HAL
open science

Marqueurs prédictifs de réponse aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome cutané métastatique

Elisa Gremeaux Gremeaux-Funck-Brentano

To cite this version:

Elisa Gremeaux Gremeaux-Funck-Brentano. Marqueurs prédictifs de réponse aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome cutané métastatique. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS216 . tel-01436095

HAL Id: tel-01436095

https://theses.hal.science/tel-01436095v1

Submitted on 16 Jan 2017

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

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

NNT : 2016SACLS216

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 582
CBMS Cancérologie : biologie - médecine - santé

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Par

Mme Elisa Grémeaux – Funck-Brentano

Marqueurs prédictifs de réponse aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome cutané métastatique

Thèse présentée et soutenue à Boulogne-Billancourt, le 21 septembre 2016 :

Composition du Jury :
M. Nicolas Meyer, Professeur, Université de Toulouse, Président
M. Lionel Larue, Directeur de Recherche INSERM, Examinateur
M. Jean-Jacques Grob, Professeur, Université d'Aix-Marseille, Rapporteur
M. Laurent Mortier Professeur, Université de Lille 2, Rapporteur
M. Jean-François Emile, Professeur, Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Directeur de thèse
M. Philippe Saiag, Professeur, Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Au Professeur Philippe Saiag, pour votre confiance, votre soutien (moral et financier), et pour votre initiative dans ce projet.

Au Professeur Jean-François Emile, pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, et avoir accepté de co-diriger cette thèse.

Aux Professeurs Jean-Jacques Grob et Laurent Mortier pour avoir accepté d'être rapporteurs, et d'avoir pris le temps de corriger ce travail.

Au Docteur Lionel Larue pour vos conseils lors de mon comité de mi-thèse, et pour avoir accepté de juger ce travail.

Au Professeur Nicolas Meyer pour avoir accepté de juger ce travail.

Au Professeur Caroline Robert, pour avoir accepté d'être référente de mon comité de mi-thèse, et pour m'avoir donnée envie lorsque j'étais interne à l'IGR, alors que ce n'était que les prémices, de participer à ce beau chapitre de l'histoire du traitement du mélanome.

Au Docteur Zofia Hélias-Rodzewitz pour ton encadrement, ta disponibilité, tes compétences, et ta confiance.

Je tiens à remercier toutes les techniciennes de l'équipe, Catherine, Dodo, Mariama, Nathalie, Rim et Yolaine pour votre bonne humeur et l'aide que vous m'avez apportée.

A Amélie Boespflug pour nos échanges constructifs et ta réactivité.

A Iman, pour ton aide ces derniers mois.

A Pierre, pour ton écoute, quotidienne, et tes encouragements.

Merci à ma famille, et en particulier à mon mari Thomas et mes fils Jacques et Gaston, qui apportent un sens à tout ça!

A ma mère, pour ton amour, ton écoute et ton soutien.

A mon père, pour tes messages de soutien brésiliens *via* WhatsApp.

A ma sœur, Anne-Claire, pour ta relecture des virgules.

A ma belle-mère, Isabelle, pour ton aide précieuse dans la logistique des enfants.

A mon beau-père, Christian, pour tes conseils pertinents, et surtout pour ton implication dans les travaux de pharmaco, une valeur ajoutée haut de gamme, en espérant avoir d'autres occasions de publications *'Funck-Brentano and Funck-Brentano'*.

SOMMAIRE

SOMMAIRE ... 3

TABLE DES ILLUSTRATIONS ... 5

LISTE DES ABREVIATIONS ... 7

AVANT PROPOS ... 9

INTRODUCTION ... 12

1. Le mélanome cutané ... 12

1.1 Epidémiologie du mélanome cutané ... 12

1.2 Facteurs de risque du mélanome cutané ... 14

1.3 Diagnostic ... 22

1.4 Classifications du mélanome cutané ... 23

1.5 Facteurs pronostiques du mélanome ... 32

2. Traitements systémiques du mélanome cutané métastatique inopérable ... 46

2.1 Les chimiothérapies conventionnelles ... 46

2.2 Les immunothérapies ... 47

2.3 Les thérapies ciblées ... 48

3. Mécanismes de résistance biologique aux thérapies ciblées du mélanome ... 65

3.1 Concept, et principales voies de signalisations impliquées ... 65

3.2 Mécanismes de résistance intrinsèque (primaire) ... 68

3.3 Mécanismes de résistance acquise (secondaire) ... 75

3.4 Mécanismes de résistance adaptative ... 84

PROJET ET OBJECTIFS ... 91

PARTIE I ... 91

PARTIE II ... 98

PARTIE I - LA CHARGE ALLELIQUE MUTEE DES ONCOGENES *BRAF* ET *NRAS* : IMPACT DU DESEQUILIBRE ALLELIQUE ... 104

1. La charge allélique mutée *BRAF* V600E ... 104

1.1 Article 1 : Variations *BRAF* mutant allele percentage in melanomas, *BioMed Central Cancer*, 2015 ... 104

1.2 La charge allélique de *BRAF* V600E, biomarqueur prédictif de la réponse aux inhibiteurs de BRAF ? (Données non publiées) ... 115

2. La charge allélique mutée de *NRAS* ... 142

2.1 Article 2 : Increase in *NRAS* mutant allele percentage during metastatic melanoma progression, *Experimental Dermatology*, 2016 142

2.2 Article 3 : Frequent allelic imbalance in *NRAS* mutant melanomas (manuscrit en préparation, Poster 9578 #183, ASCO 2016) 147

PARTIE 2 - LA CONCENTRATION PLASMATIQUE DU VEMURAFENIB : UN INDICATEUR DE PROGRESSION ? 172

1. Article 4 : A LC/MS/MS micro-method for human plasma quantification of vemurafenib. Application to treated melanoma patients, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014 172

2. Article 5 : Plasma vemurafenib concentrations in advanced *BRAF* V600^{mut} melanoma patients: impact on tumour response and tolerance, *Annales of Oncology*, 2015 178

3. Article 6 : Reply to the letter to the editor 'Plasma vemurafenib concentrations in advanced *BRAF* V600^{mut} melanoma patients: impact on tumor response and tolerance' by Funck-Brentano et al., *Annales of Oncology*, 2015 186

DISCUSSION GENERALE / PERSPECTIVES 196

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 204

ANNEXES 227

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Représentation schématique de 2 sous-types de mélanomes sur peau photoexposée : les mélanomes sur peau chroniquement photoexposée (« chronically sun-damaged » : CSD) et les mélanomes sur peau photoexposée par intermittence (« non-chronically sun-damaged » : non-CSD). 16
Figure 2. La voie MAPK..... 26
Figure 3. Voies d'activation oncogéniques altérées dans le mélanome..... 31
Tableau 1. Classification TNM (tumeur, ganglions, métastases) et stades cliniques TNM/AJCC des mélanomes cutanés. 33
Tableau 2. Synthèse des résultats d'efficacité et de tolérance de 3 essais de phase III ayant comparé un inhibiteur de BRAF en monothérapie à une thérapie combinée par inhibiteur de BRAF + inhibiteur de MEK dans le mélanome métastatique muté *BRAF* V600..... 63
Figure 4. Interactions entre la voie MAPK et la voie PI3K-PTEN-AKT dans les mélanomes mutés *BRAF* V600E..... 67
Figure 5. Schéma résumant les principaux mécanismes de résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF. 81
Figure 6. Représentation des 3 domaines structuraux de BRAF. 92
Figure 7. Représentation schématique des mécanismes majeurs augmentant la charge allélique mutée..... 95
Figure 8. Modèles représentant la coexistence des différents mécanismes à l'origine des variations de la charge allélique mutée. 96
Figure 9. Intervalle thérapeutique d'un médicament. 99
Tableau 3. Fraction de médicament éliminée, exprimée en pourcentage (%) de dose administrée, en fonction sa demi-vie. 100
Figure 10. Courbe des concentrations plasmatiques d'un médicament en fonction du temps, lors d'une perfusion continue : notion d'équilibre pharmacocinétique. 101
Figure 11. Immunoempreinte reflétant l'activité de la voie MAPK dans les lignées cellulaires de mélanome (A) et dans les échantillons humains de mélanome (B) mutés *BRAF* V600E en fonction de leur CAM de *BRAF* V600E (%).....121
Figure 12. Immunoempreinte de principales protéines intervenant dans les mécanismes de résistances primaires aux inhibiteurs de BRAF dans les lignées cellulaires de mélanomes (A) et dans les échantillons humains (B) en fonction de leur CAM de *BRAF* V600E. 123
Figure 13. Sensibilité au vemurafenib des lignées cellulaires de mélanomes mutées BRAF V600E, selon leur statut homozygote ou hétérozygote. 125
Figure 14. Graphique représentant les IC50 moyennes du vemurafenib des différentes lignées cellulaires de mélanomes en fonction du statut homozygote ou hétérozygote de la mutation *BRAF* V600E. 126

Figure 15. Représentation graphique (*Heat map*) d'une analyse de regroupements (*clusters*) non supervisée de la présence ou non de mutation des différents gènes mutés dans 10 lignées cellulaires de mélanomes, d'après les données du CCLE, selon le statut homozygote (HOMO) ou hétérozygote (hetero). 127
Figure 16. Graphique représentant la pureté tumorale estimée selon la méthode d'Aran *et al.* (2015) en fonction de la CAM de *BRAF* des échantillons mutés *BRAF* du TCGA (n = 470). 129
Figure 17. Graphique représentant le taux mutationnel global en fonction de la charge allélique de *BRAF* V600 de chaque échantillon tumoral de mélanome (n = 102), préalablement sélectionné pour avoir une pureté tumorale > 65%. 130
Tableau 4. Caractéristiques anatomo-cliniques des mélanomes primitifs mutés *BRAF* V600E et leur évolution, selon la CAM de *BRAF* V00E (≤ 60% *versus* > 60%). 133
Figure 18. Histogramme des CAM de *BRAF* V600E. 134
Figure 19. Courbes de Kaplan-Meier de survie sans progression et de survie globale des patients traités par inhibiteurs de BRAF en monothérapie selon leur CAM de *BRAF* V600E avant traitement (≤ 60% *versus* > 60%).....135
Figure 20. Concept général de la médecine « optimisée ».....197

LISTE DES ABREVIATIONS

AJCC	American Joint Commitee on Cancer
ALK	Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase
ATP	Adénosine triphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BAP1	Breast cancer 1 (BRCA1) associated protein 1
BPTF	Bromodomain PHD finger transcription factor
BRAF	Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1
CAF	Cancer associated fibroblasts
CAM	Charge allélique mutée
CCND1	Gène codant pour la cycline D1
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDK6	Cyclin-dependent kinase 6
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CPV	Concentration plasmatique de vemurafenib
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
CRAF	V-Raf-1 Murine Leukemia Viral Oncogene-Like Protein 1
DUSP	Dual specificity phosphatases
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded (fixé dans le formol puis inclus en paraffine)
FISH	Fluorescent in situ hybridization
FOXD3	Forkhead box D3
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
HAS	Haute Autorité de Santé
HDAC	Histone déacétylase
HGF	Hepatocyte growth factor
HOXD8	Homeobox D8
HR	Hazard ratio
HSP90	Heat shock protein 90
IC50	Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition
IGF	Insulin growth factor
IGFR-1	Insulin-like growth factor 1 receptor
IL	Interleukine
LDH	Lactate déshydrogénases
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDM2	Murine double minute 2

MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
mTor	Mammalian Target of rapamycine
NF1	Neurofibromatosis 1
NRG1	Neuroréguline 1
PAX3	Paired box 3
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PD1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
pRb	Protéine du rétinoblastome
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
RTK	Récepteur à activité Tyrosine Kinase
SSM	Superficial spreading melanoma
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TGFβ	Transforming growth factor β
TIL	Tumor infiltrate lymphocytes (lymphocytes infiltrant la tumeur)
UV	Ultra-violets
VEGF	Vascular endothelial growth factor

AVANT PROPOS

L'incidence du mélanome cutané ne cesse d'augmenter en Europe. Il s'agit du 9ème cancer le plus fréquent en France, avec 11 176 nouveaux cas et 1 672 décès recensés en 2012. Ainsi, l'enjeu de santé publique est majeur, ce d'autant que le principal facteur de risque évitable est l'exposition aux rayonnements ultra-violets (UV) naturels (soleil) ou artificiels (cabine de bronzage) et que la guérison est possible en cas de dépistage des lésions précoces suivi d'un traitement chirurgical adapté. Toutefois, le mélanome a un fort potentiel métastatique. La réponse peu fréquente aux chimiothérapies conventionnelles caractérise le mélanome métastatique avancé, mais malgré l'arrivée de nouveaux traitements, le pronostic reste sombre.

Ces nouveaux traitements systémiques du mélanome métastatique sont de deux types : les thérapies ciblées d'une part, avec les inhibiteurs de BRAF (*murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1*) et les inhibiteurs de MEK (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*), et les immunothérapies d'autre part, avec les anti-CTLA4 (anticorps dirigés contre le CTLA4, ou *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4*) et les anti-PD1 (anticorps dirigés contre le récepteur PD1 ou *programmed cell death 1*). Bien que ces traitements aient de meilleurs taux de réponse, certains patients ne répondent pas et un grand nombre échappe à ces traitements, en raison notamment de l'émergence de mécanismes de résistance.

De nombreux travaux ont été publiés sur les mécanismes impliqués dans la résistance aux thérapies ciblées. On distingue la résistance primaire, ou intrinsèque, indépendante du traitement reçu, ou secondaire, consécutive à la prise du traitement. On distingue également la résistance biologique, impliquant des mécanismes survenant au niveau tumoral ou du microenvironnement tumoral, de la résistance pharmacologique survenant au niveau de l'individu.

Afin de diminuer la survenue de mécanismes de résistance biologique, notamment génétiques, les stratégies de traitements combinés ont permis d'allonger la durée médiane de survie des patients, mais les échappements sont encore trop fréquents.

De plus, nous manquons d'éléments de suivi des patients permettant de prédire qu'elle va être la réponse au traitement, ou la durée de cette réponse. Il a été montré que ces traitements étaient plus efficaces chez les patients ayant une masse tumorale globale initiale faible. Ainsi, l'identification de marqueurs capables de détecter la survenue de métastases avant qu'elles ne soient cliniquement évidentes, ou prédictifs de la durée sans progression, améliorera la prise en charge de ces patients. L'identification de sous-groupes de patients susceptibles d'avoir un meilleur taux de réponse, ou à risque de rechuter, pourra guider le choix du traitement. En effet, le panel d'options thérapeutiques dans le mélanome, qui ne cesse de se complexifier, nécessitera des algorithmes dans lesquels ces marqueurs aideront à définir le moment de l'instauration, la durée du traitement ou encore la dose à administrer. En outre, l'optimisation de la sélection de sous-groupes de patients à traiter grâce à de tels marqueurs prédictifs de réponse aux traitements pourra avoir des conséquences bénéfiques en termes de coût.

Toutefois, la réponse au traitement met en jeu de multiples paramètres, potentiellement réversibles, dépendants de la tumeur (pouvant elle-même être hétérogène), du patient, et de la survenue de mécanismes de résistance, rendant complexe la mise en évidence de tels marqueurs.

Le but de ce travail de recherche était d'étudier deux marqueurs, mesurables en pratique clinique lors du suivi des patients, pour leur potentiel prédictif de réponse aux inhibiteurs de BRAF en monothérapie, l'un biologique et l'autre pharmacologique :

- la charge allélique mutée (CAM) des oncogènes *BRAF* et *NRAS* (*Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*)
- la concentration plasmatique de vemurafenib (CPV).

Le choix de ces deux marqueurs s'est fondé sur des observations cliniques de quelques cas de patients avec :

- des réponses prolongées de plus de 2 ans chez des patients traités par vemurafenib en monothérapie pour des mélanomes métastatiques stade IV avec de forte masse tumorale initiale, et dont l'analyse moléculaire des prélèvements avant traitement révélait une CAM de *BRAF* V600E élevée.

- des CPV basses chez des patients progressant sous vemurafenib en monothérapie.

Après une synthèse sur le mélanome et ses traitements au stade métastatique, seront exposés en introduction les différents mécanismes de résistance biologique aux thérapies ciblées. Un rappel sur l'état de la question posée et des objectifs du projet de recherche précéderont les résultats, qui seront principalement présentés sous la forme d'articles : publiés ou en cours de finalisation, et commentés. La discussion générale apportera une synthèse et proposera des perspectives.

INTRODUCTION

1. Le mélanome cutané

Le mélanome est une tumeur maligne due à une prolifération de mélanocytes. Près de 95% des mélanomes sont de siège cutané, la tumeur se développant à partir de mélanocytes présents à la jonction du derme et de l'épiderme. Le mélanome cutané peut apparaître en peau saine (dans 70 à 80% des cas) ou sur un nævus (prolifération bénigne des mélanocytes) préexistant.

1.1 Epidémiologie du mélanome cutané

L'incidence des mélanomes cutanés varie considérablement selon les pays, l'ethnie, l'âge, le sexe et le mode de vie.

Chaque année dans le monde, 132 000 cas de mélanomes cutanés sont diagnostiqués (d'après l'organisation mondiale de la santé, 2007), dont la majorité provient d'Amérique du Nord, d'Europe, de Nouvelle-Zélande et d'Australie. Parmi tous les cancers, l'incidence du mélanome est celle qui augmente le plus, avec une augmentation constante depuis 50 ans dans les populations blanches (entre 3 à 7% par an selon les pays).

Les taux d'incidence du mélanome continuent d'augmenter dans la plupart des pays européens (principalement au Sud et à l'Est), alors qu'en Australie, en Nouvelle-Zélande, aux États-Unis, au Canada, en Israël et en Norvège, les taux tendent à se stabiliser (voire à baisser) au cours des dernières années, notamment chez les adultes jeunes (25-44 ans) (1, 2). Ces résultats soutiennent l'effet bénéfique des mesures de prévention primaire. Des études australiennes soulignent toutefois que les flux migratoires des populations peuvent induire un biais en raison d'un nombre croissant de personnes à faible risque dans la

population australienne ce qui diminuerait le taux d'incidence du mélanome (3). Toutefois, ce biais n'expliquerait pas à lui seul la baisse des taux d'incidence observée (4, 5).

D'une manière générale, l'augmentation de l'incidence du mélanome est attribuée aux changements d'attitude envers l'exposition au soleil. En 1920, Coco Chanel, suite à un coup de soleil malencontreux, lança la mode de la peau pigmentée par le soleil, symbole de beauté, de santé et de réussite. Actuellement, des données récentes suggèrent que l'augmentation de l'incidence du mélanome s'explique principalement par l'augmentation de la détection des mélanomes de faible épaisseur (6), en raison de l'amélioration des techniques de surveillance (7) ou des dépistages réguliers (6), en parallèle d'une prise de conscience croissante du risque de cancers de la peau dans la population générale (8). Des études de cohortes réalisées dans plusieurs pays indiquent que cette augmentation de l'incidence se poursuivra au moins au cours des deux prochaines décennies, avec un doublement des taux d'incidence, principalement en raison du vieillissement de la population et de la croissance démographique (2).

En France, on comptait en 2012, 11 176 nouveaux cas de mélanome cutané (5 429 hommes et 5 747 femmes), situant le mélanome au 9ème rang des cancers. L'âge médian au diagnostic était de 61 ans chez l'homme et 64 ans chez la femme. Le nombre de décès dû au mélanome était de 1 672 (954 hommes et 718 femmes), représentant 1,1% des décès par cancer ; le taux de mortalité a été relativement stable entre 1995 et 2005. La survie spécifique au mélanome à 5 ans était, en 2012, de 85% (9).

Bien que les mélanomes de l'enfant soient rares, un mélanome peut apparaître à tout âge. Le mélanome est l'un des principaux cancers responsables de décès prématurés chez les personnes encore en activité, avec l'impact économique en termes de coût par décès le plus élevé de tous les cancers en Europe (10).

Malgré l'augmentation de l'incidence, la faible progression du taux de mortalité peut s'expliquer par l'effet des campagnes de prévention et de dépistage précoce, le principal facteur pronostique du mélanome étant l'épaisseur tumorale. Un traitement chirurgical adapté à un stade précoce permet généralement la guérison, mais ne peut assurer l'absence de risque de métastases. En effet, le mélanome est le cancer avec le plus grand potentiel

métastatique, dans lequel un faible volume tumoral peut être à l'origine d'une dissémination métastatique majeure. Environ 10 à 15% des patients vont développer des métastases, rendant le pronostic du mélanome très sombre, avec une survie médiane qui était avec les traitements classiques de 6 à 9 mois, et un taux de survie à 3 ans de 10 à 15% (11). La technique du ganglion sentinelle, réalisant l'exérèse de micrométastases ganglionnaires régionales, n'a pas démontré de bénéfice de la survie globale (12), de même qu'aucun traitement adjuvant dans les stades I à III après un traitement chirurgical, en dehors de l'interferon alpha qui l'améliore très marginalement dans certaines études. Pour les stades IV, les chimiothérapies conventionnelles n'ont pas démontré de bénéfice sur la survie.

