAT, M, BIGOTTI, A, CAVALIERE, R et COMOGLIO, P M, 1993. Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. In : *British journal of cancer*. octobre 1993. Vol. 68, n° 4, p. 746–750.

NAUMOV, G N, WILSON, S M, MACDONALD, I C, SCHMIDT, E E, MORRIS, V L, GROOM, A C, HOFFMAN, R M et CHAMBERS, A F, 1999. Cellular expression of green fluorescent protein, coupled with high-resolution in vivo videomicroscopy, to monitor steps in tumor metastasis. In : *Journal of cell science*. juin 1999. Vol. 112 ( Pt 12), p. 1835–1842.

NEMATI, F, SASTRE-GARAU, X, LAURENT, C, COUTURIER, J, MARIANI, P, DESJARDINS, L, PIPERNO-NEUMANN, S, LANTZ, O, ASSELAIN, B, PLANCHER, C, ROBERT, D, PEGUILLET, I, DONNADIEU, M H, DAHMANI, A, BESSARD, M A, GENTIEN, D, REYES, C, SAULE, S, BARILLOT, E, ROMAN-ROMAN, S et DECAUDIN, D, 2010. Establishment and Characterization of a Panel of Human Uveal Melanoma Xenografts Derived from Primary and/or Metastatic Tumors. In : *Clinical Cancer Research*. 14 avril 2010. Vol. 16, n° 8, p. 2352–2362. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-09-3066.

NÉMATI, Fariba, SASTRE-GARAU, Xavier, LAURENT, Cécile, COUTURIER, Jérôme, MARIANI, Pascale, DESJARDINS, Laurence, PIPERNO-NEUMANN, Sophie, LANTZ, Olivier, ASSELAIN, Bernard, PLANCHER, Corine, ROBERT, Delphine, PÉGUILLLET, Isabelle, DONNADIEU, Marie-Hélène, DAHMANI, Ahmed, BESSARD, Marie-Andrée, GENTIEN, David, REYES, Cécile, SAULE, Simon, BARILLOT, Emmanuel, ROMAN-ROMAN, Sergio et DECAUDIN, Didier, 2010. Establishment and characterization of a panel of human uveal melanoma xenografts derived from primary and/or metastatic tumors. In : *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 15 avril 2010. Vol. 16, n° 8, p. 2352–2362. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-09-3066.

NOËL, A, DE PAUW-GILLET, M C, PURNELL, G, NUSGENS, B, LAPIERE, C M et FOIDART, J M, 1993. Enhancement of tumorigenicity of human breast adenocarcinoma cells in nude mice by matrigel and fibroblasts. In : *British journal of cancer*. novembre 1993. Vol. 68, n° 5, p. 909–915.

NOONAN, F P, RECIO, J A, TAKAYAMA, H, DURAY, P, ANVER, M R, RUSH, W L, DE FABO, E C et MERLINO, G, 2001. Neonatal sunburn and melanoma in mice. In : *Nature*. 20 septembre 2001. Vol. 413, n° 6853, p. 271–272. DOI 10.1038/35095108.

NOONAN, Frances P, DUDEK, James, MERLINO, Glenn et DE FABO, Edward C, 2003. Animal models of melanoma: an HGF/SF transgenic mouse model may facilitate experimental access to UV initiating events. In : *Pigment Cell Res.* février 2003. Vol. 16, n° 1, p. 16–25.

OLIVE, Kenneth P, JACOBETZ, Michael A, DAVIDSON, Christian J, GOPINATHAN, Aarthi, MCINTYRE, Dominick, HONESS, Davina, MADHU, Basetti, GOLDGRABEN, Mae A, CALDWELL, Meredith E, ALLARD, David, FRESE, Kristopher K, DENICOLA, Gina, FEIG, Christine, COMBS, Chelsea, WINTER, Stephen P, IRELAND-ZECCHINI, Heather, REICHEL, Stefanie, HOWAT, William J, CHANG, Alex, DHARA, Mousumi, WANG, Lifu, RÜCKERT, Felix, GRÜTZMANN, Robert, PILARSKY, Christian, IZERADJENE, Kamel, HINGORANI, Sunil R, HUANG, Pearl, DAVIES, Susan E, PLUNKETT, William, EGORIN, Merrill, HRUBAN, Ralph H, WHITEBREAD, Nigel, MCGOVERN, Karen, ADAMS, Julian, IACOBUZIO-DONAHUE, Christine, GRIFFITHS, John et TUVESON, David A, 2009. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. In : *Science (New York, N.Y.)*. 12 juin 2009. Vol. 324, n° 5933, p. 1457–1461. DOI 10.1126/science.1171362.

OVREBØ, Kirsti Marie, ELLINGSEN, Christine, HOMPLAND, Tord et ROFSTAD, Einar K, 2013. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging of the metastatic potential of tumors: A preclinical study of cervical carcinoma and melanoma xenografts. In : *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. avril 2013. Vol. 52, n° 3, p. 604–611. DOI 10.3109/0284186X.2012.689851.

OXNARD, Geoffrey R, ARCILA, Maria E, CHMIELECKI, Juliann, LADANYI, Marc, MILLER, Vincent A et PAO, William, 2011. New strategies in overcoming acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. In : *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1 septembre 2011. Vol. 17, n° 17, p. 5530–5537. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-10-2571.

OZUNA, A G C, ROWLAND, R R R, NIETFELD, J C, KERRIGAN, M A, DEKKERS, J C M et WYATT, C R, 2013. Preliminary Findings of a Previously Unrecognized Porcine Primary Immunodeficiency Disorder. In : *Veterinary pathology*. 23 janvier 2013. Vol. 50, n° 1, p. 144–146. DOI 10.1177/0300985812457790.

PANTEL, Klaus et BRAKENHOFF, Ruud H, 2004. Dissecting the metastatic cascade. In : *Nature Reviews Cancer*. juin 2004. Vol. 4, n° 6, p. 448–456. DOI 10.1038/nrc1370.

PATEL, Poulam M, SUCIU, Stefan, MORTIER, Laurent, KRUIT, Wim H, ROBERT, Caroline, SCHADENDORF, Dirk, TREFZER, Uwe, PUNT, Cornelis J A, DUMMER, Reinhard, DAVIDSON, Neville, BECKER, Juergen, CONRY, Robert, THOMPSON, John A, HWU, Wen-Jen, ENGELN, Kristel, AGARWALA, Sanjiv S, KEILHOLZ, Ulrich, EGGERMONT, Alexander M M, SPATZ, Alain et EORTC MELANOMA GROUP, 2011. Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: final results of a randomised phase III study (EORTC 18032). In : *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* [en ligne]. juillet 2011. Vol. 47, n° 10, p. 1476–1483. DOI 10.1016/j.ejca.2011.04.030. Disponible à l'adresse : <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=21600759&retmode=ref&cmd=prlinks>.

- PATTON, E E et ZON, L I, 2005. Taking human cancer genes to the fish: a transgenic model of melanoma in zebrafish. In : *Zebrafish*. 2005. Vol. 1, n° 4, p. 363–368.
- PATTON, E Elizabeth, MITCHELL, David L et NAIRN, Rodney S, 2010. Genetic and environmental melanoma models in fish. In : *Pigment cell & melanoma research*. juin 2010. Vol. 23, n° 3, p. 314–337. DOI 10.1111/j.1755-148X.2010.00693.x.
- PHAN, G Q, ATTIA, P, STEINBERG, S M, WHITE, D E et ROSENBERG, S A, 2001. Factors associated with response to high-dose interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. In : *Journal of Clinical Oncology*. 1 août 2001. Vol. 19, n° 15, p. 3477–3482.
- POULIKAKOS, Poulikos I, PERSAUD, Yogindra, JANAKIRAMAN, Manickam, KONG, Xiangju, NG, Charles, MORICEAU, Gatien, SHI, Hubing, ATEFI, Mohammad, TITZ, Bjoern, GABAY, May Tal, SALTON, Maayan, DAHLMAN, Kimberly B, TADI, Madhavi, WARGO, Jennifer A, FLAHERTY, Keith T, KELLEY, Mark C, MISTELI, Tom, CHAPMAN, Paul B, SOSMAN, Jeffrey A, GRAEBER, Thomas G, RIBAS, Antoni, LO, Roger S, ROSEN, Neal et SOLIT, David B, 2011. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). In : *Nature*. 15 décembre 2011. Vol. 480, n° 7377, p. 387–390. DOI 10.1038/nature10662.
- RAMBOW, Florian, PITON, Guillaume, BOUET, Stephan, LEPLAT, Jean-Jaques, BAULANDE, Sylvain, MARRAU, Angélique, STAM, Mark, HORAK, Vratislav et VINCENT-NAULLEAU, Silvia, 2008. Gene expression signature for spontaneous cancer regression in melanoma pigs. In : *Neoplasia (New York, N.Y.)*. juillet 2008. Vol. 10, n° 7, p. 714–26–1 p following 726.
- RANDAZZO, B P, KESARI, S, GESSER, R M, ALSOP, D, FORD, J C, BROWN, S M, MACLEAN, A et FRASER, N W, 1995. Treatment of experimental intracranial murine melanoma with a neuroattenuated herpes simplex virus 1 mutant. In : *Virology*. 1 août 1995. Vol. 211, n° 1, p. 94–101. DOI 10.1006/viro.1995.1382.
- ROBERT, Caroline, THOMAS, Luc, BONDARENKO, Igor, O'DAY, Steven, M D, Jeffrey Weber, GARBE, Claus, LEBBE, Celeste, BAURAIN, Jean-François, TESTORI, Alessandro, GROB, Jean-Jacques, DAVIDSON, Neville, RICHARDS, Jon, MAIO, Michele, HAUSCHILD, Axel, MILLER, Wilson H, GASCON, Pere, LOTEM, Michal, HARMANKAYA, Kaan, IBRAHIM, Ramy, FRANCIS, Stephen, CHEN, Tai-Tsang, HUMPHREY, Rachel, HOOS, Axel et WOLCHOK, Jedd D, 2011. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. In : *New England Journal of Medicine*. 30 juin 2011. Vol. 364, n° 26, p. 2517–2526. DOI 10.1056/NEJMoa1104621.
- RODER, J et DUWE, A, 1979. The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function. In : *Nature*. 29 mars 1979. Vol. 278, n° 5703, p. 451–453.
- ROFSTAD, Einar K, MATHIESEN, Berit, KINDEM, Kristil et GALAPPATHI, Kanthi, 2006. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. In : *Cancer Research*. 1 juillet 2006. Vol. 66, n° 13, p. 6699–6707. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-06-0983.
- ROSENBERG, Steven A, YANG, James C et RESTIFO, Nicholas P, 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. In : *Nature medicine*. septembre 2004. Vol. 10, n° 9, p. 909–915. DOI 10.1038/nm1100.