L'arrivée depuis ces dernières années de nouvelles molécules avec d'une part, les thérapies ciblées avec les inhibiteurs de BRAF (vemurafenib, dabrafenib) et de MEK (trametinib, cobimetinib) (13-16) et d'autre part, les immunothérapies avec les inhibiteurs de point de contrôle de la réponse immune (anti-CTLA4 : ipilimumab et anti-PD1 : pembrolizumab et nivolumab) (17-19), a révolutionné la prise en charge des patients avec un mélanome cutané métastatique.

1.2 Facteurs de risque du mélanome cutané

Le mélanome cutané est une maladie multifactorielle et hétérogène qui résulte des effets et des interactions de facteurs environnementaux, phénotypiques et génétiques.

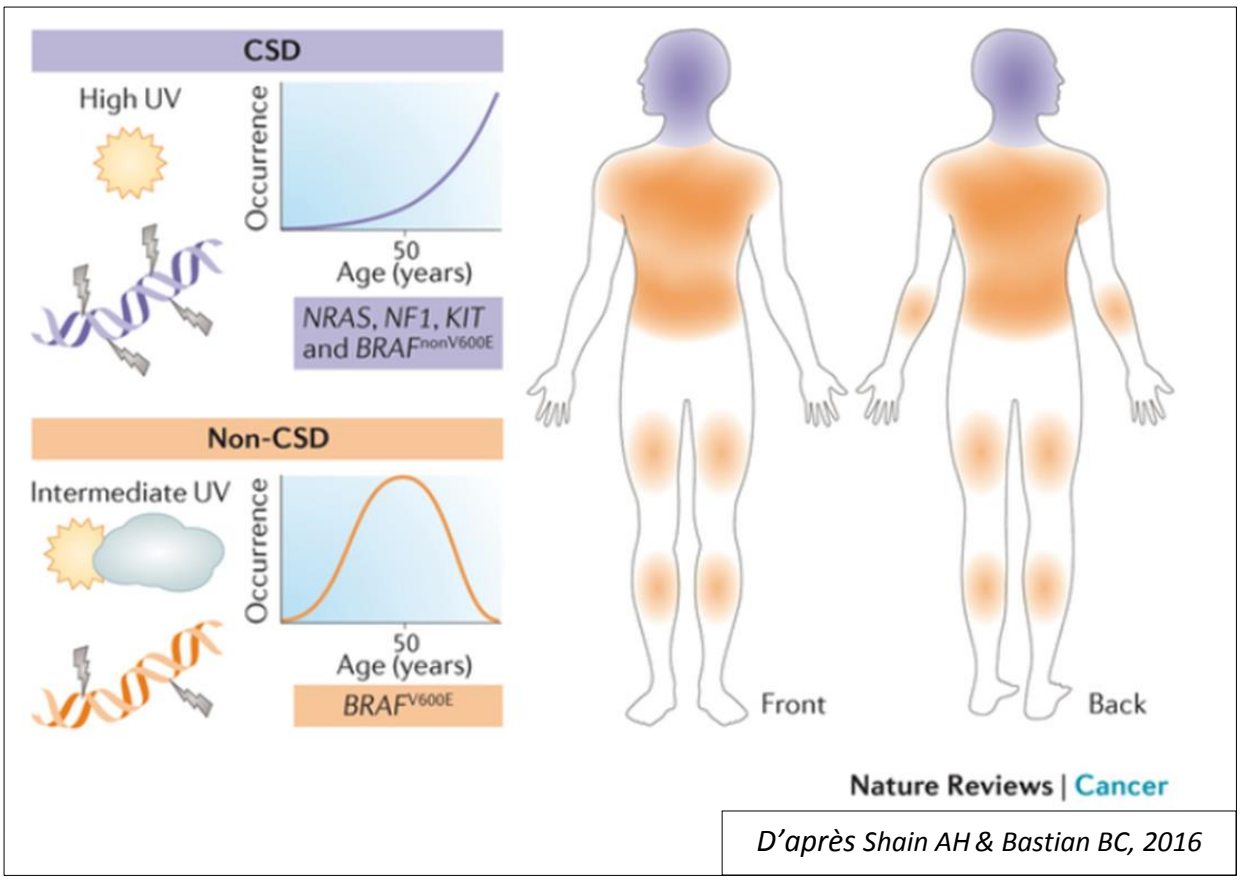
1.2.1 Facteurs de risque environnementaux

Le principal facteur de risque environnemental du mélanome cutané est l'exposition aux rayons UV (20) ; toutefois la relation entre le risque de mélanome cutané et le degré d'exposition aux rayons UV est complexe.

Les rayons UV favorisent la cancérogenèse en provoquant des lésions sur l'ADN (acide désoxyribonucléique), avec la formation notamment de dimères de pyrimidine, des mutations de gènes, un stress oxydatif, une inflammation et une immunodépression (21).

L'influence de l'exposition solaire est certaine mais son importance et son mode d'action restent discutés. La fréquence des mélanomes augmente chez les caucasiens lorsque la latitude décroît (22). La majorité des mélanomes cutanés chez les caucasiens survient sur peau exposée au soleil, par opposition aux zones acrales (exposition solaire faible) et muqueuses (exposition solaire nulle). Une étude réalisée en Australie a montré que l'application quotidienne d'écrans solaires diminuait significativement le risque de développer un mélanome, et notamment le risque de mélanome invasif (23). Une exposition solaire continue « passive » ne serait pas un facteur de risque de mélanome, alors qu'une exposition solaire intentionnelle « active » et l'utilisation de lampe à UV (UV artificiels) augmentent considérablement le risque de mélanome (24). Les coups de soleil, notamment sur le tronc, sont associés à un risque élevé de mélanome (25), de même que des coups de soleil douloureux avant l'âge de 20 ans (26). L'exposition aux UV artificiels (cabine de bronzage) augmente également le risque de mélanome (27), ce risque est majoré en cas de première exposition avant l'âge de 35 ans (28). Paradoxalement, les mélanomes développés sur des régions cutanées exposées au soleil de façon intermittente, telle que le tronc ou les extrémités proximales, se développent à un plus jeune âge, alors que les mélanomes sur des sites plus souvent photoexposés tels que le visage, les oreilles et le cou se développent plus tard dans la vie (29, 30).

On distingue ainsi deux types de mélanomes sur peau photoexposée, selon qu'ils surviennent sur peau chroniquement exposée au soleil ou de façon intermittente. Ces deux types de mélanomes se différencient par le site anatomique, le degré d'exposition cumulée aux rayons UV, l'âge de survenue, le nombre de mutations (dont la majorité est induite par les UV), et les types d'altérations oncogéniques. Les mélanomes sur peau chroniquement exposée ont un nombre élevé de mutations et ont plus souvent des mutations de *NF1* (*Neurofibromatosis 1*), *NRAS*, *BRAF* (autres que V600E) ou *KIT*. En revanche, les mélanomes sur peau photoexposée par intermittence ont un nombre plus modéré de mutations, et sont plus souvent porteurs de la mutation *BRAF* V600E (Figure 1) (31).



D'après Shain AH & Bastian BC, 2016

Figure 1. Représentation schématique de 2 sous-types de mélanomes sur peau photoexposée : les mélanomes sur peau chroniquement photoexposée (« chronically sun-damaged » : CSD) et les mélanomes sur peau photoexposée par intermittence (« non-chronically sun-damaged » : non-CSD).
Les mélanomes sur peau exposée au soleil ont des différences cliniques, histopathologiques et moléculaires en fonction du degré des dommages induits par le soleil sur la peau.

Les mélanomes cutanés ont le taux moyen de mutations le plus élevé de tous les cancers (16,8 mutations /Mb) (32-34), en raison de l'effet mutagène des UV, soit en moyenne 150 à 200 mutations par mélanome, dont seulement 10 à 15 sont pilotes et surviennent de façon récurrente. Les mutations induites, connues sous le terme de signature UV sont caractérisées par des transitions C vers T ou CC vers TT au niveau des séquences dipyrimidiniques. Les gènes suppresseurs de tumeurs *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), *PTEN* (*Phosphatase and TENsin homolog*) et *TP53* (*Cellular Tumor Antigen* p53) sont les principaux gènes pilotes ayant des mutations induites par les UV. Des signatures UV sont également retrouvées dans les mutations des oncogènes *RAC1* (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), *TERT (Telomerase reverse transcriptase*), et *PPP6C* (*Protein*

Phosphatase 6, Catalytic Subunit). Par ailleurs, les mutations des oncogènes *BRAF* et *NRAS* n'ont pas de signature UV (35).

1.2.2 Facteurs de risque génétiques

Prédisposition familiale

Un contexte familial est retrouvé dans environ 5 à 10% des mélanomes cutanés (36). Dans ces familles, la susceptibilité de développer un mélanome est héritée selon un mode de transmission autosomique dominante avec une pénétrance incomplète (37). Un sujet avec un antécédent familial de mélanome (au moins un apparenté au premier degré) a un risque relatif 2 à 3 fois plus élevé de développer un mélanome que la population générale (20) ; ce risque augmente si l'apparenté au premier degré a de multiples mélanomes primitifs ou si au moins 2 apparentés au premier degré ont un mélanome cutané unique (38). Les patients avec de multiples mélanomes primitifs sont plus fréquemment porteurs d'une susceptibilité génétique (39). Un antécédent personnel de mélanome augmente le risque de faire un deuxième mélanome de 5 à 7% (40, 41). Dans 2% des mélanomes cutanés, familiaux ou sporadiques, une mutation délétère de l'un des gènes de prédisposition est retrouvée, le plus souvent dans le gène *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), et plus rarement dans le gène *CDK4* (*Cycline-dependent kinase 4*) (42).

Le gène *CDKN2A* a été le premier gène de susceptibilité au mélanome identifié, il y a plus de 20 ans (43). Il code pour 2 protéines $p16^{INK4A}$ et $p14^{ARF}$. Le taux de détection des mutations de ce gène varie selon les zones géographiques, et augmente avec le nombre de cas dans une famille (44, 45) ; en France, il a été estimé à 32% dans les familles avec au moins 3 cas de mélanome, et à 13% dans les familles avec 2 cas (46). De plus, des mélanomes primaires sporadiques peuvent aussi avoir une mutation de *CDKN2A*. En cas d'antécédent personnel de 2 mélanomes primitifs sporadiques, la fréquence des mutations de *CDKN2A* est autour de 9% (39, 47). La probabilité de présence d'une altération de *CDKN2A* dans des mélanomes sporadiques primitifs chez des patients sans antécédent personnel ou familial de mélanome est autour de 1% (48). De plus, les individus porteurs d'une mutation germinale de *CDKN2A*

ont un risque accru de développer un cancer du pancréas principalement, mais aussi un cancer du sein, du poumon ou d'autres cancers liés au tabac (49-51).

Quelques années après la découverte du gène *CDKN2A*, le gène *CDK4*, également à haute pénétrance, a été identifié comme gène de susceptibilité au mélanome cutané (52). Les mutations de *CDK4* empêchent la fixation de la protéine p16, et sont considérées comme activatrices (42). A ce jour, 17 familles avec des mutations de ce gène ont été décrites, toutes ces mutations affectent le même acide aminé (Arginine 42) de la protéine (53).

Les progrès technologiques récents ont permis d'identifier de nouveaux gènes de susceptibilité au mélanome cutané, qui, à l'instar de *CDKN2A* et *CNK4,* ont une pénétrance élevée : les gènes *CXC*, des gènes impliqués dans la maintenance des télomères tels que *TERT*, *POT1* (*protection of telomeres 1*), *ACD* (*adrenocortical dysplasia protein homolog*), *TERF2IP* (*telomeric repeat binding factor 2 interacting protein*), et le gène *BAP1 (Breast cancer 1 (BRCA1) associated protein 1*). Les mutations du gène *BAP1* induisent également une augmentation du risque de développer des mélanomes oculaires, des mésothéliomes (54), des carcinomes du rein à cellules claires (55), des cholangiocarcinomes (56), des carcinomes de la thyroïde (57), des carcinomes basocellulaires (58), et probablement d'autres cancers.

Malgré la découverte de ces nouveaux gènes, environ la moitié des cas de mélanomes familiaux n'ont aucune altération des gènes de prédisposition identifiée. Dans ces familles, des mécanismes polygéniques ou épigénétiques sont probablement en cause, ainsi que la possibilité de mutations rares dans d'autres gènes de susceptibilité à pénétrance élevée qui n'ont pas encore été découverts (59).

De plus, des variants du gène *MC1R* (*melanocortin 1 receptor*), du gène *MITF* (*microphthalmia-associated transcription* factor) ou du gène *SLC45A2* (*solute carrier family 45 member* 2) ont été identifiés comme conférant un risque intermédiaire de développer un mélanome (59, 60). Le variant du gène *MITF* p.E318K affecte la *« sumoylation »* de la protéine, cette mutation augmente le risque de mélanome cutané (X5), notamment de type nodulaire, et pourrait également induire une augmentation du risque de développer un cancer du rein (61) ou un cancer du pancréas (62). Le gène *PARK2*, codant pour la protéine PARKIN, connu pour être le principal gène de prédisposition de la maladie de Parkinson, a

été identifié récemment comme augmentant le risque de développer un mélanome de 5 à 6 fois (63).

D'autres gènes de prédisposition ont été découverts, mais dont les mutations confèrent un risque beaucoup plus faible. Ces gènes sont impliqués dans différents processus biologiques ; on distingue un groupe de gènes impliqué dans le nombre de nævus, la pigmentation de la peau ou dans la couleur des yeux (ASIP (agouti *signaling protein)*, *TYR* (*tyrosinase*), *TYRP1* (*tyrosinase-related protein 1*), *OCA2* (*oculocutaneous albinism II*), *MTAP* (*methylthioadenosine phosphorylase*), *PAX3* (*paired box 3*), un groupe de gènes impliqué dans le système immunitaire (*IL-10* (*interleukine 10*), *IL-1β* (*interleukine 1 β*), *TNF-α* (*Tumour necrosis factor α*), *IRF4* (*Interferon regulatory factor 4*)), ou encore des gènes du système du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, et un autre groupe de gènes lié au métabolisme (*CYP2D6* (*Cytochrome P450 2D6*), *GSTM1* (*Glutathione S-transferase Mu 1*), *GSTT1* (*Glutathione S-transferase theta-1*), *GSTP1* (*Glutathione S-Transferase Pi 1*), *FTO* (*Fat mass and obesity-associated protein*), *VDR* (*vitamin D receptor*)). Le gène *PARP1* (*poly(ADP-ribose) polymérase1*) codant pour une enzyme associée à la chromatine et modifiant les protéines du noyau, est également associé à un risque augmenté de mélanome (60).

Le xeroderma pigmentosum est une maladie génétique due à une mutation d'un des gènes de réparation de l'ADN qui induit une extrême sensibilité cutanée aux UV chez les patients atteints, avec une augmentation du risque de mélanome supérieure à 2000 par rapport à la population générale (64). De nombreuses mutations sur divers gènes sont décrites (principaux gènes : *XPA* et *XPC*). La fréquence de cette maladie est rare en Europe et en Amérique du Nord, mais est beaucoup plus élevée en Asie et au Moyen-Orient (1/100 000 naissances). L'effet de la mutation se combine avec l'intensité des UV sous certaines latitudes. Au Maghreb, les mélanomes de ces patients sont plutôt de type Dubreuilh sur des zones découvertes. Des mutations de p53 sont détectées dans 60% des cas, des mutations induites par les UV ont également été retrouvées sur le gène *PTEN* (65).

Des analyses génétiques et une consultation d'onco-génétique sont recommandées en cas d'antécédent personnel ou familial (deux apparentés au premier ou deuxième degré) d'au moins 2 cas de mélanomes cutanés invasifs diagnostiqués avant 75 ans, ou de l'association

d'un mélanome cutané invasif avec un autre cancer (mélanome oculaire, cancer du pancréas, cancer du rein, mésothéliome, ou tumeur du système nerveux central) (42).

Nævus

Les nævus sont des proliférations bénignes de mélanocytes.

Les caucasiens ont en moyenne 25 nævus communs acquis sur la peau, qui mesurent au moins 2 mm de diamètre (23, 24). Les nævus communs apparaissent lors des deux premières décennies et ont tendance à disparaître après la sixième décennie. Ils surviennent principalement sur le tronc et les extrémités, et sont plus rares sur les zones protégées du soleil. Bien que ces nævus soient peu susceptibles d'évoluer vers un mélanome, leur prévalence élevée les rend contributeurs d'une grande partie des mélanomes. Les nævus communs acquis sont très fréquemment mutés *BRAF* V600E (66). De plus, ils seraient associés à un risque de développer des mélanomes de sous-type « sur peau photoexposée par intermittence » (31), ce sous-type ayant également une proportion élevée de mutation *BRAF* V600E y compris en association à un nævus (66). On retrouve, dans les exérèses de mélanome survenant sur peau photoexposée par intermittence, un nævus associé dans environ 30% des cas, mais certaines études vont jusqu'à retrouver 90% de nævus dans des mélanomes de type superficiel extensif, (type histologique le plus souvent associé aux mélanomes survenant sur peau photoexposée par intermittence). En revanche, des nævus associés ne sont généralement pas retrouvés dans les mélanomes survenant sur peau chroniquement photoexposée (67). Un nombre élevé de nævus communs acquis est associé au risque de développer un mélanome (risque relatif X 1,5 pour les patients ayant 16 à 40 nævus, et X 7 pour les patients ayant 101 à 120 nævus) (68).

Les nævus atypiques surviennent chez les malades porteurs de mélanomes non-familiaux mais aussi chez les individus sans antécédent de mélanome. Dans ces cas sporadiques, le risque de dégénérescence maligne est beaucoup plus faible (inférieure à 10%). Toutefois, les patients avec plus de 5 nævus atypiques ont un risque 10 fois plus élevé de développer un mélanome (68).

Dans le nævus congénital géant (souvent porteur de mutation de *NRAS*), le risque de dégénérescence est plus élevé, mais reste inférieur à 10%. Pour le nævus congénital non-géant, ce risque est inférieur à 2,5%.

L'apparition d'un mélanome dans les nævus d'Ota ou les nævus bleus est possible.

Phototype

Le phototype est le phénotype qui traduit la capacité de la peau à bronzer. Il est très fortement corrélé à la couleur des cheveux et à la pigmentation de la peau.

La classification de Fitzpatrick décrit 6 phototypes (I à VI) (69). Le phototype I, caractérisé par des cheveux roux, une peau claire, des éphélides, et une incapacité à bronzer, est le phototype au risque le plus élevé de mélanome (70).

En résumé, les principaux facteurs de risque de développer un mélanome, qui nécessitent une surveillance clinique attentive sont :

- des antécédents personnels ou familiaux de mélanome
- des antécédents de coups de soleil très sévères
- plus de 50 nævus acquis communs de plus de 2 mm de diamètre (ou plus de 100 quelle que soit la taille)
- plus de 5 nævus atypiques
- les nævus congénitaux (surtout géants)
- un nombre élevé d'éphélides
- un phototype cutané I ou II.

1.3 Diagnostic

La plupart des mélanomes apparaissent *de novo*, en peau saine. Le diagnostic de mélanome est suspecté lorsqu'une lésion pigmentée présente au moins l'un des critères cliniques ABCDE :

Asymétrie (A)

Bords (B) irréguliers

Couleur (C) inhomogène (brun, noir, rosé, marron, dépigmentée)

Diamètre (D) supérieur à 6 mm

Evolution (E) récente (modification en taille, forme, couleur).

La dermoscopie complète l'examen clinique des lésions pigmentaires, et les éléments sémiologiques augmentent significativement la performance de diagnostic clinique de mélanome (71, 72). Les critères morphologiques pris en compte pour l'analyse de l'image dermatoscopique sont :

- l'aspect général de la lésion (couleur et forme)
- la texture du réseau pigmentaire
- l'asymétrie
- la présence d'éléments spécifiques (pseudopodes, stries radiales, zone de régression)
- l'analyse du réseau vasculaire.

Plusieurs algorithmes dermatoscopiques utilisant ces différents critères ont été proposés pour distinguer les lésions mélanocytaires bénignes et les mélanomes. Ainsi, dans la méthode de Menzies, une architecture pigmentaire symétrique ou une couleur unique homogène sont des critères dermoscopiques d'élimination du diagnostic de mélanome (lésions bénignes). En l'absence de ces critères, la présence d'un des 10 critères positifs suivants renforce la suspicion clinique de diagnostic de mélanome : voile blanc bleu, points bruns multiples, pseudopodes, courants radiaires, dépigmentation cicatricielle, points et globules périphériques, couleurs multiples, multiples «grains de poivre» gris bleu, réseau pigmentaire atypique et architecture globale parallèle (plantes et paumes uniquement) (73).

Le diagnostic est confirmé par l'examen histologique, après avoir réalisé l'exérèse de la totalité de la lésion (ou sur une biopsie partielle dans certains cas de mélanome étendu ou

sur le visage). L'examen histologique confirme tout d'abord la nature mélanocytaire de la prolifération. L'analyse histologique requière parfois l'utilisation de marqueurs immunohistochimiques mélanocytaires (protéine S100, HMB45, Melan-A/MART-1). Puis, le diagnostic de malignité repose sur des critères architecturaux (disparition du gradient de maturation, ascension pagétoïde, etc) et cytologiques (atypies nucléocytoplasmiques, mitoses).