RUBIO-VIQUEIRA, B et HIDALGO, M, 2008. Direct In Vivo Xenograft Tumor Model for Predicting Chemotherapeutic Drug Response in Cancer Patients. In : *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 12 novembre 2008. Vol. 85, n° 2, p. 217–221. DOI 10.1038/clpt.2008.200.

RUBIO-VIQUEIRA, Belen, JIMENO, Antonio, CUSATIS, George, ZHANG, Xianfeng, IACOBUZIO-DONAHUE, Christine, KARIKARI, Collins, SHI, Chanjusn, DANENBERG, Kathleen, DANENBERG, Peter V, KURAMOCHI, Hidekazu, TANAKA, Koji, SINGH, Sharat, SALIMI-MOOSAVI, Hossein, BOURAOUD, Nadia, AMADOR, Maria L, ALTIOK, Soner, KULESZA, Piotr, YEO, Charles, MESSERSMITH, Wells, ESHLEMAN, James, HRUBAN, Ralph H, MAITRA, Anirban et HIDALGO, Manuel, 2006. An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer. In : *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1 août 2006. Vol. 12, n° 15, p. 4652–4661. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-06-0113.

RUSSELL, WMS, BURCH, R L et HUME, C W, 1959. The principles of humane experimental technique. In : . 1959.

RUSTHOVEN, J J JJ, QUIRT, I C IC, ISCOE, N A NA, MCCULLOCH, P B PB, JAMES, K W KW, LOHMANN, R C RC, JENSEN, J J, BURDETTE-RADOUX, S S, BODURTHA, A J AJ, SILVER, H K HK, VERMA, S S, ARMITAGE, G R GR, ZEE, B B et BENNETT, K K, 1996. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial comparing the response rates of carmustine, dacarbazine, and cisplatin with and without tamoxifen in patients with metastatic melanoma. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. In : *Journal of Clinical Oncology*. 30 juin 1996. Vol. 14, n° 7, p. 2083–2090.

RYGAARD, J et POVLSSEN, C O, 1969. Heterotransplantation of a human malignant tumour to « Nud » mice. In : *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. 1969. Vol. 77, n° 4, p. 758–760.

SAXENA, Rajiv K, SAXENA, Queen B et ADLER, William H, 1982. Defective T-cell response in beige mutant mice. In : *Nature*. 21 janvier 1982. Vol. 295, n° 5846, p. 240–241. DOI 10.1038/295240a0.

SCHABEL, F M, CORBETT, T H et SCHABEL, F M, 1980. Cell kinetics and the chemotherapy of murine solid tumors. In : *Antibiotics and chemotherapy* [en ligne]. 1980. Vol. 28, p. 28–34. Disponible à l'adresse : <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=7416729&retmode=ref&cmd=prlinks>.

SCHACKERT, G et FIDLER, I J, 1988. Development of in vivo models for studies of brain metastasis. In : *International Journal of Cancer*. 15 avril 1988. Vol. 41, n° 4, p. 589–594.

SCHAER, David A, LI, Yongbiao, MERGHOU, Taha, RIZZUTO, Gabrielle A, SHEMESH, Amos, COHEN, Adam D, LI, Yanyun, AVOGADRI, Francesca, TOLEDO-CROW, Ricardo, HOUGHTON, Alan N et WOLCHOK, Jedd D, 2011. Detection of intra-tumor self antigen recognition during melanoma tumor progression in mice using advanced multimode confocal/two photon microscope. In : *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6, n° 6, p. e21214. DOI 10.1371/journal.pone.0021214.

SCHÖN, Michael P, WIENRICH, B Gregor, DREWNIOK, Claudia, BONG, Anne B, EBERLE,

- Jürgen, GEILEN, Christoph C, GOLLNICK, Harald et SCHÖN, Margarete, 2004. Death receptor-independent apoptosis in malignant melanoma induced by the small-molecule immune response modifier imiquimod. In : *The Journal of investigative dermatology*. mai 2004. Vol. 122, n° 5, p. 1266–1276. DOI 10.1111/j.0022-202X.2004.22528.x.
- SEGHERS, Amélie Clémentine, WILGENHOF, Sofie, LEBBE, Celeste et NEYNS, Bart, 2012. Successful rechallenge in two patients with BRAF-V600-mutant melanoma who experienced previous progression during treatment with a selective BRAF inhibitor. In : *Melanoma research*. décembre 2012. Vol. 22, n° 6, p. 466–472. DOI 10.1097/CMR.0b013e3283541541.
- SENNOUNE, Souad R, BAKUNTS, Karina, MARTÍNEZ, Gloria M, CHUA-TUAN, Jenny L, KEBIR, Yamina, ATTAYA, Mohamed N et MARTÍNEZ-ZAGUILÁN, Raul, 2004. Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. In : *American journal of physiology. Cell physiology*. juin 2004. Vol. 286, n° 6, p. C1443–52. DOI 10.1152/ajpcell.00407.2003.
- SERRANO, M, LEE, H, CHIN, L, CORDON-CARDO, C, BEACH, D et DEPINHO, R A, 1996. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. In : *Cell*. 5 avril 1996. Vol. 85, n° 1, p. 27–37.
- SHARKEY, Robert M, KARACAY, Habibe, VALLABHAJOSULA, Shankar, MCBRIDE, William J, ROSSI, Edmund A, CHANG, Chien-Hsing, GOLDSMITH, Stanley J et GOLDENBERG, David M, 2008. Metastatic human colonic carcinoma: molecular imaging with pretargeted SPECT and PET in a mouse model. In : *Radiology*. février 2008. Vol. 246, n° 2, p. 497–507. DOI 10.1148/radiol.2462070229.
- SHARPLESS, Norman E et DEPINHO, Ronald A, 2006. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. In : *Nature reviews. Drug discovery*. septembre 2006. Vol. 5, n° 9, p. 741–754. DOI 10.1038/nrd2110.
- SHI, Hubing, KONG, Xiangju, RIBAS, Antoni et LO, Roger S, 2011. Combinatorial treatments that overcome PDGFR $\beta$ -driven resistance of melanoma cells to V600E-BRAF inhibition. In : *Cancer Research*. 1 août 2011. Vol. 71, n° 15, p. 5067–5074. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-11-0140.
- SHIOHARA, TETSUO, MOELLMANN, GISELA, JACOBSON, KIRSTEN, KUKLINSKA, ELIZABETH, RUDDLE, N HLERNER, AB, 1987. Anti-tumor activity of class II MHC antigen-restricted cloned autoreactive T cells. II. Novel immunotherapy of B16 melanomas by local and systemic adoptive transfer. In : *The Journal of Immunology*. 1987. Vol. 138, n° 6, p. 1979–1986. DOI 10.4049/jimmunol.0804002.
- SILVERS, W K, 1979. *The coat colours of mice. A model for mammalian gene action and interaction*. S.l. : Springer-Verlag.
- SKIPPER, H E et SCHMIDT, L H, 1962. A manual on quantitative drug evaluation in experimental tumor systems. I. Background, description of criteria, and presentation of quantitative therapeutic data on various classes of drugs obtained in diverse experimental tumor systems. In : *Cancer chemotherapy reports. Part 1* [en ligne]. avril 1962. Vol. 17, p. 1–143. Disponible à l'adresse :

<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=13913647&retmode=ref&cmd=prlinks>.