1.4 Classifications du mélanome cutané

1.4.1 Classification histologique

Un mélanome cutané peut se développer à partir d'un nævus préexistant congénital (géant ou non) ou acquis (commun ou atypique) ou *de novo* en peau saine, en deux temps (phase horizontale puis verticale), ou en un temps (phases verticale et horizontale synchrones).

La classification histologique des mélanomes prend en compte l'architecture de la composante intra-épidermique latérale de la tumeur, et du contexte cutané (peau sénile avec dommages actiniques, peau normale, peau glabre, muqueuse).

La composante mélanocytaire intra-épidermique latérale est le témoin histologique d'un développement en deux phases. Elle doit être présente sur au moins un des bords de la zone invasive (ou à faible distance en cas de zone de régression).

Formes avec composante latérale

On distingue 4 types histologiques de mélanomes avec composante intra-épidermique latérale : le mélanome à extension superficielle ou SSM (*superficial spreading melanoma*) (60 à 65% des cas), le mélanome de Dubreuilh (5 à 12% des cas), le mélanome acro-lentigineux/mélanome muqueux (2 à 13% chez les caucasiens), et le mélanome avec composante latérale inclassable (<10% des cas).

La composante latérale du mélanome SSM présente souvent un aspect pagétoïde (migration intra-épidermique de cellules isolées ou en amas comme dans la maladie de Paget du sein).

Les mélanomes de Dubreuilh sont caractérisés par une composante latérale lentigineuse majoritaire, dans un contexte de peau sénile avec des dommages actiniques importants (élastose).

Les mélanomes acro-lentigineux ont aussi une composante latérale lentigineuse, survenant sur une peau glabre (paumes et plantes), de même que les mélanomes survenant sur une muqueuse (mélanome muqueux).

Si la composante latérale ne répond à aucun des critères de chacune des 3 catégories, elle est dite inclassable.

Le mélanome SSM est le type histologique de mélanome le plus fréquent. Il prédomine aux membres inférieurs chez la femme et dans le dos chez l'homme. Une phase de croissance horizontale précède en général une phase de croissance verticale de plusieurs mois. Le mélanome de Dubreuilh survient principalement chez le sujet âgé, se situe sur des zones photoexposées (visage, décolleté, bras) et peut être de grande taille. Les dommages actiniques observés témoignent d'une exposition solaire chronique. Les mélanomes avec une composante latérale à prédominance lentigineuse (Dubreuilh, acro-lentigineux/muqueux) sont de croissance lente.

Formes sans composante latérale

Le mélanome nodulaire (10% des cas) se caractérise par une composante latérale absente ou très réduite (< 3 crêtes épidermiques). Les mélanomes avec un nodule clinique reposant sur une lésion plane ou entouré d'une zone de régression (mélanome pseudo-nodulaire) ne sont pas considérés comme de vrais mélanomes nodulaires.

Mélanomes non classables

Il s'agit des mélanomes impossibles à classer dans les catégories décrites ci-dessus.

1.4.2 Classification moléculaire

La découverte des mutations « points chauds » dans le codon V600 de BRAF (40 à 50% des mélanomes) et dans le codon Q61 (ou les codons G12 et G13, moins fréquemment) de NRAS (20 à 25%), qui activent la voie MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) (Figure 2), a conduit au développement d'inhibiteurs de kinase hautement sélectifs qui ciblent la voie MAPK (74, 75).

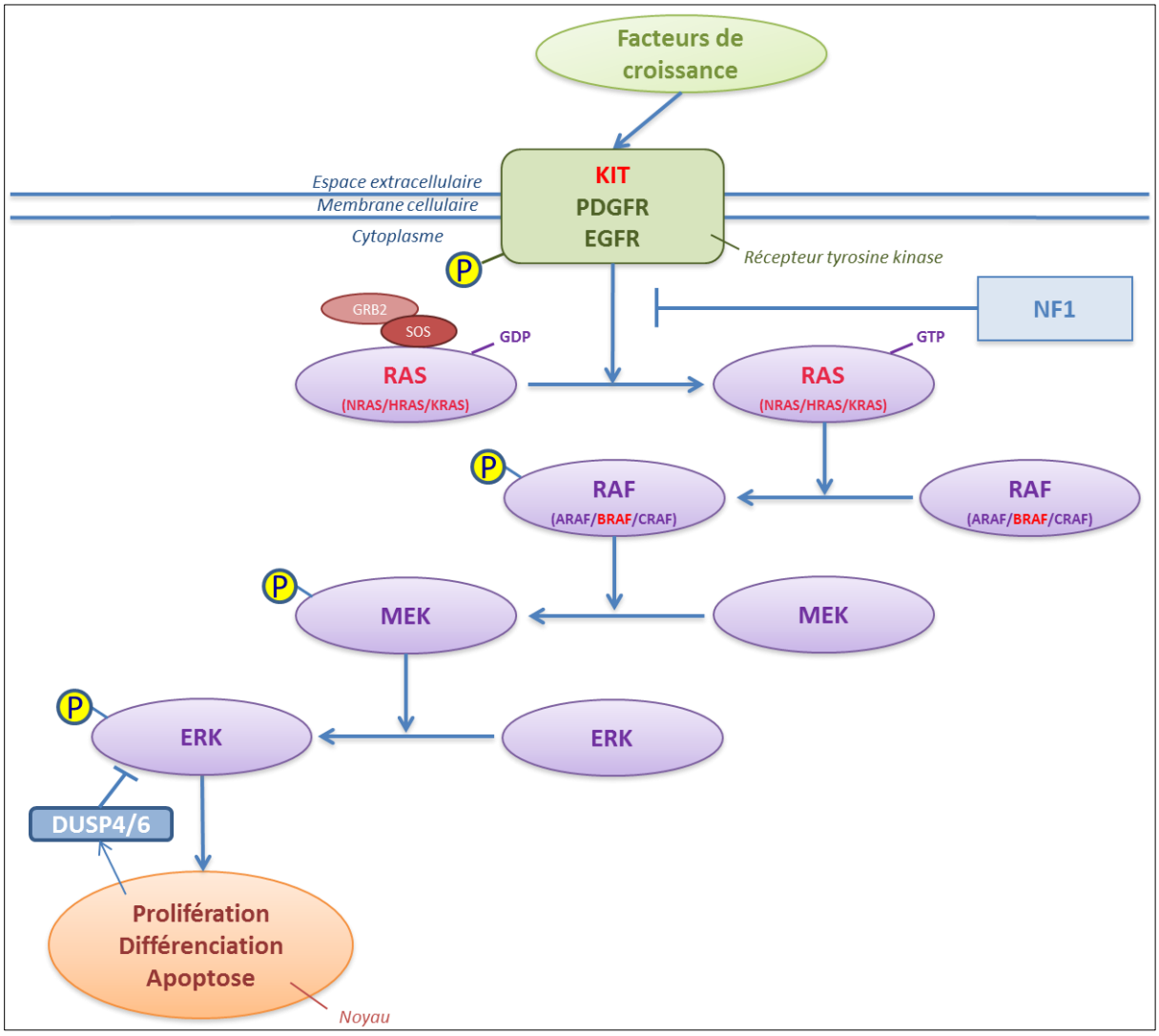


Figure 2. La voie MAPK.

Suite à la liaison d'un facteur de croissance à la partie extracellulaire du récepteur membranaire à activité tyrosine kinase (RTK), celui-ci est autophosphorylé, et recrute l'un des 3 membres de la famille RAS (isoformes H-, K-, et NRAS). RAS active une cascade de phosphorylation impliquant RAF, MEK et ERK (Extracellular signal-regulated kinases). Les isoformes A-, C-, et BRAF sont des sérine-thréonine kinases, qui s'associent en homo- ou hétérodimères pour permettre la transduction du signal. Les protéines RAF activées vont phosphoryler en cascade les protéines MEK (MEK1 et MEK2) puis ERK (ERK1 et ERK2), appartenant à la famille des MAPK. L'activation d'ERK permet sa translocation dans le noyau, ce qui va avoir pour effet d'activer des facteurs de transcription impliqués dans la croissance, la prolifération, la différenciation cellulaire, et l'apoptose. Dans le mélanome, des mutations activatrices ou des amplifications d'oncogènes, tels que KIT, BRAF, NRAS, ont pour effet l'augmentation de l'activité kinase des protéines mutées correspondantes (en rouge). La protéine NF1 régule négativement RAS en favorisant sa forme inactive (RAS-GDP). Dans le mélanome, des mutations du gène suppresseur de tumeur NF1 induisent la perte d'expression de la protéine NF1 (en bleu), ce qui a pour effet de lever l'inhibition sur RAS et d'activer la voie MAPK. Parmi les gènes induits par l'activation d'ERK, certains comme ceux codant pour les phosphatases DUSP (dual specificity phosphatases), vont conduire à la déphosphorylation d'ERK créant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif.

Une étude récente du groupe TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), par une analyse génomique de 333 mélanomes cutanés, a établi une classification génomique des mélanomes cutanés, les regroupant en 4 sous-types ayant des implications thérapeutiques potentielles selon leur statut mutationnel *BRAF*, *RAS* (*H/K/N*), *NF1* ou « triple-sauvage » (non muté *BRAF*, *RAS* ni *NF1*) (Figure 3) (34).

Sous-type muté *BRAF*

Le plus grand sous-type est constitué par la présence de mutations de *BRAF*, retrouvé dans cette étude dans 52% des cas (n = 166), dont 145 (87%) sont sur le codon V600 (124 V600E, 18 V600K, 3 V600R) et 5 K601E. Comme cela avait déjà été montré dans d'autres études précédentes (66), les mutations de *BRAF* V600 et K601 sont anti-corrélées aux mutations de *NRAS* (mutations le plus souvent mutuellement exclusives). En revanche, les mutations de *BRAF* qui ne sont pas des mutations « point-chaud » peuvent survenir avec des mutations de *RAS* (H/K/N) ou de *NF1*.

Sous-type muté *RAS*

Parmi les gènes de la famille *RAS*, le gène *NRAS* est le plus fréquemment muté, retrouvé dans 28% des mélanomes dans cette étude, incluant des mutations « point-chaud » touchant principalement le codon Q61 (35 Q61R, 28 Q61K, 11 Q61L, 4 Q61H), et plus rarement les codons G12 (4 G12R/D/A) et G13 (3 G13R/D).

Les mutations des gènes *HRAS* (n = 4) et *HRAS* (n = 3) étaient moins fréquemment retrouvées, et étaient toutes mutuellement exclusives des mutations de *BRAF* et de *NRAS*.

Sous-type muté NF1

Dans cette étude, une mutation de *NF1* était retrouvée dans 14% des mélanomes (n = 47), dont plus de la moitié étaient prédictives d'une perte de fonction de la protéine NF1. NF1 est une protéine activatrice de GTPase. Les GTPases sont des enzymes qui lient et hydrolysent la guanosine triphosphate (GTP), pour donner une guanosine diphosphate (GDP). Ainsi, la protéine NF1 est connue pour réguler négativement l'activité de RAS *via* son activité intrinsèque GTPasique, et la perte de fonction induite par la mutation de *NF1* peut être vue comme une voie alternative pour activer la voie MAPK.

En effet, dans cette cohorte, *NF1* était muté dans 38,7% des mélanomes ayant des mutations « non point-chaud » de *BRAF* et de *NRAS* (29/75) et dans environ 70% des mélanomes ayant des mutations « non point-chaud » de *BRAF* et de *NRAS* et ayant une signature UV (26/38).

De plus, les mutations de *NF1* étaient anti-corrélées avec les mutations « point-chaud » de *BRAF*, mais pas pour les mutations « point-chaud » de *RAS*.

Sous-type « triple-sauvage »

Ce sous-type de mélanome « triple-sauvage » était un groupe hétérogène de tumeur (n = 46 ; 14%) caractérisé par l'absence de mutations « point-chaud » de *BRAF*, *K/H/NRAS* ou *NF1*.

Caractéristiques de ces 4 sous-types

Les patients du sous-type muté *BRAF* sont plus jeunes que les patients des autres sous-types, alors que ceux du type muté *NF1* sont significativement plus âgés. Cependant, aucune différence de survie globale n'a été mise en évidence dans cette étude entre les différents sous-types. On note également que dans cette étude 17% des mélanomes mutés *BRAF* ont également une mutation ou une délétion de *PTEN* (34), pouvant induire une résistance primaire aux inhibiteurs de BRAF (voir chapitre sur les mécanismes de résistance).

Une méta-analyse récente a également montré que les mélanomes mutés *BRAF* étaient associés de façon significative à un jeune âge, à une localisation sur le tronc et sur peau photoexposée par intermittence, au type histologique SSM et à des mélanomes de stade avancé (76).

Les mutations de *NRAS* sont associées à des mélanomes plus épais (Breslow > 1mm) et à des index mitotiques plus élevés que les mélanomes mutés *BRAF* V600E ou non mutés *BRAF* ni *NRAS* (77). Certains inhibiteurs de MEK montrent des résultats encourageants dans le traitement des mélanomes mutés *NRAS* (voir chapitre traitements).

Les mélanomes mutés *NF1* sont porteurs de plus de mutations somatiques, avec un taux de 39 mutations / Mb (notamment de gènes impliqués dans les RASopathies), soit plus du triple des trois autres sous-groupes (34, 78).

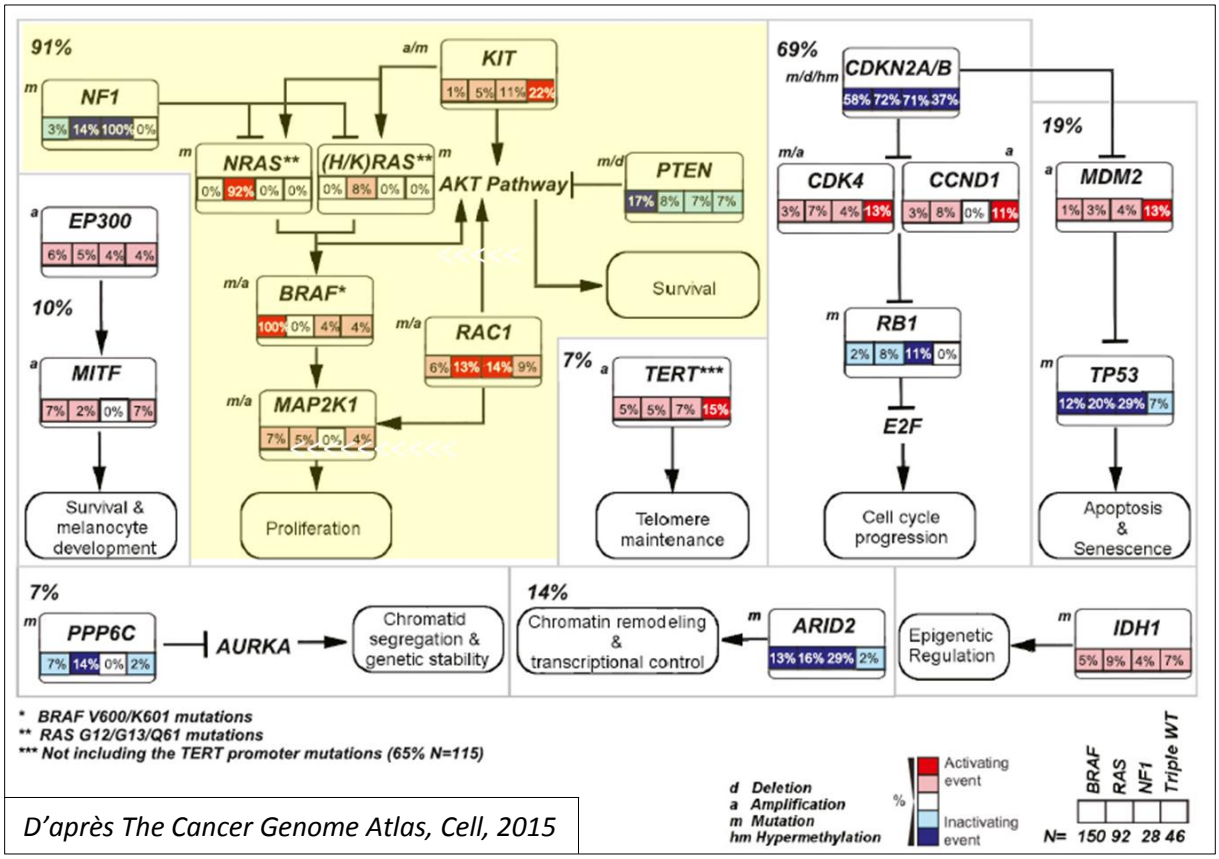
Des études fonctionnelles ont montré que la suppression de l'expression de NF1 activait RAS dans la plupart, mais pas dans tous les cas de mélanomes, suggérant l'implication d'autres régulateurs de RAS (78). Les mélanomes mutés *NF1* auraient une surexpression de CRAF (*V-Raf-1 Murine Leukemia Viral Oncogene-Like Protein 1*), soulignant une activation différente de la voie MAPK (34). Ainsi, les mélanomes avec une perte de NF1 seraient susceptibles de répondre aux inhibiteurs de MEK (79-81).

Dans les mélanomes « triple-sauvages », un nombre plus élevé de mutations de *KIT*, d'amplifications géniques focales, comme *MDM2* (*murine double minute 2*), *CDK4* ou *CCND1* (gène codant pour la cycline D1) et de réarrangements structuraux complexes étaient observés (Figure 3) (34). En effet, des mutations et des amplifications de *KIT* sont retrouvées dans 3% de la totalité des mélanomes, et dans 35 à 40% des mélanomes acro-lentigineux et muqueux (surtout des fosses nasales ou ano-génitaux) ou également dans les mélanomes sur peau chroniquement photoexposée (mélanomes de Dubreuilh) (82). Les mutations de *KIT* identifiées dans la plupart des cas correspondent à des substitutions de nucléotides, sont mutuellement exclusives des mutations *BRAF* et *NRAS*, et touchent souvent le domaine kinase de KIT, ce qui a pour effet une activation constitutionnelle de l'activité kinase de KIT, entrainant une activation de la voie MAPK et de la voie PI3K/AKT (phosphoinositide 3-kinase/AKT). L'efficacité de l'inhibition de KIT dans les mélanomes mutés ou amplifiés *KIT* a été rapportée avec différentes molécules telles que l'imatinib (83-88), le dasatinib (89), le nilotinib (90), ou encore le sunitinib (91, 92) et le sorafenib (93), cependant la durée d'efficacité de ces traitements en monothérapie est limitée.

Des amplifications et une surexpression d'AKT3 étaient fréquemment observées dans les mélanomes mutés *RAS*, *NF1* et « triple-sauvages » (34), ce qui peut avoir d'éventuelles implications thérapeutiques dans certains sous-types notamment pour des traitements ciblant à la fois MEK et la voie PI3K/AKT.

De plus, des études récentes utilisant des séquençages nouvelle génération (NGS) ont permis d'identifier de nouvelles aberrations génétiques qui montrent l'hétérogénéité biologique des mélanomes et leurs implications pronostiques et thérapeutiques potentielles (32, 94, 95).

Parmi ces récentes découvertes, la mutation de *RAC1* P29S dans laquelle une proline est substituée par une sérine, a été identifiée. RAC1 est une GTPase, membre de la famille des GTPases Rho. La mutation *RAC1* P29S est la troisième mutation activatrice la plus fréquente dans le mélanome cutané (survenant dans 4 à 9% des mélanomes sur peau exposée au soleil) après *BRAF* et *NRAS* (32, 34, 95). Elle survient préférentiellement dans les mélanomes non mutés *BRAF* ni *NRAS*, mais la présence de co-mutations est également possible. Contrairement aux mutations de *NRAS* et *BRAF*, cette mutation porte une signature UV, et n'est pas présente dans les nævus. Elle survient précocement lors du développement des mélanomes, et préférentiellement chez les hommes (59%) (96). Cette mutation, la plus fréquente au sein de la famille des Rho-GTPases, entraine une activation de la prolifération et de la migration cellulaire. Telle que RAS, la protéine RAC1 se présente sous forme active (liée au GTP) ou inactive (liée au GDP). La protéine mutée RAC1 P29S a une activité GTPase normale mais augmente les échanges de nucléotides de GDP→GTP, ce qui la maintient principalement dans sa forme active (97), ceci a pour effet d'augmenter sa liaison à la protéine PAK1, puis d'activer MLK3, et d'induire des évènements en aval dans la migration et la prolifération cellulaire (voie alterne d'activation de la voie MAPK) (96), conférant une résistance primaire aux inhibiteurs de BRAF (voir chapitre sur les mécanismes de résistances).



D'après The Cancer Genome Atlas, Cell, 2015

Figure 3. Voies d'activation oncogéniques altérées dans le mélanome.