SLINGLUFF, Craig L, LEE, Sandra, ZHAO, Fengmin, CHIANESE-BULLOCK, Kimberly A, OLSON, Walter C, BUTTERFIELD, Lisa H, WHITESIDE, Theresa L, LEMING, Philip D et KIRKWOOD, John M, 2013. A Randomized Phase II Trial of Multi-epitope Vaccination with Melanoma Peptides for Cytotoxic T-Cells and Helper T-Cells for Patients with Metastatic Melanoma (E1602). In : *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 7 mai 2013. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-13-0002.

SMALLEY, Keiran S M et MCARTHUR, Grant A, 2012. The Current State of Targeted Therapy in Melanoma: This Time It's Personal. In : *Seminars in Oncology*. avril 2012. Vol. 39, n° 2, p. 204–214. DOI 10.1053/j.seminoncol.2012.01.008.

SMALLEY, Keiran S M et SONDAK, Vernon K, 2010. Melanoma — An Unlikely Poster Child for Personalized Cancer Therapy. In : *New England Journal of Medicine*. 26 août 2010. Vol. 363, n° 9, p. 876–878. DOI 10.1056/NEJMe1005370.

SOIFFER, Robert, LYNCH, Thomas, MIHM, Martin, JUNG, Ken, RHUDA, Catherine, SCHMOLLINGER, Jan C, HODI, F Stephen, LIEBSTER, Laura, LAM, Prudence, MENTZER, Steven, SINGER, Samuel, TANABE, Kenneth K, COSIMI, A Benedict, DUDA, Rosemary, SOBER, Arthur, BHAN, Atul, DALEY, John, NEUBERG, Donna, PARRY, Gordon, ROKOVICH, Joseph, RICHARDS, Laurie, DRAYER, Jan, BERNS, Anton, CLIFT, Shirley, COHEN, Lawrence K, MULLIGAN, Richard C et DRANOFF, Glenn, 1998. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. In : *Proceedings of the ....* 1998.

SPARANO, J A JA, FISHER, R I RI, SUNDERLAND, M M, MARGOLIN, K K, ERNEST, M L ML, SZNOL, M M, ATKINS, M B MB, DUTCHER, J P JP, MICETICH, K C KC et WEISS, G R GR, 1993. Randomized phase III trial of treatment with high-dose interleukin-2 either alone or in combination with interferon alfa-2a in patients with advanced melanoma. In : *Journal of Clinical Oncology*. 30 septembre 1993. Vol. 11, n° 10, p. 1969–1977.

STEVEN A ROSENBERG, James C Yang Douglas J Schwartzentruber Patrick Hwu Francesco M Marincola Suzanne L Topalian Nicholas P Restifo Mark E Dudley Susan L Schwarz Paul J Spiess John R Wunderlich Maria R Parkhurst Yutaka Kawakami Claudia A Seipp Jan H Einhorn Donald E White, 1998. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. In : *Nature medicine*. 1 mars 1998. Vol. 4, n° 3, p. 321.

STEWART, H L et HARE, W V, 1949. Adenocarcinoma and other lesions of the glandular stomach of mice, following intramural injection of 20-methylcholanthrene. In : *Journal of the National Cancer Institute*. octobre 1949. Vol. 10, n° 2, p. 359–Disc– 399–403.

SU, Fei, VIROS, Amaya, MILAGRE, Carla, TRUNZER, Kerstin, BOLLAG, Gideon, SPLEISS, Olivia, REIS-FILHO, Jorge S, KONG, Xiangju, KOYA, Richard C, FLAHERTY, Keith T, CHAPMAN, Paul B, KIM, Min Jung, HAYWARD, Robert, MARTIN, Matthew, YANG, Hong, WANG, Qiongqing, HILTON, Holly, HANG, Julie S, NOE, Johannes, LAMBROS, Maryou,

GEYER, Felipe, DHOMEN, Nathalie, NICULESCU-DUVAZ, Ion, ZAMBON, Alfonso, NICULESCU-DUVAZ, Dan, PREECE, Natasha, ROBERT, Lídia, OTTE, Nicholas J, MOK, Stephen, KEE, Damien, MA, Yan, ZHANG, Chao, HABETS, Gaston, BURTON, Elizabeth A, WONG, Bernice, NGUYEN, Hoa, KOCKX, Mark, ANDRIES, Luc, LESTINI, Brian, NOLOP, Keith B, LEE, Richard J, JOE, Andrew K, TROY, James L, GONZALEZ, Rene, HUTSON, Thomas E, PUZANOV, Igor, CHMIELOWSKI, Bartosz, SPRINGER, Caroline J, MCARTHUR, Grant A, SOSMAN, Jeffrey A, LO, Roger S, RIBAS, Antoni et MARAIS, Richard, 2012. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. In : *New England Journal of Medicine*. 19 janvier 2012. Vol. 366, n° 3, p. 207–215. DOI 10.1056/NEJMoa1105358.

TAKATA, Minoru, GOTO, Yasufumi, ICHII, Nami, YAMAURA, Maki, MURATA, Hiroshi, KOGA, Hiroshi, FUJIMOTO, Akihide et SAIDA, Toshiaki, 2005. Constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in acral melanomas. In : *The Journal of investigative dermatology*. août 2005. Vol. 125, n° 2, p. 318–322. DOI 10.1111/j.0022-202X.2005.23812.x.

TAKETO, Makoto Mark, 2006. Mouse models of gastrointestinal tumors. In : *Cancer science*. mai 2006. Vol. 97, n° 5, p. 355–361. DOI 10.1111/j.1349-7006.2006.00190.x.

TENTLER, John J, TAN, Aik Choon, WEEKES, Colin D, JIMENO, Antonio, LEONG, Stephen, PITTS, Todd M, ARCAROLI, John J, MESSERSMITH, Wells A et ECKHARDT, S Gail, 2012. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. In : *Nature Reviews Clinical Oncology*. 17 avril 2012. Vol. 9, n° 6, p. 338–350. DOI 10.1038/nrclinonc.2012.61.

TESTORI, A, RICHARDS, J, WHITMAN, E, MANN, G B, LUTZKY, J, CAMACHO, L, PARMIANI, G, TOSTI, G, KIRKWOOD, J M, HOOS, A, YUH, L, GUPTA, R et SRIVASTAVA, P K, 2008. Phase III Comparison of Vitespen, an Autologous Tumor-Derived Heat Shock Protein gp96 Peptide Complex Vaccine, With Physician's Choice of Treatment for Stage IV Melanoma: The C-100-21 Study Group. In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 20 février 2008. Vol. 26, n° 6, p. 955–962. DOI 10.1200/JCO.2007.11.9941.

TSAI, James, LEE, John T, WANG, Weiru, ZHANG, Jiazhong, CHO, Hanna, MAMO, Shumeye, BREMER, Ryan, GILLETTE, Sam, KONG, Jun, HAASS, Nikolas K, SPROESSER, Katrin, LI, Ling, SMALLEY, Keiran S M, FONG, Daniel, ZHU, Yong-Liang, MARIMUTHU, Adhirai, NGUYEN, Hoa, LAM, Billy, LIU, Jennifer, CHEUNG, Ivana, RICE, Julie, SUZUKI, Yoshihisa, LUU, Catherine, SETTACHATGUL, Calvin, SHELLOOE, Rafe, CANTWELL, John, KIM, Sung-Hou, SCHLESSINGER, Joseph, ZHANG, Kam Y J, WEST, Brian L, POWELL, Ben, HABETS, Gaston, ZHANG, Chao, IBRAHIM, Prabha N, HIRTH, Peter, ARTIS, Dean R, HERLYN, Meenhard et BOLLAG, Gideon, 2008. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 26 février 2008. Vol. 105, n° 8, p. 3041–3046. DOI 10.1073/pnas.0711741105.

VANDEBERG, John L et ROBINSON, Edward S, 1997. The Laboratory Opossum (Monodelphis Domestica) in Laboratory Research. In : *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 1997. Vol. 38, n° 1, p. 4–12.

VILLANUEVA, Jessie, VULTUR, Adina, LEE, John T, SOMASUNDARAM, Rajasekharan, FUKUNAGA-KALABIS, Mizuho, CIPOLLA, Angela K, WUBBENHORST, Bradley, XU, Xiaowei, GIMOTTY, Phyllis A, KEE, Damien, SANTIAGO-WALKER, Ademi E, LETRERO, Richard, D'ANDREA, Kurt, PUSHPARAJAN, Anitha, HAYDEN, James E, BROWN, Kimberly Dahlman, LAQUERRE, Sylvie, MCARTHUR, Grant A, SOSMAN, Jeffrey A, NATHANSON, Katherine L et HERLYN, Meenhard, 2010. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. In : *Cancer Cell*. 14 décembre 2010. Vol. 18, n° 6, p. 683–695. DOI 10.1016/j.ccr.2010.11.023.