Pourcentage des principales voies altérées dans les 4 sous-types de mélanomes : mutés BRAF (codons V600/K601), mutés RAS (NRAS/HRAS/KRAS, codons G12, G13 et Q61), mutés NF1 et « triple-sauvages ». Il est précisé s'il s'agit d'une mutation (m, mutation), d'une variation du nombre de copies (a, amplification; d, délétion) ou d'une hyperméthylation (hm, hyperméthylation). Les pourcentages des 2 principales voies de signalisations altérées : la voie MAPK (cascade des protéines RAS-BRAF-MEK-ERK) impliquée dans la prolifération, et la voie PI3K-AKT impliquée dans la survie cellulaire, sont combinées en raison de leur niveau élevé d'interconnectivité (en jaune).

1.5 Facteurs pronostiques du mélanome

1.5.1 Facteurs pronostiques du mélanome primitif

Les facteurs pronostiques du mélanome cutané utilisés en pratique clinique à ce jour sont ceux de la 7ème classification AJCC (*American Joint Commitee on Cancer*), définissant les stades TNM (Tableau 1), qui se distinguent par des taux de survie différents (11). Sont pris en compte des facteurs histopronostiques de la tumeur, la présence de métastases régionales (micro ou macrométastases ganglionnaires, métastases sous-cutanées), la présence de métastase à distance associée au taux de LDH (lactate déshydrogénases).

Classification T	Epaisseur	Ulcération	Stade
T1	**≤1 mm**	a : index mitotique < 1 mm2 et **sans** ulcération	**IA**
		b : index mitotique ≥ 1 mm^2 ou **avec** ulcération	**IB**
T2	**1,01 – 2,00 mm**	a : **sans** ulcération	**IB**
		b : **avec** ulcération	**IIA**
T3	**2, 01 – 4,00 mm**	a : **sans** ulcération	**IIA**
		b : **avec** ulcération	**IIB**
T4	**> 4 mm**	a : **sans** ulcération	**IIB**
		b : **avec** ulcération	**IIC**

Stades I et II, si absence de métastase (N0 et/ou M0)

Classification N	Nombre de ganglions envahis	Masse tumorale	Stade
N1	**1 N+**	a : micrométastase* b : macrométastase**	**IIIA/B** **IIIB/C**
N2	**2 ou 3 N+**	a : micrométastase* b : macrométastase** c : métastase(s) en transit sans ganglion envahi	**IIIA/B** **IIIB/C** **IIIB/C**
N3	**≥ 4 N+** **ou** agglomérat de N+ **ou** métastase(s) en transit avec ganglion envahis		**IIIC**

** Micrométastases = N+ dans un ganglion sentinelle ou un ganglion non décelable cliniquement ou en échographie, enlevé lors d'un curage dit de principe.*
*** Macrométastases = N+ dans des ganglions décelables cliniquement ou en échographie, enlevés lors d'un curage dit de nécessité ou avec extension extra-capsulaire macroscopique.*
Stade IIIA : si T1-4a N1a/N2a et M0
Stade IIIB : si T1-4b N1a/N2a ou si T1-4a N1b/N2b/N2c et M0
Stade IIIC : si T1-4b N1b/N2b/N2c ou tout T N3 et M0

Classification M	Site des métastases	Taux sanguin de LDH	Stade
M1a	Métastases **à distance :** **cutanées ou sous-cutanées ou ganglionnaires**	normal	**IV**
M1b	Métastases **pulmonaires**	normal	**IV**
M1c	**Autres** métastases **viscérales** **Toutes** métastases **à distance**	normal **élevé**	**IV**

Tableau 1. Classification TNM (tumeur, ganglions, métastases) et stades cliniques TNM/AJCC des mélanomes cutanés.

Critères histologiques

Les critères histopronostiques principaux des mélanomes primitifs (stades I et II de la classification TNM/AJCC) sont l'épaisseur tumorale maximale (indice de Breslow), les 5 niveaux d'invasion (niveaux de Clark), l'ulcération, l'activité mitotique, la régression, et les phases de croissance (horizontale/verticale).

Le niveau de Clark (de 1 à 5), reflétant la profondeur de l'infiltration tumorale au sein des différentes couches de la peau (98), était un facteur histopronostique classique mais ne fait plus partie de la nouvelle classification TNM/AJCC (11). Les mélanomes de niveau 1 et l'immense majorité des mélanomes de niveau 2 (en phase de croissance horizontale et en l'absence de signe de régression) ont une évolution favorable. Les niveaux 4 et 5 sont de mauvais pronostic, en raison notamment d'une association (contemporaine ou non) à un fort risque de métastase ganglionnaire (plus de 50%). Le niveau 3 est un niveau intermédiaire de pronostic incertain avec un patient sur trois risquant d'avoir un envahissement ganglionnaire. Le pronostic des mélanomes de niveau 3 est modulé par d'autres facteurs histopronostiques tels que l'épaisseur tumorale, l'activité mitotique et la présence ou non d'une ulcération. Ainsi, il était un facteur pronostique important dans les mélanomes de faible épaisseur (≤ 1 mm d'épaisseur), mais lorsque l'activité mitotique a été incluse dans le calcul, le niveau de Clark ne ressortait plus comme facteur pronostique indépendant. C'est pourquoi, dans l'ancienne classification TNM/AJCC, il subdivisait les mélanomes T1 (≤ 1 mm d'épaisseur), et qu'il a été remplacé par l'activité mitotique dans la nouvelle classification TNM/AJCC (11). De plus, le niveau peut être difficile à déterminer en cas de régression, dans les cas de mélanomes développés sur nævus préexistants, dans certaines localisations (cuir chevelu, pieds, mains, doigts), ou encore en cas d'élastose majeure. Il ne s'applique pas aux mélanomes muqueux (sauf éventuellement pour les niveaux 1 et 5). Toutefois, une étude récente propose un algorithme prenant en compte le niveau de Clark (99).

L'indice de Breslow, défini par l'épaisseur tumorale maximale entre la couche granuleuse épidermique la plus haute et la cellule tumorale la plus profonde, est le paramètre le mieux corrélé au pronostic dans les mélanomes primitifs invasifs. La mesure de l'épaisseur peut être difficile en cas de régression importante, celle-ci pouvant faire sous-estimer le potentiel

évolutif réel du mélanome, ou en cas de nævus préexistant. L'épaisseur du mélanome est corrélée de façon linéaire à la mortalité, et est presque toujours liée à l'activité mitotique. La nouvelle classification TNM/AJCC distingue 4 sous-groupes de mélanomes selon que l'épaisseur tumorale est inférieure ou égale à 1 mm (T1), entre 1, 01 et 2, 00 mm (T2), entre 2, 01 et 4,00 mm (T3) et supérieure à 4 mm (T4) (Tableau 1) (11).

L'activité mitotique est devenue un critère pronostique des mélanomes primitifs pris en compte dans la nouvelle classification TNM/AJCC pour stratifier les mélanomes fins en T1a ou T1b (Figure 4). Elle est définie histologiquement par le nombre de mitoses dermiques par mm^2. Le seuil est de 1 mitose par mm^2. Le risque métastatique augmente pour les mélanomes avec un index mitotique (ou taux de mitoses) ≥ 1 / mm2.

L'ulcération a une grande valeur pronostique (après l'épaisseur et l'activité mitotique), doublant le risque de décès (99); elle est corrélée à l'activité mitotique et à l'indice de Breslow. La présence d'une ulcération est associée à un moins bon pronostic, et serait encore plus péjorative chez la femme. Une taille de l'ulcération supérieure à 6 mm serait également un élément pronostique.

On pourrait penser que la régression est de bon pronostic, témoignant de phénomènes immunitaires intratumoraux. Or, la régression fait sous-estimer l'épaisseur tumorale et donc le risque métastatique. Ainsi, la présence d'aspects histologiques de régression est associée à un moins bon pronostic.

Selon de nombreux auteurs, les mélanomes primitifs en phase de croissance horizontale ne métastaseraient pas tandis que ceux en phase de croissance verticale ont la capacité de développer des métastases (notion de tumorogénicité).

Des critères accessoires ont été rapportés comme étant corrélés au pronostic des mélanomes primitifs. Ainsi, certains auteurs soutiennent que le mélanome de Dubreuilh serait le type histologique de mélanome avec le meilleur pronostic ; les lésions polypoïdes seraient de moins bon pronostic que des lésions planes considérées de bon pronostic (mais probable biais de corrélation avec l' épaisseur tumorale) ; le type cellulaire aussi interviendrait (mélanomes fusocellulaires purs de meilleur pronostic que les mélanomes globocellulaires ou mixtes) ; les mélanomes cutanés achromiques seraient de plus mauvais

pronostic (mais possiblement diagnostiqués plus tardivement). La présence de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) est corrélée à une meilleure survie globale. La présence d'une invasion vasculaire est de mauvais pronostic, de même qu'une angiogénèse importante ou un neurotropisme (notamment dans les mélanomes desmoplastiques). Les invasions vasculaires sont à différencier des métastases en transit, définies par des foyers tumoraux malins cutanés mesurant plus de 0,05 mm de diamètre et situés à au moins 0,5 mm de la masse tumorale principale. Ces métastases en transit sont classés N dans la classification TNM/AJCC (Tableau 1) (11).

Critères moléculaires

Il est clairement montré que les mélanomes mutés *BRAF* sont associés à des mélanomes de type SSM, surviennent sur peau photoexposée de façon intermittente, chez des patients plus jeunes (notamment avec un plus jeune âge de la première métastase) (31, 34, 100-103), et que les mélanomes mutés *NRAS* sont associés à des mélanomes de type nodulaire ou à des mélanomes plus épais, et surviennent préférentiellement sur peau photoexposée chroniquement (104, 105).

Cependant la valeur pronostique des mutations de *BRAF* et de *NRAS* est encore discutée.

Plusieurs études n'ont pas retrouvé d'association entre le statut mutationnel de *BRAF* ou *NRAS* des mélanomes primitifs non métastatiques (stade I et II) avec la survie (105-109).

Nagore *et al.* ont montré que la présence d'une mutation de *BRAF* dans les mélanomes primitifs aux stades localisés (stades I et II) était un facteur pronostique indépendant de la survie sans récidive, mais pas de la survie globale (110).

Une des rares études prospectives sur ce sujet, comprenant 196 cas de mélanomes stades I à III, avec un suivi médian de 92 mois, avant toute initiation de traitement pas inhibiteurs de la voie MAPK, a montré récemment que la survie spécifique au mélanome était moins bonne en présence d'une mutation de *BRAF* ou de *NRAS*. Si l'on ne considérait plus que les mélanomes stades I et II (175 patients), la survie spécifique au mélanome était plus courte chez les patients avec des mélanomes mutés *BRAF* (tant *BRAF* V600E que *BRAF* V600K) que ceux avec des mélanomes non mutés, après ajustement de l'épaisseur. Dans ce groupe de

mélanomes stades I-II, l'association entre la survie et la présence de la mutation de *NRAS* n'était plus statistiquement significative. Le délai entre le moment du diagnostic et l'apparition de métastases à distance a pu être étudié chez 33 patients ; parmi les patients avec un diagnostic initial de mélanome aux stades I-II, en analyse multivariée, ce délai était nettement plus court chez les patients atteints d'un mélanome mutés *BRAF*, alors qu'aucune association n'était retrouvée entre le statut mutationnel *NRAS* et ce délai (111).

Dans une autre étude récente, portant sur 912 mélanomes primitifs (tous stades confondus), aucune différence de survie spécifique au mélanome, quel que soit le statut mutationnel *BRAF*, *NRAS* ou non muté, n'a été retrouvée. Par contre, dans les mélanomes stades T2b ou plus (classification TNM/AJCC), considérés à haut risque de métastases, le risque de décès lié au mélanome était 3 fois plus élevé lorsqu'ils étaient mutés *BRAF* ou *NRAS* par rapport aux mélanomes non mutés, après ajustement sur les autres facteurs pronostiques (âge, sexe, site) ; cela ne s'observait pas pour les mélanomes mutés *BRAF* ou *NRAS* de plus faible risque (T2a ou moins) (112).

A l'inverse, une autre étude portant sur 437 mélanomes stades I et II, qui ne retrouvait pas non plus d'association entre la survie globale et la présence d'une mutation *BRAF* dans l'ensemble des mélanomes stade I-II, mettait en évidence un impact pronostique de la mutation *BRAF* dans les tumeurs de faible épaisseur (< 1 mm) (106).

Une seule étude s'est intéressée à l'impact pronostique de l'expression de la protéine V600E dans les mélanomes nodulaires ; celle-ci était associée à des épaisseurs tumorales plus élevées, à la présence d'ulcération et à une survie plus courte, indépendamment des autres facteurs. On notera que dans cette étude, le statut mutationnel de *BRAF* V600E détecté par analyse génomique n'était pas associé à la survie (113).

Dans la plupart de ces études, les données de survie sont colligées rétrospectivement, la qualité du suivi n'est pas toujours assurée, et la reproductibilité des résultats n'est pas certaine. Ainsi, d'autres investigations sont nécessaires pour confirmer l'impact pronostique des mutations oncogéniques du mélanome, notamment selon les stades TNM/AJCC.

Autres critères biologiques

D'autres facteurs pronostiques ont été rapportés comme étant prédictifs de l'évolution métastatique des mélanomes à des stades précoces, tels que les taux sériques de vitronectine et de dermcidine (114), et/ou comme ayant une valeur pronostique sur la survie globale, tels que les taux sériques d'YKL-30 (115), ou de microARN (comme miR-15b, miR-221, miR-16, …) (116-118), l'expression de Ki-67 (119), l'expression d'EMMPRIN/CD147 (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*, inducteur de métalloprotéinases) (120), l'expression des protéines MCT1 (*monocarboxylate transporter 1*) et MCT4 (*monocarboxylate transporter 4*) impliquées dans le métabolisme tumoral (121), l'expression de CXR4 (122), ou encore un infiltrat péritumoral lymphocytaire B (dans les mélanomes > 1mm) (123). Cependant, ces études ne sont pas indemnes de biais méthodologiques, et n'ont pas toutes suivi l'ensemble des recommandations pour les études sur les marqueurs tumoraux pronostiques (critères « REMARK », *Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies*) (124).

Critères cliniques

Outre les éléments histologiques, moléculaires ou biologiques, des éléments cliniques, tels que l'âge, le sexe, ou le siège, sont reconnus pour être des facteurs pronostiques du mélanome primitif. Certains auteurs s'étonnent que ces 3 facteurs ne soient pas pris en compte dans la classification TNM/AJCC (99, 125).

A un stade localisé, le pronostic est meilleur chez la femme, avec une meilleure survie globale, une meilleure survie sans récidive et un risque de décès lié au mélanome diminué d'environ 30% par rapport à l'homme (99, 126), ceci indépendamment des facteurs histopronostiques, notamment de l'index mitotique (127). Un mélanome survenu pendant la grossesse (ou dans les 2 ans suivant une grossesse) a le même risque de décès que chez la femme non-enceinte (128, 129).

Les mélanomes de faibles épaisseurs sont plus fréquents avant 50 ans, ainsi le pronostic des mélanomes chute à partir de 50 ans. Les mélanomes de l'enfant, bien que rares, sont d'une extrême gravité.

A l'exception des mélanomes de Dubreuilh, le site ayant le meilleur pronostic est la jambe et celui ayant le plus mauvais pronostic est le dos. Sur les membres, les régions les plus distales sont de meilleur pronostic. Une localisation « *BANS »* (*Back, Arm, Neck, Scalp*), soit du dos, du bras, du cou ou du cuir chevelu, est de moins bon pronostic qu'une lésion dite « non-*BANS* » (130).

Par ailleurs, bien que l'exposition solaire soit un facteur de risque reconnu de cancers de la peau, quelques études suggèrent un effet bénéfique de l'exposition solaire, notamment pendant les vacances, avant la survenue d'un mélanome, sur la survie des patients (131-135). Puisque la principale source de vitamine D est la synthèse cutanée après exposition solaire, une hypothèse pour expliquer ce phénomène serait que l'exposition solaire favoriserait des mélanomes primitifs de faible épaisseur, avec un risque faible de récidives, *via* un effet bénéfique de la vitamine D (136). Une autre hypothèse serait que la synthèse de vitamine D grâce à l'exposition solaire, connue pour son effet bénéfique sur la mortalité totale (137-139) et sur l'incidence de certains types de cancer (140, 141), puisse influencer le pronostic du mélanome (138, 142). Toutefois, notre équipe a montré que le taux sérique de vitamine D (25(OH)-vitamine D3) au moment du diagnostic du mélanome primitif n'était pas un facteur pronostique indépendant des différents facteurs pronostiques connus (épaisseur, ulcération, stade TNM/AJCC), mais que ce sont les variations des taux sériques de vitamine D durant le suivi des patients qui sont associées à un moins bon pronostic (143). On notera néanmoins que le taux sérique de vitamine D est sous le contrôle de multiples voies de régulation et est sous l'influence, outre l'exposition solaire, d'autres paramètres tels que l'inflammation, le régime alimentaire, le sexe, l'indice de masse corporel, le tabagisme et finalement l'état de santé global (144).

1.5.2 Facteurs pronostiques du mélanome métastatique

Stade métastatique régional (stades III)

Au stade ganglionnaire régional (stade IIIA/B/C), le pronostic dépend du caractère micro- ou macroscopique de l'atteinte ganglionnaire, du nombre de ganglions atteints, du site de la

tumeur primitive, de son épaisseur (Breslow), de la présence ou non d'une ulcération, et de l'index mitotique pour les mélanomes ≤ 1mm (145, 146). La présence de métastases en transit intervient également (Tableau 1).

La présence de micrométastase(s) ganglionnaire(s), retrouvée par la technique de recherche du ganglion sentinelle, est un facteur pronostique indépendant qui est associé à une meilleure survie sans récidive. Toutefois, cette technique n'induit pas d'amélioration sur la survie globale (12).

Par ailleurs, la charge tumorale au sein du ganglion sentinelle et sa localisation (sous-capsulaire ou intra-parenchymateuse) ont une valeur pronostique (146). La classification du ganglion sentinelle d'Augsburg-Rotterdam distingue 3 groupes pronostiques en fonction du diamètre maximal de la micrométastase et de l'épaisseur de l'infiltration des cellules tumorales au sein du ganglion (épaisseur mesurée depuis la capsule ganglionnaire jusqu'à la cellule tumorale la plus profonde ; reflétant la localisation sous-capsulaire) :
- AR1 : métastases de diamètre maximum ≤ 0,1 mm et épaisseur d'infiltration ≤ 0,3 mm
- AR2 : dimension entre AR1 et AR3
- AR3 : métastases de diamètre maximum > 1 mm et épaisseur d'infiltration > 1 mm.

Le taux de survie globale à 5 ans serait de 100%, proche de 75%, et < 40% pour les stades AR1, AR2 et AR3 respectivement.

La présence d'une rupture capsulaire est associée à une moins bonne survie sans récidive mais n'agit pas sur la survie globale (147).

Les mélanomes mutés *BRAF* ont été rapportés comme associés à un risque d'envahissement ganglionnaire (micro et macrométastase) au moment du diagnostic du mélanome primitif (101).

Notre équipe a montré qu'au stade métastatique régional ganglionnaire (stade III), la présence de la mutation *BRAF* était associée, en analyse multivariée, à une survie globale plus courte (ainsi qu'un délai entre le moment du diagnostic et l'apparition de métastases à distance plus court) (148). Depuis, deux études ont confirmé ces résultats. L'une a montré que les mélanomes stades IIIB et IIIC mutés *BRAF* étaient associés à un mauvais pronostic en termes de survie sans récidive et de survie globale (149). L'autre a montré que tant la

mutation *BRAF* que la mutation *NRAS* étaient associées, pour les mélanomes stades IIIB et IIIC, à une moins bonne survie spécifique au mélanome par rapport aux mélanomes non mutés (150). Ces données peuvent avoir un impact sur l'utilisation des thérapies ciblées en situation adjuvante.

Par ailleurs, l'immunobiologie du stroma péritumoral influencerait le pronostic des patients au stade III, et serait indépendante du statut mutationnel des tumeurs (34). Plusieurs études ont montré que l'infiltration de lymphocytes ainsi qu'un profil d'expression de gènes associés à la réponse immune, au sein de métastases ganglionnaires de mélanome, sont de bon pronostic pour les mélanomes stade III (34, 150-154). Ces résultats sont en faveur d'un bénéfice clinique des immunothérapies en situation adjuvante pour certains patients avec un mélanome stade III.

Le sexe est également un facteur pronostique en cas de stade avancé avec des métastases ganglionnaires et/ou viscérales ; tout comme dans les stades précoces, le risque de décès liés au mélanome est significativement plus faible chez les femmes par rapport aux hommes, toutefois cette différence tend à diminuer en cas de forte masse tumorale (155).

Stade métastatique à distance (stade IV)

Le mélanome métastatique avancé, correspondant au stade IIIC inopérable et au stade IV, est de mauvais pronostic, avec une survie globale médiane qui était estimée jusqu'à récemment de 6 à 9 mois (156).

Chez les patients qui développent des métastases cérébrales (environ 50% des mélanomes stade IV), la survie globale médiane est réduite, estimée entre 3 et 5 mois (157, 158).