VIROS, Amaya, FRIDLYAND, Jane, BAUER, Juergen, LASITHIOTAKIS, Konstantin, GARBE, Claus, PINKEL, Daniel et BASTIAN, Boris C, 2008. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. In : *PLoS medicine*. 3 juin 2008. Vol. 5, n° 6, p. e120. DOI 10.1371/journal.pmed.0050120.

VONDERHEIDE, Robert H, FLAHERTY, Keith T, KHALIL, Magi, STUMACHER, Molly S, BAJOR, David L, HUTNICK, Natalie A, SULLIVAN, Patricia, MAHANY, J Joseph, GALLAGHER, Maryann, KRAMER, Amy, GREEN, Stephanie J, O'DWYER, Peter J, RUNNING, Kelli L, HUH, Richard D et ANTONIA, Scott J, 2007. Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody. In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1 mars 2007. Vol. 25, n° 7, p. 876–883. DOI 10.1200/JCO.2006.08.3311.

WAGLE, Nikhil, EMERY, Caroline, BERGER, Michael F, DAVIS, Matthew J, SAWYER, Allison, POCHANARD, Panisa, KEHOE, Sarah M, JOHANNESSEN, Cory M, MACCONAILL, Laura E, HAHN, William C, MEYERSON, Matthew et GARRAWAY, Levi A, 2011. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1 août 2011. Vol. 29, n° 22, p. 3085–3096. DOI 10.1200/JCO.2010.33.2312.

WAN, Paul T C, GARNETT, Mathew J, ROE, S Mark, LEE, Sharlene, NICULESCU-DUVAZ, Dan, GOOD, Valerie M, JONES, C Michael, MARSHALL, Christopher J, SPRINGER, Caroline J, BARFORD, David, MARAIS, Richard, CANCER GENOME PROJECT, 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. In : *Cell*. 19 mars 2004. Vol. 116, n° 6, p. 855–867.

WANG, Zhiqiang, HUBBARD, Gene B, CLUBB, Fred J et VANDEBERG, John L, 2009. The laboratory opossum (*Monodelphis domestica*) as a natural mammalian model for human cancer research. In : *International journal of clinical and experimental pathology*. 2009. Vol. 2, n° 3, p. 286–299.

WANG, Zhiqiang, HUBBARD, Gene B, PATHAK, Sen et VANDEBERG, John L, 2003. In vivo opossum xenograft model for cancer research. In : *Cancer Research*. 1 octobre 2003. Vol. 63, n° 19, p. 6121–6124.

WARBURG, O, 1956. On the origin of cancer cells. In : *Science (New York, N.Y.)*. 24 février 1956. Vol. 123, n° 3191, p. 309–314.