En effet, le site métastatique a une valeur pronostique. Bien que la classification TNM/AJCC ne distingue pas la présence ou non de métastases cérébrales, les mélanomes sont stratifiés selon la présence de métastases à distance viscérales (en distinguant les métastases pulmonaires) ou non viscérales. La présence de métastases à distance non viscérales (ganglionnaires et/ou cutanées/sous-cutanées ; stade M1a), est associée à un meilleur pronostic que la présence de métastases pulmonaires (stade M1b), qui est de meilleur

pronostic que tout autres métastases viscérales à distance (stade M1c), sous réserve que le taux sérique de LDH soit normal (11).

Le nombre de sites métastatiques, bien que non pris en compte dans la classification TNM/AJCC, est aussi un facteur pronostic important (159-161).

Récemment, Long *et al.* ont conclu que 4 facteurs en début de traitement influençaient de façon statistiquement significative la survie sans progression et la survie globale sous bithérapie combinée par dabrafenib et trametinib : le taux sérique de LDH (normal *versus* ≥ 2 fois la limite supérieure de la normale), le nombre de sites métastatiques (< 3 *versus* ≥ 3), le statut de performance ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) (0 *versus* ≥ 1), et le sexe (moins bon pronostic pour le sexe masculin) ; le plus fort facteur de risque de survie sans progression et de survie globale étant le taux sérique élevé de LDH (normal *versus* ≥ 2 fois la limite supérieure de la normale, HR (*Hazard ratio*) 0,29 ; $p < 0{,}0001$ pour la survie sans progression et HR : 0,23 ; $p < 0{,}0001$ pour la survie globale) (162).

D'autres études ont montré qu'un taux sérique élevé de LDH était un facteur prédictif de mauvaise réponse aux traitements du mélanome métastatique (163-165), notamment sous ipilimumab, et peut être un critère de stratification dans des essais cliniques randomisés.

Indépendamment des traitements, un taux sérique de LDH élevé est l'un des facteurs de mauvais pronostic le plus important du mélanome métastatique, classant le mélanome M1c quel que soit le site métastatique à distance (Tableau 1) (11, 145, 163).

Les cellules de mélanome sont dans un environnement hypoxique qui les rend incapables de produire de l'ATP (adénosine triphosphate) à partir du glucose par phosphorylation oxydative, ainsi l'enzyme LDH catalyse la conversion du pyruvate en lactate lorsque la cellule manque d'oxygène (145). Ce n'est pas une enzyme sécrétée, donc un niveau sérique élevé est le reflet d'un surplus éliminé par les cellules de mélanome (145). Un taux sérique de LDH élevé est un facteur de mauvais pronostic indépendant du site tumoral et du nombre de métastases ; il est fortement corrélé à une diminution de la survie dans les stades avancés (145, 166, 167). Cependant, la faiblesse du taux de LDH comme marqueur tumoral est sa mauvaise spécificité. En effet, toute nécrose cellulaire, telle une hémolyse, a pour effet une augmentation du taux sérique de LDH.

D'autres critères mesurables dans le plasma ont été proposés comme étant associés à un meilleur pronostic des mélanomes métastatiques.

Plusieurs études ont montré qu'une augmentation du taux sérique de la protéine S100B était corrélée à une maladie plus agressive et à une réduction de la survie (168-171). Le relargage dans la circulation de la protéine S100B par les cellules de mélanome semble être une conséquence de la mort cellulaire et de l'apoptose et n'est pas lié à une augmentation d'expression (172). De plus, la mesure du taux sérique de la protéine S100B pourrait avoir un intérêt dans le suivi des patients métastatiques sous traitement, puisqu'une diminution du taux sérique de protéine S100B semble être corrélée à la réponse aux inhibiteurs de BRAF (173, 174).

Des taux sériques élevés de MIA (*melanoma-inhibiting activity*) ont également été rapportés comme étant associés à des stades avancés et à un mauvais pronostic. Cependant, ce marqueur a une spécificité nettement moindre que celles des taux sériques de la protéine S100B ou de LDH (175). Combiner les taux de S100 et de MIA augmente la sensibilité et la spécificité ; cette combinaison semble être un bon marqueur pronostique de la survie des patients atteints d'un mélanome métastatique (176).

Les cellules de mélanome synthétisent et sécrètent différents facteurs de croissance et cytokines qui participent à l'angiogenèse, à la croissance tumorale, et au développement métastatique, tels que le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), le FGF (*fibroblaste growth facto*r), l'IL-8 (interleukine-8), ou le TGF-β (*transforming growth factor-β*).

Le VEGF qui joue un rôle dans l'angiogenèse tumorale, contribue à la progression tumorale et aux métastases. Il est surexprimé par les cellules de mélanome et une augmentation du taux sérique de VEGF a été rapportée dans des mélanomes stades IV, et comme étant un facteur pronostique à la fois sur la survie sans récidive et sur la survie globale (177). Cependant, d'autres études n'ont pas confirmé ces résultats (178, 179), et l'utilisation du taux sérique de VEGF comme facteur pronostique est controversée. Une forte incidence de rechute est toutefois observée chez les patients avec une augmentation du taux sérique de VEGF (176).

Une étude a montré que l'IL-8, chimiokine qui participe au recrutement de leucocytes, serait corrélée à la masse tumorale, au stade de la maladie, à la survie ainsi qu'à la réponse thérapeutique aux inhibiteurs de BRAF ou à l'ipilimumab (180).

Le taux de leucocytes, de neutrophiles, de monocytes, ainsi que le rapport neutrophiles/lymphocytes, et le rapport lymphocytes/monocytes seraient des facteurs pronostiques indépendants dans les mélanomes stade IV (181), qui nécessitent d'être confirmés.

La détection dans le sérum des patients avec un mélanome métastatique de matériel tumoral circulant tels que des cellules tumorales circulantes, de l'ADN tumoral circulant ou d'exosomes tumoraux circulants contenant des protéines ou des microARN (182, 183), est une approche intéressante pour l'évaluation pronostique de ces patients et pour le suivi sous traitement (176).

Plusieurs études ont montré l'intérêt pronostique de la détection de cellules circulantes de mélanome, détectées *via* l'utilisation de plusieurs marqueurs, à différents stades (176). Une étude française récente a montré que la présence de cellules tumorales circulantes de mélanome, détectées dans le sang de patients avec un mélanome métastatique, était associée à une moins bonne survie globale (184).

La détection de l'ADN tumoral circulant, qui reflète les caractéristiques génétiques et épigénétiques de la tumeur, peut apporter des informations en rapport avec le développement tumoral, la progression et la réponse au traitement. Cette détection repose sur la mise en évidence d'altérations de l'ADN tumoral circulant, qui incluent des variations de taille, des mutations, des instabilités alléliques ou des modifications épigénétiques (185). Des altérations épigénétiques, telles que des hyperméthylations de certains gènes, ou la détection de microARN circulants ont été décrits comme pouvant être des éléments pronostiques et de suivi thérapeutique des patients atteints de mélanome métastatique (116, 186-190). De plus, la mutation *BRAF* V600E peut être détectée à partir d'ADN circulant dans le sang de patients avec un mélanome à différents stades (191). Récemment, une étude française a montré que la présence d'ADN circulant muté *BRAF* était fortement corrélée à la survie globale, au nombre de sites métastatiques, ainsi qu'aux taux sériques de LDH et de protéine S100B (192). L'ADN muté *BRAF* plasmatique serait donc un facteur

pronostique de survie globale, corrélé à la masse tumorale. De plus, ce marqueur présente l'avantage de prendre en compte une éventuelle hétérogénéité tumorale ; il est également un moyen alternatif de détecter les mutations *BRAF* avant traitement, et pourrait être un outil dynamique de suivi de réponse aux traitements (193).

Au stade métastatique avancé, la valeur pronostique de la présence d'une mutation de *BRAF* ou de *NRAS* est controversée. Certaines études ont montré que les patients au stade métastatique avec des mélanomes mutés *BRAF* ou *NRAS* avaient une survie plus courte que les patients avec des mélanomes non mutés (103, 194, 195). Toutefois, d'autres études n'ont pas retrouvé cette association (105, 196, 197). Des biais de sélection des patients selon les études (la présence de métastases cérébrales ou des taux sériques de LDH élevés sont parfois des critères d'exclusion dans les études) expliquent possiblement ces divergences de résultats. Il a été montré que la présence de mutations *BRAF* ou *NRAS* au moment du diagnostic de mélanome métastatique, augmente le risque de développer des métastases cérébrales (194).

Outre le fait que la présence d'une mutation *BRAF* soit un biomarqueur prédictif de réponse aux inhibiteurs de BRAF, il a été montré que les mélanomes mutés *BRAF*, ainsi que les mélanomes mutés NRAS, auraient une meilleure réponse aux chimiothérapies conventionnelles que les mélanomes non mutés (101) ; cependant ces résultats n'ont pas été retrouvés dans d'autres études (196, 198).

Une étude a examiné l'association entre le niveau d'expression de la protéine BRAF V600E de mélanomes métastatiques avant traitement et le devenir des patients traités par inhibiteurs de BRAF, et n'a retrouvé aucune association entre la survie sans récidive, la survie globale ni la réponse au traitement et l'intensité de l'expression de la protéine BRAF V600E (199).

Par ailleurs, les mélanomes mutés *NRAS* auraient de meilleures réponses aux immunothérapies, possiblement en raison d'une plus forte expression de PD-L1 dans ce sous-groupe de mélanome (200). En revanche, l'expression des gènes associés à la réponse immune, qui serait, tout comme dans les mélanomes stade III, associée à un meilleur pronostic dans les mélanomes stade IV, est indépendante du statut mutationnel (201, 202).

Les mutations du gène suppresseur de tumeur *PTEN* entrainant une perte d'expression de la protéine, sont présentes dans environ 10% des mélanomes, et plus fréquemment dans les mélanomes mutés *BRAF* (34, 203). Deux études ont montré qu'une perte ou une baisse d'expression de PTEN étaient associées à des mélanomes plus agressifs, avec notamment la survenue plus rapide de métastases cérébrales (204, 205). Récemment, une étude a démontré que la méthylation du promoteur de *PTEN* sur les mélanomes primitifs, est un facteur de mauvais pronostique sur la survie.

2. Traitements systémiques du mélanome cutané métastatique inopérable

2.1 Les chimiothérapies conventionnelles

Les différentes chimiothérapies conventionnelles utilisées en France et en Europe pour traiter le mélanome métastatique sont la dacarbazine, la fotémustine, le temozolomide, le paclitaxel et les sels de platine. Ces trois derniers traitements n'ont pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France dans cette indication (utilisés hors AMM). Aucune de ces chimiothérapies n'a démontré un impact sur la survie globale des patients, et les taux de réponse varient selon les séries de 5 à 20% (206).

Avant l'arrivée des nouveaux traitements, le traitement de première ligne était, en l'absence de métastase cérébrale, la dacarbazine ; la fotémustine était proposée en deuxième ligne après échec de la dacarbazine ou en première ligne en cas de métastases cérébrales au nom d'un meilleur passage de la barrière hemato-encéphalique, en fait très faiblement étayé.

Bien qu'il n'ait jamais été démontré que la dacarbazine augmente la survie globale dans des essais randomisés contrôlés, elle a été initialement la molécule de choix la plus souvent comparée aux nouveaux traitements dans les essais randomisés impliquant des patients avec un mélanome métastatique sans métastase cérébrale.

Le témozolomide, prescrit hors AMM, a l'avantage d'une prise par voie orale, et de passer la barrière hémato-méningée en cas de métastase cérébrale.

Le paclitaxel et les sels de platine (cisplatine, carboplatine) ne sont réservés qu'en dernière ligne de traitement, après échec des autres chimiothérapies, en raison d'une moins bonne tolérance, l'efficacité étant similaire.

Aujourd'hui, la place de ces chimiothérapies dites conventionnelles, est restreinte, après échec de différents traitements incluant les thérapies ciblées (pour les mélanomes mutés *BRAF*), les immunothérapies, et de nouvelles molécules testées dans le cadre d'essais cliniques.

En effet, il est important qu'à chaque changement de traitement systémique, la possibilité d'une inclusion dans un essai thérapeutique soit discutée, ainsi que la place de la chirurgie de la métastase, de la radiothérapie complémentaire ou de la radiochirurgie.

L'indication des chimiothérapies conventionnelles est donc aujourd'hui un choix de dernier recours.

2.2 Les immunothérapies

A ce jour, trois molécules d'immunothérapies, appelées inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, ont une AMM aux Etats-Unis et en Europe : l'ipilimumab (anti-CTLA4), le nivolumab (anti-PD1) et le pembrolizumab (anti-PD1), suite à des essais cliniques ayant prouvé leur efficacité, en particulier *versus* la dacarbazine, associée à un profil de tolérance acceptable (17, 19, 207, 208).

L'ipilimumab est un anticorps monoclonal humanisé, qui bloque le CTLA4, un régulateur négatif des lymphocytes T, exprimé par les lymphocytes T ; ce blocage a pour conséquence l'activation et la prolifération des lymphocytes T effecteurs (209).

Le récepteur de mort cellulaire programmée 1 (*programmed cell death 1* ou PD-1), régule négativement la phase effectrice de la réponse lymphocytaire T après s'être lié à son ligand PD-L1 (*Programmed cell death 1 ligand 1*), qui est fréquemment exprimé par les cellules tumorales et dans le microenvironnement tumoral (210). Le nivolumab et le pembrolizumab sont des anticorps monoclonaux qui se lient au récepteur PD-1 ; ainsi, ils bloquent

l'interaction entre le récepteur PD-1 et son ligand PD-L1, libérant le potentiel cytotoxique des lymphocytes T spécifiques de la tumeur.

Très récemment, le 11 mai 2016, la combinaison d'un traitement par ipilimumab et nivolumab a obtenu une AMM en Europe, en raison de sa supériorité par rapport à l'ipilumumab seul, ou au nivolumab seul chez les patients à faible expression de PDL-1, au prix toutefois d'effets indésirables sévères beaucoup plus fréquents (211).

Ces inhibiteurs de points de contrôle immunitaires sont indiqués en première ligne de traitement du mélanome avancé non résécable (stade IIIC inopérable) ou métastatique (stade IV) chez les patients adultes.

Toutefois, selon les recommandations européennes (212), le rapport de la commission de la transparence de la Haute autorité de Santé (HAS) recommande de privilégier le nivolumab et le pembrolizumab en première ligne de traitement des mélanomes non mutés *BRAF* V600, et en deuxième ligne après échec d'une bithérapie ciblée (un inhibiteur de BRAF associé à un inhibiteur de MEK) pour les mélanomes mutés *BRAF* V600. La place du nivolumab et du pembrolizumab en première ligne chez les patients avec un mélanome métastatique muté *BRAF* V600 est débattue (213).

En l'absence de mutation *BRAF*, en deuxième ligne de traitement, après un traitement par anti-PD1, l'ipilimumab représente une option thérapeutique (209, 213).

La place de la combinaison de l'ipilimumab associé au nivolumab n'a pas encore été définie par la commission de la transparence de l'HAS, cependant il est probable que cette option en première ligne ne soit réservée qu'aux mélanomes non mutés *BRAF*.

2.3 Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées disponibles actuellement en France et en Europe dans le traitement du mélanome métastatique concernent exclusivement les mélanomes porteurs d'une mutation de BRAF sur le codon V600.

Il s'agit des inhibiteurs de BRAF qui sont des inhibiteurs sélectifs de la protéine BRAF mutée et des inhibiteurs de MEK, qui sont des inhibiteurs allostériques réversibles et hautement sélectifs de l'activation du signal régulé par MEK1 et MEK2, qui inhibent l'activation de MEK par BRAF et l'activité de la kinase MEK. Ces 2 types d'inhibiteurs effectuent un blocage du signal d'activation de la voie MAPK.

Les inhibiteurs de BRAF seraient non seulement inefficaces (214, 215) mais pourraient être néfastes pour les mélanomes non mutés *BRAF* (216).

En revanche, le traitement des mélanomes porteurs d'une mutation de l'oncogène *NRAS* traités par inhibiteurs de MEK montrent des résultats encourageants (217) mais peu durables dans le temps.

De plus, les études sur mélanomes mutés *KIT* traités par des inhibiteurs de KIT sont également prometteuses, mais les échappements fréquents suggèrent la nécessité probable de devoir tester des traitements combinés.

2.3.1 Les inhibiteurs de BRAF

La première thérapie ciblée à avoir obtenue une AMM est le vemurafenib pour le traitement du mélanome métastatique muté *BRAF* V600, en février 2012, basée sur l'étude de phase III BRIM 3 qui comparait le vemurafenib au traitement de référence par dacarbazine, chez des 675 patients naïfs de traitement. Les résultats de l'analyse intermédiaire de cette étude publiés en 2011 ont montré un bénéfice en survie (HR : 0,37 ; $p < 0,001$), un taux de survie à 6 mois de 84% dans le groupe vemurafenib et de 64% dans le groupe dacarbazine. Le taux de réponse était de 48% pour le vemurafenib et de 5% pour la dacarbazine ($p < 0,001$) (218). Puis, parmi les patients progressant sous dacarbazine, 25% ont pu être traités par vemurafenib (*crossover*). Les résultats de l'analyse de suivi à long terme, publiés en 2014, ont montré que la survie globale médiane était significativement plus longue dans le bras vemurafenib : 13,6 mois *versus* 9,7 mois (HR : 0,70 ; $p = 0,0008$), soit un gain absolu de 3,9 mois ; on observait aussi un gain absolu de 5,3 mois de la survie sans progression médiane grâce au vemurafenib : 6,9 mois *versus* 1,6 mois (HR : 0,38 ; $p < 0,0001$) ; le taux de réponse

objective (réponse complète ou partielle) à 12 mois était de 57% dans le bras vemurafenib (pour la plupart partielle) *versus* 9% dans la bras dacarbazine ($p < 0,0001$) (14). Les patients avec un taux sérique de LDH élevé avant le début du traitement par vemurafenib avaient une survie sans progression et une réponse globale plus courte, mais tiraient tout de même un bénéfice du traitement (14).

Il est important de noter que certains patients ont des réponses très prolongées de 3 voire 4 ans avec le vemurafenib en monothérapie (219).

Dans l'étude BRIM 3, la totalité des patients présentaient des effets indésirables. Les effets indésirables de grade 3-4 les plus fréquents dans le bras vemurafenib étaient les carcinomes épidermoïdes cutanés (19%), les kératoacanthomes (10%) une forme de carcinome épidermoïde cutané, un rash cutané (9%), des anomalies du bilan hépatique (11%), et une neutropénie (9%). Une réduction de dose en raison de la survenue d'effets indésirables était requise chez 38% des patients, et le traitement a dû être interrompu chez 7% des patients (14) (218).

La survenue d'au moins un effet indésirable cutané sous vemurafenib concerne tous les patients. Les plus fréquents sont la survenue de papillomes verruqueux (79%) et d'une hyperkératose palmo-plantaire (60%). Sont observées également très souvent : une éruption périfolliculaire hyperkératosique (55%), une photosensibilité (52%), et une alopécie (45%) (220). L'apparition de nouveaux mélanomes primitifs sous vemurafenib n'est pas rare (215, 221, 222), avec un risque estimé à 21% dans une étude utilisant la dermatoscopie pour l'aide au diagnostic de ces seconds mélanomes primitifs (223). Une activation paradoxale de la voie MAPK sous l'effet des inhibiteurs de BRAF dans les cellules non mutées *BRAF* mais ayant une mutation ou une activation de *NRAS*, *via* la formation d'hétérodimères BRAF-CRAF, a été décrite *in vitro* (216, 224) comme pouvant être une hypothèse physiopathologique de la survenue de ces tumeurs. Récemment, cette hétérodimèrisation BRAF-CRAF a été visualisée *in vivo* dans des tumeurs induites sous inhibiteurs de BRAF (225).

Des études ouvertes de phase II réalisées chez des patients avec des métastases cérébrales traités par vemurafenib (226, 227) ont montré des résultats prometteurs, qui ont été confirmés par une étude comprenant 283 patients traités par vemurafenib en conditions réelles d'utilisation en dehors d'essais cliniques, avec 48% de réponse sur les métastases

cérébrales et un taux de survie globale à 12 mois de 59%. Des lésions de grande taille (5 à 10 mm *versus* < 2 mm), un nombre de métastases cérébrales élevé (≥ 5 *versus* < 2), ou encore des métastases extracraniennes en progression à l'initiation du traitement par vemurafenib étaient des facteurs associés à une diminution de la réponse sur les métastases cérébrales et à un risque augmenté de progression (228). Une étude a retrouvé des concentrations faibles de vemurafenib dans le liquide céphalo-rachidien chez 6 patients avec métastases cérébrales traités par vemurafenib (229), cependant la concentration d'un médicament dans le liquide céphalo-rachidien ne semble pas être le marqueur optimal de substitution de la concentration du médicament au sein du tissu tumoral intracérébral. Par ailleurs, des cas de patients atteints de mélanomes avec une atteinte leptoméningée ayant répondu au vemurafenib ont été rapportés (230, 231).

Le second inhibiteur de BRAF à avoir obtenu en septembre 2013 une AMM en France et en Europe pour le traitement du mélanome métastatique non résécable ou métastatique porteur d'une mutation *BRAF* V600 est le dabrafenib. Dans l'essai de phase III comparant le dabrafenib à la dacarbazine (BREAK-3) chez 250 patients, le critère de jugement principal était la survie sans progression. La survie sans progression médiane était de 5,1 mois dans le bras dabrafenib *versus* 2,7 mois pour la dacarbazine (HR : 0,30 ; p < 0,0001). Le taux de réponse au dabrafenib était de 50%. Des effets secondaires de grade 2 ou plus survenaient chez 53% des patients sous dabrafenib. Seuls 4% des patients développaient un carcinome épidermoïde cutané. La survenue de mélanome était également décrite (3 cas sur les 187 patients). La fièvre était un effet indésirable retrouvé chez 11% des patients. Une adaptation des doses était requise chez 28% des patients, et seulement 3% des patients avaient dû interrompre le traitement en raison de la survenue d'effets indésirables (232).

Les données d'un essai de phase II avec le dabrafenib chez des patients avec métastases cérébrales (BREAK-MB) qui distinguaient 2 cohortes selon la présence d'un traitement local préalable des métastases cérébrales (A) ou non (B), montraient que chez les patients mutés *BRAF* V600E, 39,2 % (A) et 30,8% (B) avaient une réponse intracérébrale, alors que ces taux de réponse étaient plus faibles chez les patients porteurs d'un mutation *BRAF* V600K (6,7% (A) et 22,2% (B)). La survie sans progression médiane des patients mutés *BRAF* V600E était de 16,1 (A) et 16,6 (B) semaines et la survie globale médiane de 33,1 (A) et 31,4 (B) semaines ; pour les patients mutés *BRAF* V600K, la survie sans progression médiane était de

8,1 (A) et de 15,9 (B) semaines et la survie globale médiane de 16,3 (A) et 21,9 (B) semaines (158).

Ainsi, avec des taux de réponse autour de 50%, et un délai médian de réponse rapide (de l'ordre de 6 semaines), les inhibiteurs de BRAF ont été une véritable révolution thérapeutique.

L'encorafenib est également un inhibiteur de BRAF dont un essai de phase III (COLUMBUS) en association avec un inhibiteur de MEK, le biminetinib, en comparaison avec un traitement par vemurafenib ou par encorafenib en monothérapie, chez des patients atteints d'un mélanome métastatique muté BRAF, est en cours (NCT01909453). L'encorafenib aurait l'avantage de n'entrainer ni fièvre ni photosensibilité, effets secondaires fréquents du dabrafenib et du vemurafenib, respectivement.

2.3.2 Les inhibiteurs de MEK

Les inhibiteurs de MEK bloquent également la voie MAPK mais en aval de BRAF. Deux inhibiteurs de MEK, le trametinib et le cobimetinib sont disponibles dans l'arsenal thérapeutique des patients adultes atteints d'un mélanome avancé non résécable ou métastatique porteur d'une mutation BRAF sur le codon V600.

Le seul pouvant être indiqué actuellement en monothérapie est le trametinib, un inhibiteur allostérique des protéines MEK1 et MEK2, sélectif et réversible, qui a été comparé à un traitement par chimiothérapie (dacarbazine ou paclitaxel au choix) lors d'un essai de phase III (Metric), comprenant 322 patients mutés *BRAF* V600E ou V600K randomisés (2:1), avec *crossover* possible en cas de progression. La survie sans progression médiane était de 4,8 mois dans le groupe trametinib *versus* 1,5 mois dans le groupe chimiothérapie (HR : 0,45 ; $p < 0,001$). A 6 mois, le taux de survie globale était de 81% dans le groupe trametinib et de 67% dans le groupe chimiothérapie malgré le *crossover* (HR : 0,54 ; $p = 0,01$). Contrastant avec ce progrès en survie globale, le taux de réponse globale, défini par le pourcentage de patients avec une réponse complète ou partielle selon les critères RECIST (*Response*

Evaluation Criteria In Solid Tumors), était de seulement 22% dans le groupe trametinib *versus* 8% dans le groupe chimiothérapie (p = 0,01) (233).

Les effets indésirables particuliers aux inhibiteurs de MEK, sont de type oculaire, avec 1 à 21% de décollements séreux selon les études, le plus souvent réversibles et de bon pronostic, de type cardiaque avec une diminution de la fraction d'éjection ventriculaire gauche chez plus de 5% des patients et une hypertension artérielle dans 6 à 17% des cas, une augmentation des CPK (créatine phosphokinases), ou encore une éruption cutanée de type acnéiforme (233).

Un deuxième inhibiteur de MEK, le cobimetinib, est également un inhibiteur allostérique réversible de l'activation des protéines MEK1 et MEK2. Compte-tenu de son arrivée plus tardive, le cobimetinib en monothérapie n'a pas été évalué, et a d'emblée été étudié en association avec un traitement par inhibiteur de BRAF, cela sera détaillé ci-après.

D'autres inhibiteurs de MEK, tels que le binimetinib, le selumetinib, ou encore le pimasertib existent mais n'ont pas d'AMM en Europe à ce jour dans le mélanome.

2.3.3 Cas particulier des mélanomes mutés *NRAS*

Actuellement, aucune thérapie ciblée n'a d'AMM en Europe pour le traitement des mélanomes métastatiques mutés *NRAS*.

Outre l'activation de la voie MAPK, les mutations de *NRAS* activent également la voie PI3K-AKT. Ainsi, plusieurs essais sont en cours pour tenter de cibler NRAS par des inhibiteurs de MEK en association à des inhibiteurs de PI3K (234). Cependant, il est difficile de savoir si ces traitements inhiberont suffisamment la voie MAPK pour atteindre un bénéfice clinique aux doses maximales tolérées, et d'autres traitements alternatifs seront peut-être nécessaires (75).

Malgré l'échec d'essais cliniques avec le selumetinib et le trametinib dans les mélanomes mutés *NRAS* (235, 236). Le binimetinib (MEK162) et le pimasertib (AS03026) sont deux

nouveaux inhibiteurs allostériques de MEK qui ont montré des résultats prometteurs dans les mélanomes mutés *NRAS*, avec des taux de réponses de l'ordre de 20% (217, 237).

Un essai randomisé (2:1) de phase III (NEMO) ayant comparé un traitement par binimetinib à la dacarbazine chez des 402 patients atteints d'un mélanome muté *NRAS* Q61, naïfs de traitement ou ayant progressé après un traitement par immunothérapie, a montré un taux de réponse de 15% pour le bras binimetinib *versus* 7% pour la dacarbazine (p = 0,015), une survie sans progression médiane de 2,8 mois dans le bras binimetinib *versus* 1,5 mois dans le bras dacarbazine (faible mais significatif, HR : 0,62), augmentée à 5,5 mois dans le sous-groupe de patients préalablement traité par immunothérapie puis traité par binimetinib, mais aucune amélioration de la survie globale n'était observée (paramètre difficile à évaluer du fait de traitements ultérieurs disponibles dans l'arsenal thérapeutique ayant une assez bonne efficacité). Le profil de tolérance était bon (238).

Bien que cette nouvelle génération d'inhibiteurs de MEK ait des résultats d'efficacité clinique prometteurs dans les mélanomes mutés *NRAS*, leur utilisation sera probablement optimisée par la combinaison avec d'autres thérapies ciblées, ayant pour cibles des protéines telles que RAF, EGFR (*epidermal growth factor receptor*)/PI3K/AKT et CDK4/6, qui sont actuellement évaluées dans des essais cliniques (239).

En outre, l'utilisation de thérapies ciblées pourrait également être associée à des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires tels que les anti-PD1/PD-L1, qui sembleraient apporter un bénéfice clinique aux mélanomes mutés *NRAS*, peut-être *via* une expression plus élevée de PD-L1 dans ce sous-groupe (résultats non significatifs, à confirmer) (240), d'autant qu'une étude récente a montré que les inhibiteurs de MEK augmentaient l'expression des molécules du CMH, la présente de lymphocytes T effecteurs et protégeaient les TIL de l'apoptose (241). Une étude de phase Ib associant un inhibiteur de MEK à un anti-PD-L1 dans le carcinome colorectal a montré une bonne tolérance du traitement (242).

Cibler les formes actives des protéines RAS est difficile, mais la recherche progresse. Ainsi, récemment la molécule ARS853 a été identifiée ; elle se lie à la protéine mutée KRAS G12C lorsqu'elle sous sa forme liée au GDP, empêchant sa conformation active liée au GTP, ce qui a pour effet d'inhiber l'activation de KRAS G12C mutée (sous réserve de la persistance d'une

activité GTPase) sur les voies MAPK et AKT (243, 244). Ces études mettent en évidence la possibilité d'utiliser des informations structurelles pour la conception de nouveaux inhibiteurs d'autres formes activées par des mutations de RAS, et sont très encourageantes pour offrir de nouvelles options thérapeutiques efficaces pour les patients atteints de mélanome muté *NRAS*.

Un essai de phase I incluant des mélanomes mutés *NRAS* testant un nouvel inhibiteur pan-RAF (CCT3833) est en cours (245).

De plus, la détection par des anticorps spécifiques en immunohistochimie de la mutation NRAS Q61R va aider au diagnostic et à la prise en charge de ces patients (Annexe) (246, 247).

2.3.4 Cas particulier des mélanomes mutés *KIT*

Plusieurs essais de phase II ont montré une efficacité des inhibiteurs de KIT chez les patients atteints d'un mélanome porteur d'une mutation ou d'une amplification de *KIT*.

L'équipe de Carvajal *et al.* a rapporté, sur une cohorte de 28 patients, un taux de réponse de l'imatinib de 16%, qui était meilleur en cas de mutations récurrentes sur les « points-chauds » ou avec une charge allélique mutée élevée (si ratio muté/sauvage > 1 : 40% *versus* 0% ; p = 0 ,05) ; une survie sans progression médiane de 12 semaines, et une survie globale médiane de 46,3 semaines (86).

Un autre essai de phase II, qui a traité 43 patients avec des mutations ou des amplifications de *KIT* par imatinib, a montré des résultats prometteurs, avec un taux de réponse de 23%, un taux de survie sans progression à 6 mois de 36,6%, et un taux de survie globale à un an de 53%. Les patients avec des mutations de *KIT* sur l'exon 11 ou 13 avaient une meilleure survie sans progression médiane que ceux qui avaient d'autres aberrations de *KIT* (4 *versus* 2,2 mois ; p = 0,86, résultat non significatif en raison d'un nombre faible de patients). Les patients avec des aberrations multiples avaient également une survie sans progression

médiane plus longue que les autres patients (8 *versus* 3 mois ; p = 0,67), mais le résultat n'était pas non plus statistiquement significatif (87).

Ainsi, la réponse à l'imatinib semble être limitée à un sous-groupe de patients, il reste à savoir si l'effet est fonction du type de mutation ou de la dépendance oncogénique de *KIT*. L'effet semble majoré en cas de mutation, comme le montre un essai de phase II ayant porté sur 24 patients dont 8 (33%) avaient une mutation de *KIT*, 11 (46%) une amplification et 5 (21%) avaient à la fois une mutation et une amplification, traités par imatinib. Le taux réponse était de 29%, exclusivement chez les patients atteints d'un mélanome porteur d'une mutation (54% *versus* 0% ; p = 0,006). Cependant les taux de survie sans progression et de survie globale n'étaient pas statistiquement différents selon le statut mutationnel (88).

Les effets indésirables rapportés dans ces trois essais étaient ceux déjà connus pour l'imatinib, utilisé dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), les plus fréquents étant des nausées, des vomissements, une fatigue, une anémie, un rash cutané ou un œdème périorbitaire.

Deux autres inhibiteurs de KIT, le nilotinib et le dasatinib, ayant une AMM dans la leucémie myéloïde chronique sont encore en phase d'étude dans le mélanome.

Dans une étude de phase II réalisée chez 42 patients atteints d'un mélanome métastatique avec des mutations de *KIT* (25 patients, 59,5%) ou des amplifications (15 patients, 35,7%), ou les deux (2 patients, 4,8%), le taux de réponse global était de 16,7%, et le taux de contrôle de la maladie (incluant les réponses stables) était de 57,1%. La durée médiane de réponse était de 34 semaines. Sur 7 patients répondeurs (1 réponse complète et 6 réponses partielles), 6 avaient des mutations de *KIT* (sur l'exon 11 pour 5 patients, et sur l'exon 17 pour 1 patient), et 1 patient avait une amplification de *KIT*. Le profil de tolérance était acceptable. Ainsi, des réponses durables sont observées avec le nilotinib dans un sous-groupe de patients avec des mutations spécifiques de *KIT* (248).

L'équipe de Carvajal *et al.* a réalisé une étude phase II afin d'évaluer l'efficacité du nilotinib après échec d'un traitement par imatinib, et sur les métastases cérébrales. Ainsi, la conception de cette étude reposait sur 2 cohortes de patients atteints de mélanomes porteurs de mutations ou d'amplifications de *KIT* : (A) patients réfractaires ou intolérants à

un traitement préalable par imatinib (11 patients), et (B) patients avec des métastases cérébrales (8 patients). Après 4 mois de traitement, 3 patients (27%) de la cohorte A avait une réponse contrôlée et 1 patient (12,5%) de la cohorte B. La survie sans progression médiane et la survie globale médiane étaient de 3,3 et de 9,1 mois respectivement chez tous les patients traités. Ainsi, le nilotinib peut être un traitement permettant d'obtenir un contrôle de la maladie chez les patients atteints d'un mélanome métastatique porteur d'aberrations de *KIT* et dont la maladie progresse après un traitement par imatinib. Cependant, l'efficacité du nilotinib en cas de métastases cérébrales est limitée (90).

Le dasatinib a un profil de tolérance moins bon, amenant à des réductions fréquentes des doses et des interruptions du traitement (249, 250).

Les inhibiteurs de KIT sont donc un traitement prometteur dans les mélanomes métastatiques mutés *KIT*, cependant des mécanismes de résistance, peu connus, se développent, et des stratégies de combinaison d'inhibiteur de KIT avec un autre inhibiteur de la voie MAPK tel qu'un inhibiteur de MEK pourraient permettre de limiter ces phénomènes.

2.3.5 La combinaison « inhibiteur de BRAF + inhibiteur de MEK »

Malgré des bons taux de réponse, les réponses observées sous inhibiteurs de BRAF sont rarement durables et des échappements surviennent chez une majorité de patients dans les 6 à 8 mois suivant l'instauration du traitement (232, 251). De nombreux mécanismes de résistance ont été décrits et feront l'objet d'un chapitre ultérieur.

Une thérapie séquentielle par un inhibiteur de MEK après échec d'un traitement par inhibiteur de BRAF n'a pas montré de bénéfice : aucune réponse et une survie sans progression médiane de 1,8 mois a été observée dans une étude de 40 patients, suggérant que la résistance aux inhibiteurs de BRAF confère également une résistance aux inhibiteurs de MEK (252).

Par conséquent, les essais cliniques ultérieurs combinant à la fois un inhibiteur de BRAF à un inhibiteur de MEK, avaient pour but de retarder cette résistance acquise, obtenir des durées de réponses plus longues, des taux de réponses tumorales plus élevés, et de diminuer les effets indésirables en rapport avec une activation paradoxale de la voie MAPK observés avec les inhibiteurs de BRAF en monothérapie, notamment la survenue de cancers cutanés.

Ainsi, après des résultats encourageants d'une étude de phase I/II (253), une étude randomisée en double-aveugle de phase III comparant un traitement combiné par inhibiteurs de BRAF (le dabrafenib) et de MEK (le trametinib) *versus* un inhibiteur de BRAF seul (le dabrafenib), a été publiée en 2014 par Long *et al.* (COMBI-d) (254).

Cet essai incluait 423 patients avec un mélanome métastatique muté *BRAF* V600E ou V600K, naïfs de traitement. La survie sans progression médiane était de 9,3 mois dans le bras de la combinaison *versus* 8,8 mois dans le bras dabrafenib seul (HR : 0,75 ; p = 0,03). Le taux de réponse globale était de 67% pour la combinaison *versus* 51% pour le dabrafenib seul. La survie globale médiane n'était pas atteinte mais l'analyse intermédiaire a montré qu'à 6 mois, le taux de survie globale était de 93% dans le bras dabrafenib + trametinib *versus* 85% dans le bras dabrafenib seul (HR : 0,63 ; p = 0,02). Le profil de tolérance était tout à fait acceptable avec un risque de survenue de carcinomes épidermoïdes cutanés significativement diminué lorsque l'on associe un inhibiteur de BRAF à un inhibiteur de MEK (2% *versus* 9% pour le dabrafenib seul) ; par contre, la fièvre était un effet indésirable plus fréquent dans le bras d'association (51% *versus* 28%), et plus souvent sévère (3,6% *versus* 2%) (254).

Une analyse de qualité de vie des patients de cette étude utilisant le questionnaire de qualité de vie EORTC QLQ-C30, a montré une meilleure préservation de la qualité de vie dans le fonctionnement physique, social et cognitif, et une amélioration de la douleur chez les patients traités par l'association par rapport au dabrafenib seul (255).

Bien que statistiquement significative, la faible différence absolue de survie sans progression entre les deux bras de l'étude COMBI-d a d'abord été surprenante; cependant, la réactualisation des résultats de l'étude avec un suivi de 17 mois supplémentaires, publiés en 2015, a montré que la survie sans progression médiane était à 11,0 mois *versus* 8,8 mois (HR : 0,67 ; p = 0,0004), et la survie globale médiane de 25,1 mois pour le bras de la

combinaison dabrafenib + trametinib, *versus* 18,7 mois pour le dabrafenib en monothérapie (HR : 0,71 ; *p* = 0,0107). Le taux de mortalité était de 47% dans le bras de la combinaison *versus* 58% dans le bras dabrafenib seul (HR : 0,71 ; p = 0,0107). L'avantage de survie était présent dans tous les sous-groupes des analyses, y compris les patients présentant des taux sériques élevés de LDH et indépendamment du sous-type de mutation *BRAF* V600 (15). Ces résultats ont été actualisés au congrès de l'ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) en juin 2016, avec une survie globale à 44% à 3 ans dans le groupe dabrafenib + trametinib, les 2/3 des patients en vie étant encore sous ce traitement (256).

Un deuxième essai de phase III en ouvert mais avec de plus grands effectifs a randomisé 704 patients avec un mélanome métastatique muté *BRAF* V600 pour recevoir soit un traitement combiné par dabrafenib et trametinib soit un traitement par vemurafenib en monothérapie, aux doses habituellement données, en première ligne de traitement (COMBI-v). Le critère de jugement principal était la survie globale. A 12 mois, le taux de survie globale était de 72% dans le groupe de la combinaison et de 65% dans le groupe de vemurafenib (HR : 0,69 ; *p* = 0,005). Une meilleure survie sans progression médiane était observée dans le groupe de la combinaison (11,4 mois *versus* 7,3 mois ; HR : 0,56 ; *p* < 0,001), ainsi qu'un meilleur taux de réponse objective (64% *versus* 51% ; *p* < 0,001). Le nombre d'effets indésirables graves étaient similaires dans les 2 groupes. La survenue de carcinomes épidermoïdes cutanés et de kératoacanthomes était significativement plus rare chez les patients traités par la combinaison (1%) que chez les patients sous vemurafenib (18%) (13).

De plus, une étude sur la qualité de vie des patients ayant été inclus dans l'étude COMBI-v, utilisant 3 échelles d'évaluation (EORTC QLQ-C30, EuroQoL-5D, et FACT-M, pour *Melanoma Subscale of the Functional Assessment of Cancer Therapy-Melanoma*), a montré un très net avantage de la combinaison par dabrafenib + trametinib par rapport à la monothérapie par vemurafenib (257).

Un troisième essai randomisé en double aveugle de phase III a comparé la combinaison vemurafenib + cobimetinib à un traitement contrôle par vemurafenib + placébo, en double aveugle, chez 495 patients naïfs de traitement avec un mélanome localement avancé non résécable ou métastatique muté *BRAF* V600 (coBRIM). Le critère de jugement principal était la survie sans progression. La survie sans progression médiane était de 9,9 mois dans le

groupe de la combinaison *versus* 6,2 mois dans le groupe contrôle (HR : 0,51 ; $p < 0,001$). Le taux de réponse globale (partielle et complète) était de 68% pour la combinaison et 45% pour le groupe contrôle ($p < 0,001$), incluant un taux de réponse complète de 10% dans le groupe combinaison *versus* 4% dans le groupe contrôle. L'analyse intermédiaire de survie globale retrouvait des taux de survie globale à 9 mois de 81% dans le groupe combinaison *versus* 73% dans le groupe contrôle. Les effets indésirables de grade 3 ou plus étaient plus fréquents dans le groupe combinaison mais de façon non significative, comparés au groupe contrôle (65% *versus* 59%), et le nombre d'arrêts de traitement était identique dans les 2 groupes. Les principaux risques importants identifiés étaient : les rétinopathies séreuses, les dysfonctions ventriculaires gauches, la photosensibilité, les diarrhées et les pneumopathies inflammatoires. L'incidence des carcinomes épidermoïdes cutanés et kératoacanthomes était plus faible sous l'association vemurafenib/cobimetinib que celle connue pour la monothérapie par vemurafenib (16).