- WATANABE, H, UESAKA, T, KIDO, S, ISHIMURA, Y, SHIRAKI, K, KURAMOTO, K, HIRATA, S, SHOJI, S, KATOH, O et FUJIMOTO, N, 1999. Gastric tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine in Wistar rats with intestinal metaplasia caused by X-irradiation. In : *Japanese journal of cancer research : Gann*. novembre 1999. Vol. 90, n° 11, p. 1207–1211.
- WATERHOUSE, R N, CHAPMAN, J, IZARD, B, DONALD, A, BELBIN, K, O'BRIEN, J C et COLLIER, T L, 1997. Examination of four <sup>123</sup>I-labeled piperidine-based sigma receptor ligands as potential melanoma imaging agents: initial studies in mouse tumor models. In : *Nuclear medicine and biology*. août 1997. Vol. 24, n° 6, p. 587–593.
- WEBER, Jeffrey S, KÄHLER, Katharina C et HAUSCHILD, Axel, 2012. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 20 juillet 2012. Vol. 30, n° 21, p. 2691–2697. DOI 10.1200/JCO.2012.41.6750.
- WELCH, D R, 1997. Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. In : *Clinical & experimental metastasis*. mai 1997. Vol. 15, n° 3, p. 272–306.
- WELLBROCK, Claudia, OGILVIE, Lesley, HEDLEY, Douglas, KARASARIDES, Maria, MARTIN, Jan, NICULESCU-DUVAZ, Dan, SPRINGER, Caroline J et MARAIS, Richard, 2004. V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. In : *Cancer Research*. 1 avril 2004. Vol. 64, n° 7, p. 2338–2342.
- WESTBERG, Sara, SADEGHI, Arian, SVENSSON, Emma, SEGALL, Thomas, DIMOPOULOU, Maria, KORSGREN, Olle, HEMMINKI, Akseli, LOSKOG, Angelica S I, TÖTTERMAN, Thomas H et EULER, VON, Henrik, 2013. Treatment Efficacy and Immune Stimulation by AdCD40L Gene Therapy of Spontaneous Canine Malignant Melanoma. In : *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*. juillet 2013. Vol. 36, n° 6, p. 350–358. DOI 10.1097/CJI.0b013e31829d8a1b.
- WINTER, Scott F et HUNTER, Kent W, 2008. Mouse modifier genes in mammary tumorigenesis and metastasis. In : *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. septembre 2008. Vol. 13, n° 3, p. 337–342. DOI 10.1007/s10911-008-9089-1.
- WITTBRODT, J, ADAM, D, MALITSCHKEK, B, MÄUELER, W, RAULF, F, TELLING, A, ROBERTSON, S M et SCHARTL, M, 1989. Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing Tu locus in Xiphophorus. In : *Nature*. 5 octobre 1989. Vol. 341, n° 6241, p. 415–421. DOI 10.1038/341415a0.
- WITTBRODT, J, LAMMERS, R, MALITSCHKEK, B, ULLRICH, A et SCHARTL, M, 1992. The Xmrk receptor tyrosine kinase is activated in Xiphophorus malignant melanoma. In : *The EMBO journal*. novembre 1992. Vol. 11, n° 11, p. 4239–4246.
- WORKMAN, P, ABOAGYE, E O, BALKWILL, F, BALMAIN, A, BRUDER, G, CHAPLIN, D J, DOUBLE, J A, EVERITT, J, FARNINGHAM, D A H, GLENNIE, M J, KELLAND, L R, ROBINSON, V, STRATFORD, I J, TOZER, G M, WATSON, S, WEDGE, S R, ECCLES, S ACOMMITTEE OF THE NATIONAL CANCER RESEARCH INSTITUTE, 2010. *Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research*. 25 mai 2010. S.l. : s.n.
- XIE, Tong-xin, HUANG, Feng-Ju, ALDAPE, Kenneth D, KANG, Shin-Hyuk, LIU, Mingguang,

GERSHENWALD, Jeffrey E, XIE, Keping, SAWAYA, Raymond et HUANG, Suyun, 2006. Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis. In : *Cancer Research*. 15 mars 2006. Vol. 66, n° 6, p. 3188–3196. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-05-2674.

YANNELLI, John R et WROBLEWSKI, Joanne M, 2004. On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. In : *Vaccine*. 15 novembre 2004. Vol. 23, n° 1, p. 97–113. DOI 10.1016/j.vaccine.2003.12.036.

YEH, Iwei, DEIMLING, VON, Andreas et BASTIAN, Boris C, 2013. Clonal BRAF Mutations in Melanocytic Nevi and Initiating Role of BRAF in Melanocytic Neoplasia. In : *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 19 juin 2013. Vol. 105, n° 12, p. 917–919. DOI 10.1093/jnci/djt119.

YOU, Mingjian James, CASTRILLON, Diego H, BASTIAN, Boris C, O'HAGAN, Rónán C, BOSENBERG, Marcus W, PARSONS, Ramon, CHIN, Lynda et DEPINHO, Ronald A, 2002. Genetic analysis of Pten and Ink4a/Arf interactions in the suppression of tumorigenesis in mice. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 5 février 2002. Vol. 99, n° 3, p. 1455–1460. DOI 10.1073/pnas.022632099.

YURKOVETSKY, Zoya R, KIRKWOOD, John M, EDINGTON, Howard D, MARRANGONI, Adele M, VELIKOKHATNAYA, Lyudmila, WINANS, Matthew T, GORELIK, Elieser et LOKSHIN, Anna E, 2007. Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha2b. In : *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 15 avril 2007. Vol. 13, n° 8, p. 2422–2428. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-06-1805.

ZEITOUNI, N C, DAWSON, K et CHENEY, R T, 2005. Treatment of cutaneous metastatic melanoma with imiquimod 5% cream and the pulsed-dye laser. In : *The British journal of dermatology*. février 2005. Vol. 152, n° 2, p. 376–377. DOI 10.1111/j.1365-2133.2005.06307.x.