Les résultats de cette étude ont été réactualisés avec un suivi supplémentaire de 8 mois. La survie sans progression médiane était de 12,3 mois pour le bras combinaison *versus* 7,3 mois pour le bras monothérapie (HR : 0,58), et le taux de réponse était de 70% *versus* 50% (258).

De même que sous inhibiteurs de BRAF en monothérapie, on observe chez certains patients, appelés longs répondeurs, des réponses prolongées avec la combinaison par inhibiteurs de BRAF et de MEK. Ainsi, dans une analyse groupée des 3 essais cliniques de phase I/II (54 patients) et de phases III (COMBI-d : 211 patients, COMBI-V : 352 patients) ayant utilisé la combinaison par dabrafenib et trametinib, avec plus de 600 patients, Long *et al.* ont montré que les patients ayant des taux de LDH inférieur à la limite supérieure de la normale, et moins de 3 sites métastatiques, avaient un taux de survie globale à 1 an et à 3 ans de 90% et de 70% respectivement. Ces patients avaient également une amélioration de la survie sans progression de 61% à 1 an et 33% à 3 ans.

Dans la majorité des essais cliniques, la présence de métastases cérébrales actives est un critère d'exclusion. Toutefois, quelques études ont montré que les inhibiteurs de BRAF en monothérapie ont une certaine efficacité, bien que limitée, en cas de métastases cérébrales actives (158, 227). Aucune donnée d'essais cliniques n'est disponible à ce jour en ce qui concerne l'efficacité de la bithérapie ciblant BRAF et MEK dans le traitement des métastases

cérébrales de mélanome. Deux études de phase II sont en cours pour évaluer chaque couple de bithérapie : dabrafenib + trametinib (NCT02039947) et vemurafenib + cobimetinib (NCT02230306). Dans la première, les cohortes comprennent les patients atteints de métastases cérébrales symptomatiques et asymptomatiques, avec ou sans traitement local préalable (259). La deuxième, coBRIM-B, concernent des patients présentant des métastases de mélanome cérébrales actives avec comme objectif principal de déterminer le taux de réponse objective intracrânienne (260).

Par ailleurs, de même qu'avec les inhibiteurs de BRAF en monothérapie, des réponses dissociées aux bithérapies ciblées peuvent être observées (261). Il n'est pas rare, qu'en cas de lésions localisées progressives, alors que les autres métastases sont contrôlées par le traitement, un traitement local soit proposé, permettant la poursuite du traitement systémique (262).

Le traitement local de choix pour les métastases cérébrales est la radiothérapie cérébrale stéréotaxique (263). Cette technique est également largement proposée en complément des autres traitements.

Un essai de phase III randomisé testant une troisième combinaison d'inhibiteurs de BRAF et de MEK associant l'encorafenib et le binimetinib est actuellement en cours (COLUMBUS), avec 3 bras : encorafenib à la dose de 450 mg par jour avec du binimetinib 45 mg deux fois par jour, encorafenib seul à 300 mg par jour, et vemurafenib seul (NCT01909453).

Au total, la prise en charge actuelle en France du mélanome avancé (non résécable ou métastatique) est orientée en fonction de l'existence ou non d'une mutation *BRAF* de la tumeur. Lorsque la mutation *BRAF* sur le codon V600 est constatée, il est préconisé d'instaurer en première intention une bithérapie associant un inhibiteur de BRAF et un inhibiteur de MEK. La dernière commission de la transparence de l'HAS sur le cobimetinib a conclu que l'association vemurafenib/cobimetinib est un traitement de première intention dans la stratégie de prise en charge de ces patients, au même titre que l'association dabrafenib/trametinib (213).

La place du nivolumab et du pembrolizumab en traitement de première ligne en alternative à ces thérapies ciblées est actuellement discutée. La place de l'association

nivolumab/pembrolizumab (dont l'AMM a été obtenue le 11 mai 2016) n'a pas encore été définie.

En deuxième ligne de traitement, le nivolumab et le pembrolizumab sont recommandés.

L'association des thérapies ciblées par inhibiteurs de BRAF et de MEK n'est pas recommandée en deuxième ligne de traitement chez les patients ayant déjà reçu un inhibiteur de BRAF en monothérapie en première ligne de traitement (213) (264).

Bien que de meilleurs des taux de réponses et de meilleures survies sans progression soient observés avec les thérapies ciblées associant un inhibiteur de BRAF à un inhibiteur de MEK, encore la moitié des patients progressent entre 9,3 et 11,4 mois (Tableau 2) (13, 16, 254).

Essais de phase III	Co-BRIM[1]		COMBI-d[2]		COMBI-v[3,4]	
	cobimetinib + vemurafenib	vemurafenib + placebo	dabrafenib + trametinib	dabrafenib + placebo	dabrafenib + trametinib	vemurafenib
Taux de réponse globale,%	70	50	69	53	66	53
Survie sans progression médiane, mois	12	7	11	9	13	7
Survie globale médiane, mois	22	17	25	19	26	18
Taux de survie globale						
à 1 an, %	75	64	74	68	73	64
à 2 ans, %	48	38	51	42	51	38
à 3 ans, %	ND	ND	44	32	ND	ND
Effets indésirables de grade 3, %	58	50	32	30	48	57
Arrêt de traitement pour effet indésirable, %	17	9	11	7	16	14

Tableau 2. Synthèse des résultats d'efficacité et de tolérance de 3 essais de phase III ayant comparé un inhibiteur de BRAF en monothérapie à une thérapie combinée par inhibiteur de BRAF + inhibiteur de MEK dans le mélanome métastatique muté *BRAF* V600.

[1]Ascierto PA et al., Lancet 2016 (accepté) (actualisation des données en janvier, août et septembre 2015), [2]Long GV et al., Lancet 2015 (actualisation des données en janvier 2015, et en juin 2016), [3]Robert C et al., ESMO 2015 (actualisation en mars 2015), [4]Robert C et al., NEJM 2015. ND : données non disponibles.

2.3.6 Nouvelles perspectives thérapeutiques

Les mécanismes spécifiques de résistance sous thérapies ciblées combinées sont peu connus. Une étude récente de Moriceau *et al.* a montré que les mélanomes acquièrent une résistance à la double inhibition de BRAF et de MEK en augmentant ou en combinant les mêmes mécanismes de résistance que ceux déjà connus sous inhibiteurs de BRAF en monothérapie (265) (voir chapitre mécanismes de résistance). De plus, de même que l'a rapporté Das Thakur *et al.* (266) pour les inhibiteurs de BRAF en monothérapie, ils ont montré que les cellules tumorales devenues résistantes à la thérapie combinée sont très sensibles à l'arrêt brutal du traitement (addiction au traitement), laissant suggérer de l'intérêt de traitements intermittents (265, 266). Des études de phase II testeront cette hypothèse avec une monothérapie par inhibiteur de BRAF (NCT01894772), ou avec des thérapies combinées associant un inhibiteur de BRAF à un inhibiteur de MEK (SWOG/CTEP S1320 et NCT02224781) (262, 267).

Outre un traitement intermittent ou séquentiel, de plus en plus d'essais précliniques et des essais cliniques de phases précoces supportent l'hypothèse de l'intérêt d'une approche multi-cibles pour surmonter ces mécanismes de résistance acquise, notamment grâce à l'arrivée de nouveaux inhibiteurs ciblant la protéine ERK, ou la voie PI3K/AKT, CDK4/6, Bcl-2, MDM2, STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), ou encore HSP90 (*heat shock protein 90*), à utiliser en association à la combinaison inhibiteurs de BRAF et de MEK (triple combinaison) (262, 267).

Des études d'associations des thérapies ciblées avec les immunothérapies sont également en cours, en traitement combiné ou séquentiel, la toxicité pouvant être un facteur limitant (268, 269). Des arguments plaident en faveur de l'intérêt d'une telle association. En effet, il a été montré dans des biopsies de tumeurs que la double inhibition de BRAF et de MEK a pour effet de moduler le microenvironnement immunitaire avec une augmentation de l'infiltration péritumorale de lymphocytes T CD8 et de l'expression des antigènes de différenciation des mélanomes tels MART-1 et gp100, qui peuvent avoir un rôle dans la reconnaissance des cellules T (270-272).

Enfin, afin d'optimiser les réponses thérapeutiques, il est nécessaire d'identifier des marqueurs prédictifs de la réponse aux traitements systémiques, aussi bien pour les thérapies ciblées que pour les immunothérapies.

Mise à part la détection de la mutation de BRAF, aucun biomarqueur validé ne permet de prédire la réponse à la thérapie combinée par inhibiteurs de BRAF et de MEK, qui est d'intensité et de durée variable selon les patients.

De façon similaire, certaines signatures immunologiques pourraient prédire la qualité de la réponse aux immunothérapies (34), certains polymorphismes du gène codant pour le CTLA-4 semble influencer le bénéfice thérapeutique des anti-CTLA4 (273), et l'expression de PD1/PD-L1 par la tumeur associée à une infiltration lymphocytaire dans le front d'invasion tumorale pourrait prédire d'une meilleure réponse au pembrolizumab (274).

3. Mécanismes de résistance biologique aux thérapies ciblées du mélanome

3.1 Concept, et principales voies de signalisations impliquées

S'il existe de rares patients longs répondeurs aux inhibiteurs de BRAF en monothérapie, environ 15% sont non-répondeurs d'emblée (14, 232), en raison de mécanismes de résistance intrinsèque à la tumeur. De plus, une grande majorité des patients vont échapper au traitement après quelques mois de traitements (médiane de 6 à 8 mois) (218, 232), suite à une réponse objective initiale, en raison de l'émergence au sein des tumeurs en progression de mécanismes de résistance acquise. Ces tumeurs résistantes peuvent survenir sous la pression sélective de l'inhibiteur à partir de sous-clones résistants préexistants ou à la suite d'un processus évolutif au cours du traitement, ou une combinaison des deux (275). De plus, ces mécanismes de résistances acquises interviennent probablement très précocement et peuvent expliquer la majorité des réponses cliniques partielles observées dans les essais de phase III en comparaison au taux de réponse complète qui est de 3 à 6% selon les études (14, 232).

Bien que la résistance aux bithérapies ciblées combinant un inhibiteur de BRAF à un inhibiteur de MEK soit retardée par rapport à un traitement par inhibiteur de BRAF en monothérapie, la résistance reste un problème majeur (276), et la compréhension détaillée des causes de la résistance aux inhibiteurs de BRAF et/ou de MEK est nécessaire pour pouvoir élaborer des stratégies de traitement plus efficaces.

Les principaux mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF dans les mélanomes mutés *BRAF* induisent une réactivation de la voie de signalisation MAPK. En effet, la forte sensibilité aux inhibiteurs de la voie MAPK des mélanomes mutés *BRAF*, par rapport à d'autres types de cancers mutés BRAF, tels que le cancer du poumon ou le cancer colorectal, vient probablement d'une très forte dépendance de la voie MAPK pour la survie cellulaire ; et bien que la plupart des autres cancers mutés *BRAF* ait aussi une activation accrue ou déréglée de la voie MAPK, la survie cellulaire dans ces cancers peut être dépendante d'autres voies de signalisation, telle que la voie PI3K/AKT, expliquant leur mauvaise sensibilité aux inhibiteurs de la voie MAPK.

Aussi, la deuxième voie impliquée dans les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF dans les mélanomes mutés BRAF est la voie PI3K/AKT. Ces deux voies interagissent à différents niveaux, entraînant des activations ou des inhibitions croisées, principalement *via* les protéines RAS qui en parallèle de leur implication dans la voie MAPK, activent directement PI3K (Figure 4). De plus, ERK phosphoryle TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*) qui va activer mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*). L'inhibition croisée entre les deux voies peut survenir dans certaines circonstances, comme par exemple suite à une stimulation intense d'IGF1 (*insulin-like growth factor 1*), AKT peut également inhiber l'activité de RAF en phosphorylant son domaine régulateur (275).

Ainsi, la résistance aux inhibiteurs de BRAF se caractérise par la multiplicité des mécanismes de résistance décrits, et par la possibilité de coexistence de plusieurs de ces mécanismes au sein d'une même tumeur (277-279). Aucune association entre le bénéfice clinique (taux de réponse et de survie) et les mécanismes spécifiques de résistance aux inhibiteurs de BRAF n'a été observée (277). Le manque d'efficacité clinique d'un traitement par inhibiteur de MEK ou par une thérapie combinée par inhibiteurs de BRAF et de MEK chez les patients

traités précédemment par inhibiteurs de BRAF en monothérapie, est probablement dû à l'hétérogénéité de ces mécanismes de résistance (277).

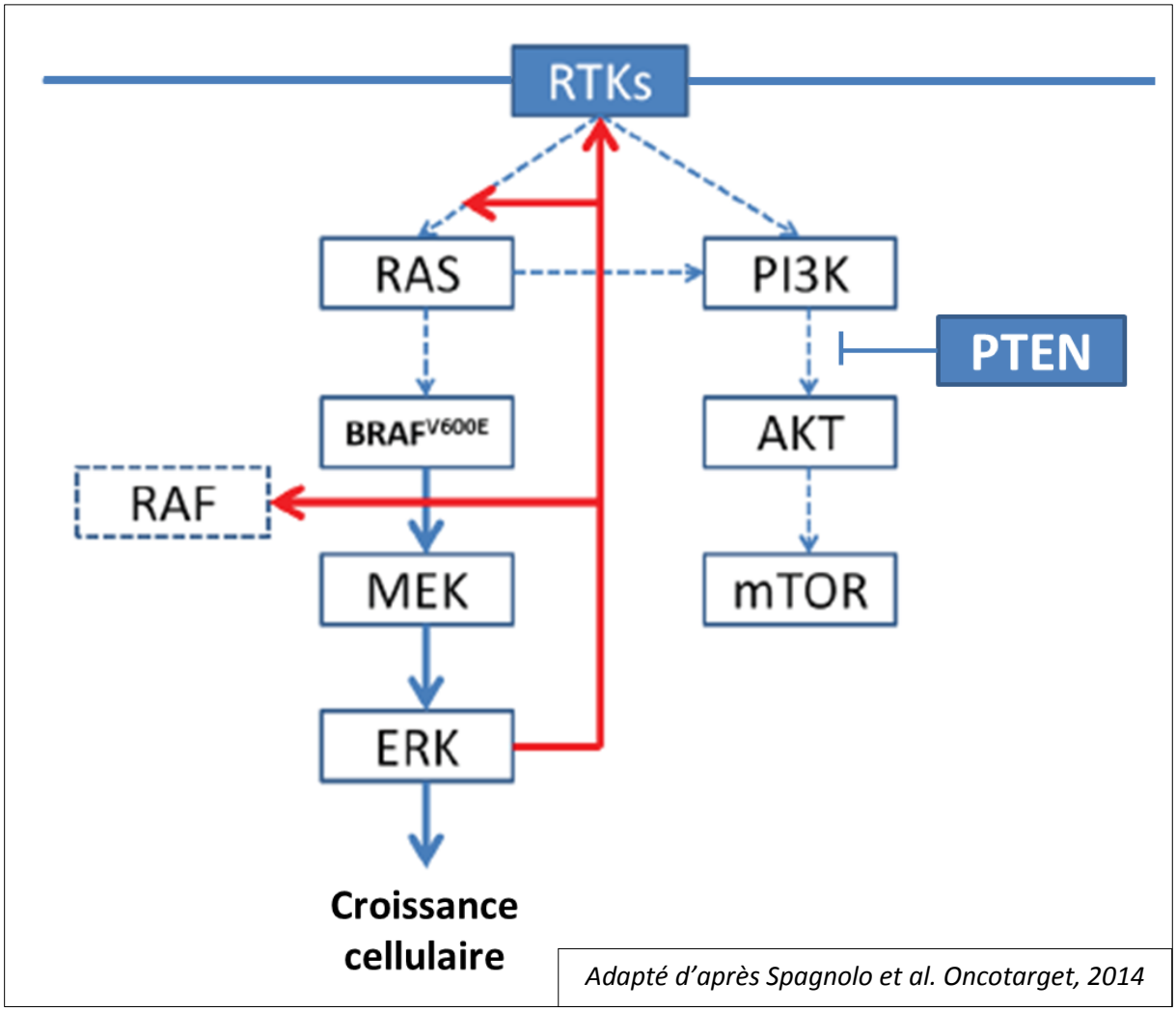


Figure 4. Interactions entre la voie MAPK et la voie PI3K-PTEN-AKT dans les mélanomes mutés *BRAF* V600E.

Dans les cellules mutées BRAF V600E, *la protéine mutée* BRAF V600E *est constitutivement active sous forme de monomère indépendamment de la fixation d'un facteur de croissance sur le RTK, entraînant un signal fort d'activation de la protéine ERK (flèches pleines bleues) et une forte activité transcriptionnelle dépendante de la protéine ERK, y compris des composants du rétrocontrôle négatif. Ainsi, cela a pour effet une diminution de l'expression de RAS, de la dimérisation de RAF non mutée, et la voie de signalisation PI3K/AKT, habituellement régulée par le gène suppresseur de tumeur PTEN, est sensiblement atténuée (flèches bleues en pointillé). La voie PI3K/AKT est habituellement activée par l'activation de la protéine PI3K par les RTK et également directement par RAS qui se lie à PI3K.*

Les mécanismes de résistances aux bithérapies par inhibiteurs de BRAF et de MEK ont moins été étudiés, mais il semblerait qu'il s'agisse des mêmes mécanismes que ceux observés sous inhibiteurs de BRAF en monothérapie, avec une réactivation de la voie MAPK survenant plus fréquemment, et des combinaisons mécanistiques encore plus complexes (265, 280). De plus, il a été montré que, contrairement aux lignées cellulaires de mélanomes résistantes aux inhibiteurs de BRAF en monothérapie, les lignées cellulaires résistantes à l'association des inhibiteurs de BRAF avec des inhibiteurs de MEK développent une très forte addiction au traitement, ce qui peut potentiellement offrir une opportunité thérapeutique, notamment l'intérêt d'un traitement intermittent (265).

3.2 Mécanismes de résistance intrinsèque (primaire)

La résistance primaire est définie par l'absence totale de réponse au traitement (patients non-répondeurs) ou par une durée de réponse très courte (inférieure à 12 semaines). Il est classique de distinguer les mécanismes réactivant la voie MAPK (qui souvent activent en parallèle d'autres voies), de ceux qui sont indépendants de la voie MAPK, toutefois des interactions entre les différentes voies sont possibles (cf *supra*).

Mécanismes réactivant la voie MAPK

<u>Surexpression d'HGF et de MET</u>

L'un des premiers mécanismes de résistance intrinsèque aux inhibiteurs de BRAF à avoir été décrit fait intervenir le microenvironnement tumoral *via* la sécrétion de facteurs de croissance par les cellules du stroma tumoral. Le facteur de croissance qui restaurait le mieux la prolifération des cellules de mélanome exposé au PLX720 (analogue du vemurafenib) était le facteur de croissance des hépatocytes HGF (*hepatocyte growth factor*), dont la liaison au récepteur MET à la surface des cellules de mélanome, conduisait à l'activation à la fois de la voie MAPK et de la voie PI3K/AKT, conférant une résistance au

traitement (281-283). L'association d'un inhibiteur d'HGF ou de MET à un inhibiteur de BRAF permettait d'ailleurs de rétablir la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF, *in vitro* (281).

Les patients inclus dans l'essai de phase 2 testant le vemurafenib chez des patients atteints d'un mélanome muté *BRAF* V600E métastatique (BRIM 2) qui avaient des taux sériques élevés d'HGF en début de traitement, avaient des taux de réponse au vemurafenib plus bas, ainsi que des survies sans progression et des survies globales plus courtes (282). Ainsi, un taux sérique d'HGF serait un biomarqueur prédictif de non-réponse aux inhibiteurs de BRAF.

Depuis, l'influence du microenvironnement tumoral dans la résistance intrinsèque a été confirmé par l'analyse de l'ensemble des facteurs de croissance sécrétés par les cellules de mélanomes sous la pression de différents traitements inhibiteurs (de BRAF, ALK (*anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*) ou EGFR). Le « sécrétome » induit par les inhibiteurs de BRAF et d'ALK, composé de nombreux facteurs activant la voie PI3/AKT, dont le plus puissant l'IGF1, augmentaient la prolifération et la migration cellulaire des cellules intrinsèquement résistantes *in vitro*, et favorisait la survie des cellules sensibles aux traitements (283).

<u>Surexpression de récepteurs tyrosine kinase (RTK)</u>

En effet, HGF et MET ne sont pas les seuls facteurs de croissance et récepteurs impliqués dans la résistance intrinsèque, celle-ci est pouvant être liée à une activation du signal des RTK. Une étude ayant analysé des tumeurs de patients avec une résistance intrinsèque ou acquise au vemurafenib a observé une augmentation de l'EGFR et de l'activité des kinases de la famille SRC (SFK) (284). Ce groupe de chercheurs a récemment développé deux inhibiteurs pan-RAF qui peuvent aussi bloquer les SFK ; ces médicaments n'entraînent pas d'activation paradoxale de la voie MAPK, et inhibent l'activation de MEK et ERK dans les mélanomes mutés *BRAF* et *NRAS* (285). Ainsi ces nouveaux traitements pourraient être proposés en première ligne dans les mélanomes mutés *BRAF* et *NRAS* ou en deuxième ligne chez les patients ayant développé des résistances.

Dans l'ensemble, la surexpression de facteurs de croissance et de leurs récepteurs peut contourner l'inhibition de la voie MAPK par les inhibiteurs spécifiques, soit *via* la réactivation de la voie MAPK, soit *via* d'autres mécanismes tels que l'implication de voies alternes comme la voie PI3K/AKT.

Perte ou inactivation de NF1

Les mutations du gène *NF1* entrainant une perte de fonction de la protéine, ont été associées à une résistance à l'inhibition de BRAF (79, 80, 286). *NF1* est un gène suppresseur de tumeur *via* son inhibition sur RAS ; ainsi, une perte de fonction de la protéine NF1, entraine une activation des voies de signalisation situées en aval de RAS, incluant la voie MAPK et la voie PI3K/AKT. Afin de contourner cette résistance, ont été proposés des traitements par inhibiteurs de MEK, ou de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (79), ou d'utiliser des inhibiteurs de BRAF irréversibles en association ou non avec des inhibiteurs d'ERK (286). Les inhibiteurs irréversibles de BRAF sont des inhibiteurs de BRAF de « nouvelle génération », qui se lient de façon permanente et irréversible au site de fixation de l'ATP du domaine kinase de la protéine BRAF.

Mutations de *RAC1*

Des mutations de *RAC1* P29S sont possibles, bien que moins fréquentes, dans les mélanomes mutés *NRAS* ou *BRAF* (6,2% *versus* 12 ,5% dans les mélanomes non mutés) (95), et la possibilité que cette mutation activatrice de *RAC1* confère une résistance aux inhibiteurs de BRAF, *via* l'activation d'une voie alterne de la voie MAPK, n'est pas exclue. Dans une cohorte de 45 patients traités par inhibiteurs de BRAF, parmi 14 patients avec une résistance intrinsèque, une mutation de *RAC1* P29S était retrouvée dans 3 prélèvements tumoraux avant traitement, et dans l'un d'eux il n'y avait pas d'autre altération connue pour induire une résistance au traitement ; de plus, aucun patient qui avait eu une réponse au traitement n'était porteur de cette mutation (p = 0,026) (287). Puis, l'équipe de Watson *et al.* a montré que 2 lignées humaines de mélanome mutées *RAC1* P29S étaient résistantes aux inhibiteurs de BRAF (vemurafenib et dabrafenib), et que l'inhibition de l'expression de RAC1 P29S par siRNA dans des lignées de mélanome co-mutées *RAC1* P29S et *BRAF* induisait une sensibilité accrue aux inhibiteurs de BRAF (288). Cependant, ces lignées étaient également porteuses d'un grand nombre de mutations et d'altérations génétiques pouvant interagir sur la résistance au traitement, et il est difficile d'établir des conclusions avec seulement deux lignées. Une autre équipe a montré qu'une lignée de mélanome doublement mutée *BRAF* V600E et *RAC1* P29S avait une sensibilité intermédiaire au vemurafenib (IC50, étant la concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition : 0,25 µM) en comparaison avec les

autres cellules mutées BRAF (IC50 comprises entre 0,06 et 0,45 µM), et que cette lignée était par contre très sensible au selumetinib (un inhibiteur de MEK, IC50 : 0,014 µM). En revanche, une autre lignée de mélanome mutée *RAC1* P29S sans mutation de *BRAF* ni de *NRAS* et avec une perte de NF1, était fortement résistante au selumetinib (IC50 > 10 µM), alors qu'une lignée également avec une perte de NF1, une mutation *RAC1* P29S et non mutée *BRAF*/*NRAS* était sensible aux inhibiteurs de MEK (IC50 : 0,025 µM) (289).

Ainsi, ces données remettent en question que la présence d'une mutation de *RAC1* P29S, mais aussi la perte de NF1, soient de bons biomarqueurs prédictifs de la sensibilité ou de la résistance aux inhibiteurs de BRAF ou de MEK, et suggèrent que des évaluations cliniques sont nécessaires.

RAC1 est cependant une cible séduisante. Mais de même que RAS, RAC1 est une cible difficile à inhiber par des petites molécules. Les protéines effectrices en aval de RAC1, telles que PAK sont des cibles pharmacologiques potentielles, toutefois aucun résultat ayant testé ces molécules n'est encore publié à ce jour.

Mutations de MEK1 et de MEK2

Des mutations des gènes *MAP2K1* et *MAP2K2*, codant respectivement pour les protéines MEK1 et MEK2, situées immédiatement en aval de BRAF dans la voie MAPK, sont retrouvées dans 8% des mélanomes, qu'ils soient mutés *BRAF* ou non (290), contrairement aux co-mutations de *NRAS* et *BRAF* qui sont exceptionnelles.

Les mutations du gène *MAP2K1* responsable d'une résistance primaire aux inhibiteurs de BRAF et ou de MEK sont rares, et touchent le codon P124 (MEK1 P124L, MEK1 P124S) (287). Cependant d'autres cas de patients avec des mélanomes porteurs de mutations de MEK1 P124 avant traitement ne conférant pas de résistance primaire au traitement ont été rapportés (277, 291). De nombreuses autres mutations de *MAP2K1* ne semblent pas induire de résistance (MEK1 T111S, MEK1 G176S, MEKG276W, MEK1 F53Y). Ces résultats sont en accord avec des études antérieures qui avaient montré que la présence de mutations de MEK ne présageait pas toujours d'une résistance aux inhibiteurs de BRAF (291, 292). Ainsi, les mutations somatiques de *MAP2K1* peuvent induire une résistance à l'inhibition de BRAF dans certains contextes mais pas dans d'autres (287).

Un cas d'un patient avec une mutation du gène *MAP2K2* (codant pour la protéine MEK2, qui forme un hétérodimère avec son homologue MEK1), la mutation MEK2 F57C, retrouvée à la fois avant traitement puis dans les métastases en progression sous traitement par inhibiteur de BRAF, a été rapporté ; la résistance survenait précocement (survie sans progression de 15,3 semaines) (277).

Surexpression de COT

Une surexpression de COT, une kinase codée par le gène *MAP2K8* qui active directement MEK (sans besoin de signal de RAF), a été montrée dans des lignées de mélanome mutées *BRAF* V600E comme étant associée à une résistance intrinsèque aux inhibiteurs de BRAF ou de MEK (293). Toutefois, ce mécanisme n'a pas été retrouvé dans des prélèvements de mélanomes primitifs de patients considérés non-répondeurs ou ayant présenté une réponse de très courte durée.

Mécanismes indépendants de la voie MAPK

Perte de PTEN

Un autre mécanisme de résistance intrinsèque possible est la perte d'expression de PTEN. Les mélanomes mutés *BRAF* sont associés à une perte de PTEN dans environ 20% des cas (294). *PTEN* est un gène suppresseur de tumeur qui régule négativement la voie PI3K/AKT (Figure 4), ainsi une perte d'expression de PTEN peut contribuer à une résistance intrinsèque aux inhibiteurs de BRAF *via* une activation de la voie PI3K/AKT.

Une étude a montré que dans des lignées cellulaires de mélanomes *BRAF* V600E, la perte de PTEN était associée à une résistance à l'apoptose des cellules traitées par inhibiteurs de BRAF *via* l'expression de la protéine pro-apoptotique BIM, membre de la famille des protéines Bcl-2 (295). Il est probable qu'une perte isolée de PTEN ne suffise pas à induire une résistance aux inhibiteurs de BRAF, et que d'autres altérations soient nécessaires. En effet, bien que l'activation de la voie AKT soit suffisante pour induire une résistance au vemurafenib par résistance à l'apoptose (295), la perte de PTEN n'est pas toujours bien corrélée avec l'activation de cette voie (296) et des réponses thérapeutiques ont été observées chez des patients ayant des mélanomes avec une perte complète de PTEN (287,

291). Néanmoins, des lignées cellulaires avec une inactivation fonctionnelle de PTEN semblent être moins sensibles aux inhibiteurs de BRAF que des lignées de mélanome non mutées *PTEN* ; cela a également été confirmé chez des patients.

Dans une étude de Nathanson *et al.*, les patients avec des mélanomes sans mutation de *PTEN* traités par dabrafenib avaient une meilleure survie sans progression comparée à celle des patients avec des mélanomes ayant au moins un allèle *PTEN* muté (32,1 *versus* 18,3 semaines respectivement, p = 0,066) (297) ; et une association modeste entre une faible expression de PTEN et une faible réponse était observée dans une étude de phase 2 testant le vemurafenib (291).

Par conséquent, le statut de PTEN pourrait constituer un biomarqueur prédictif de mauvaise efficacité lors d'un traitement par inhibiteurs de BRAF. De plus, une inhibition combinée de BRAF et de PI3K restaure l'apoptose dans les cellules avec perte de PTEN (295), suggérant qu'une telle association puisse surmonter ce mécanisme de résistance intrinsèque, de même que des associations avec plusieurs inhibiteurs de BRAF, de PI3K, d'AKT et/ou de mTOR (298).

De façon surprenante, les résultats récents d'une mise à jour de l'étude coBRIM, ont montré que la perte de PTEN était associée à une survie sans progression plus courte chez les patients traités par vemurafenib en monothérapie (HR : 1,6), alors que la perte de PTEN n'influençait pas la survie sans progression des patients traités par la bithérapie combinée par vemurafenib et cobimetinib (survie sans progression similaire quel que soit l'expression de PTEN) (299). Ce résultat illustre la complexité des mécanismes de résistance et des liens probables entre les voies MAPK et PI3K, puisque l'inhibition combinée par inhibiteurs de BRAF et de MEK semble lever la résistance primaire induite par la perte de PTEN, alors que celle-ci n'est censée activer que la voie PI3K, *a priori* non ciblée par le traitement.

<u>Dérégulation de CDK4 (*cyclin dependent kinase 4*) et/ou de la cycline D1.</u>

La cycline D1 régule la prolifération cellulaire en se liant aux kinases dépendantes des cyclines, CDK4 et CDK6, qui a leur tour phosphorylent la protéine pRb (protéine du rétinoblastome), ce qui conduit à la progression du cycle cellulaire. Sous des conditions physiologiques, la protéine $p16^{INK4A}$ (codée par le gène *CDKN2A*), est un inhibiteur de CDK4

et de CDK6, et empêche l'entrée en phase S en maintenant l'état non phosphorylé de pRb. (300). Smalley *et al.* ont montré que des mutations isolées de CDK4 n'altéraient pas la réponse aux inhibiteurs de BRAF, alors que la surexpression de cycline D1 à elle-seule augmentait la résistance. Les lignées cellulaires mutées *BRAF* V600E ayant à la fois une mutation de *CDK4* et une amplification de *CCND1* (gène codant pour la cycline D1) étaient les plus résistantes aux inhibiteurs de BRAF.

En pratique clinique, une amplification de *CCND1* a été retrouvée dans 17% d'échantillons de métastases de mélanomes mutés *BRAF* (300), et un nombre élevé de copies de *CCND1* (p = 0,009) ainsi qu'un nombre faible de copies de *CDKN2A* (p = 0,012) avant traitement étaient associés de façon significative et indépendante à une diminution de la survie sans progression sous dabrafenib (297). Ainsi, une résistance primaire aux inhibiteurs de BRAF peut s'observer en cas d'amplification du gène *CCND1* dans des mélanomes mutés *BRAF* V600E, et la voie du pRb pourrait être une cible dans une approche de traitements combinés.

Récemment, une analyse à long-terme de l'étude COMBI-d, a trouvé que les mutations et les délétions de *CDKN2A* étaient associées à une moins bonne survie globale (p = 0,027) et à une moins bonne survie sans progression (p < 0,001). Les patients avec un mélanome ayant une perte de *CDKN2A* avaient un taux de survie à 3 ans de 55% sous traitement combiné par dabrafenib et trametinib *versus* 24% sous dabrafenib seul, suggérant un intérêt d'une triple association par dabrafenib, trametinib, et un inhibiteur de CDK 4/6 (256).

Mutations de HOXD8

HOXD8 (*homeobox D8*) est un facteur de transcription qui est dérégulé dans de nombreux cancers (287, 301). La détection chez un patient non-répondeur traité par inhibiteur de BRAF d'une mutation non-sens du gène *HOXD8* en l'absence d'autres altérations connues pour être associées à une résistance suggère que l'inactivation de ce facteur de transcription pourrait être la cause de cette résistance intrinsèque (287). Cependant, il ne s'agit que d'un seul cas isolé, et il n'y a pas de relation connue entre ce facteur de transcription et la voie MAPK.

3.3 Mécanismes de résistance acquise (secondaire)

La plupart des mécanismes de résistance secondaire implique une réactivation de la voie MAPK, en rapport avec des événements qui peuvent survenir en amont, en aval ou au niveau de BRAF.

La voie PI3K/AKT est la seconde voie impliquée dans cette résistance ; tel que cela l'a été montré précédemment, ces deux voies sont en constante interaction, ainsi de nombreux mécanismes de résistances font intervenir ces deux voies.

Mutation secondaire de *BRAF*

Contrairement aux mutations secondaires d'*EGFR* ou de *KIT* observées sous inhibiteurs spécifiques de RTK, qui est un mécanisme fréquent de résistance acquise de ces molécules, l'acquisition de mutations secondaires de *BRAF* semble beaucoup plus rare, puisqu'à ce jour une seule étude a retrouvé dans une métastase de mélanome progressant chez un patient traité par vemurafenib une mutation *BRAF* L505H associée à la mutation *BRAF* V600E (302). Malheureusement, l'analyse d'échantillons tumoraux avant traitement n'a pas été réalisable pour confirmer le caractère secondaire de cette mutation; cependant deux études antérieures avaient déjà mis en évidence dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de mélanome mutés *BRAF* V600E, cette deuxième mutation *BRAF* L505H, et qu'elle était capable d'induire une résistance secondaire au vemurafenib (303, 304). L'acide aminé concerné dans cette mutation est situé à proximité de la poche de liaison de l'ATP, modifiant ainsi la liaison du vemurafenib à la protéine BRAF mutée V600E/L505H (304).

Variants d'épissage de BRAF V600E (Figure 5-C)

Poulilakos *et al.* ont détecté à partir de lignées rendues résistances au vemurafenib *in vitro*, une forme anormalement courte de la protéine BRAF V600E, de 61kDa, qui correspond à la perte des transcrits des exons 4 à 8, qui code pour le site de liaison aux protéines RAS. La résistance de la protéine tronquée p61 BRAF V600E n'est pas due à une incapacité de liaison de l'inhibiteur de BRAF, mais au fait que cette protéine forme des dimères indépendamment du signal induit par RAS, qui activent fortement MEK et ERK en présence de l'inhibiteur de BRAF (216).

Ce mécanisme de résistance étant dû à un changement de structure de la protéine BRAF elle-même, des traitements combinant des inhibiteurs des effecteurs de la voie MAPK situés en amont de BRAF, tels que des inhibiteurs de MEK ou d'ERK, devraient permettre de retarder ou de prévenir ce mécanisme de résistance.

Néanmoins, un variant d'épissage de BRAF a également été détecté chez un patient sur cinq après un traitement combiné par dabrafenib et trametinib (305), soulevant la notion que ce type de combinaison ne doit pas être efficace dans un sous-groupe de patients. Des preuves précliniques indiquent que le PLX7904, un inhibiteur de BRAF de nouvelle génération, bloque la croissance des cellules porteuses de variants d'épissage de BRAF V600E résistantes au vemurafenib (306), ainsi cette molécule pourrait devenir une option thérapeutique dans un sous-groupe de patients ayant une résistance acquise de ce type.

Surexpression de l'oncoprotéine BRAF mutée V600E (par amplification du nombre de copies de *BRAF* V600E) (Figure 5-D)

Il a été montré qu'un gain du nombre de copies du gène *BRAF* V600E est un mécanisme de résistance acquise chez les patients traités par inhibiteurs de BRAF. Cette amplification du gène *BRAF* V600E induit une surexpression de la protéine BRAF V600E, qui permet une réactivation de la protéine ERK indépendante de RAS et de CRAF (307).

Dans un modèle de xénogreffes de mélanomes humains chez l'animal, il a été montré que des mélanomes rendus résistants au vemurafenib devenaient dépendants au traitement pour pouvoir continuer à proliférer. Cette dépendance vis-à-vis de la voie MAPK s'expliquait par une expression élevée de l'oncoprotéine BRAF V600E. L'arrêt du traitement entrainait une diminution du volume des tumeurs résistantes, soulignant un intérêt potentiel de traitement discontinu en cas de mécanisme de résistance de ce type (266).

Cette altération a été détectée chez 8 à 20% des échantillons tumoraux en progression après un traitement par inhibiteurs de BRAF (278, 287, 297, 307).

La réactivation d'ERK est saturable avec de fortes doses d'inhibiteurs de BRAF, et est sensible *in vitro* à l'inhibition de MEK ou à un traitement combiné par inhibiteurs de BRAF et de MEK.

Cependant, une amplification de *BRAF* a également été détectée chez des patients sous bithérapie par inhibiteur de BRAF et de MEK (305), montrant que l'approche combinatoire

avec seulement ces deux classes de molécules peut ne pas suffire à surmonter ce mécanisme de résistance en pratique clinique.

La faisabilité d'essais de traitements combinés avec un inhibiteur de BRAF et un inhibiteur de MEK, avec escalade de doses de l'inhibiteur de BRAF pour permettre d'obtenir à nouveau un contrôle de la maladie chez les patients avec une augmentation du nombre de copies de *BRAF* V600E devraient être évaluée (275).

Mutation activatrice de *NRAS* et amplifications de *NRAS* (Figure 5-E)

Les mutations du gène *NRAS* (*NRAS* Q61K et *NRAS* Q61R) sont capables de conférer une résistance acquise au vemurafenib (216, 308) ; ce phénomène de résistance s'explique par une activation de la voie MAPK faisant appel à CRAF et non BRAF.

En cas d'acquisition d'une mutation *NRAS* Q61K, des stratégies de traitements combinés ciblant des effecteurs en aval de NRAS tels que MEK, ERK ou AKT devrait permettre de surmonter cette résistance (233), de même qu'un inhibiteur d'HSP90 (309).

Toutefois, sous bithérapie par inhibiteur de BRAF et de MEK, des mutations de *NRAS* (*NRAS* Q61K et *NRAS* G12R) ont été rapportées, pouvant être associées à une amplification de l'allèle porteur de la mutation (265, 310).

Mutations de MEK1 et MEK2 (Figure 5-F)

Plusieurs mutations acquises du gène *MAP2K1* ont été détectées dans des métastases de patients progressant sous inhibiteurs de BRAF ou sous inhibiteurs de MEK en monothérapie. Certaines mutations sont responsables d'une résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF (MEK1 C121S, MEK1 K57E, MEK1 E203K, MEK1 V60E, MEK1 G128V) (277, 287, 311) ou aux inhibiteurs de MEK (MEK1 P124L), avec la possibilité de résistance croisée (311, 312), alors que d'autres ne semblent pas induire de résistance (MEK1 V154I) (287).

Des mutations de *MAP2K2* (MEK2 C125S, MEK2 V35M, MEK2 L46F, MEK2 N126D) ont également été retrouvées chez des patients progressant sous inhibiteurs de BRAF, avec *in vitro* des niveaux de résistance aux inhibiteurs de BRAF et de MEK variables (très forte résistance pour MEK2 C125S) ; par contre, ces mutations n'entrainaient pas de résistance aux inhibiteurs d'ERK *in vitro* (287).

Des mutations de *MAP2K2* sont plus souvent observées que des mutations de *MAP2K1* chez les patients ayant une résistance acquise au traitement combiné par dabrafenib et trametinib en première ligne, et elles surviennent plus fréquemment que sous inhibiteur de BRAF en monothérapie (280). Des mutations de MEK2 Q60P, ou encore de MEK2 C125S ont été rapportées comme conférant une résistance à cette bithérapie (280, 305, 313). Il semblerait que les mutations de MEK2 confèrent une résistance à la thérapie combinée plus forte que les mutations de MEK1. Pourtant, l'affinité du trametinib pour les protéines MEK1 et MEK2 est identique (314). Ces différences observées peuvent s'expliquer par des résultats antérieurs qui avaient montré que MEK2 échappait plus souvent à l'inhibition de l'inhibiteur de MEK AZD6244 (selumetinib) que MEK1 (315), et que MEK2 était un puissant activateur de la protéine ERK (316, 317). De plus, des données actuelles suggèrent que l'activité de la protéine ERK est graduellement restaurée en présence des inhibiteurs de BRAF et de MEK *via* une reprogrammation des RTK conduite par une perte du rétrocontrôle négatif (308, 315, 318). La réactivation de la protéine ERK favorise la phosphorylation de MEK1 sur le résidu inhibiteur Thr292, ce qui facilite l'inactivation de MEK1 *via* la déphosphorylation des résidus sérines activateurs (319, 320). En revanche, MEK2, qui manque de site inhibiteur thréonine reste phosphorylée sur les résidus sérines en présence d'une activité d'ERK. De plus, activées, les protéines MEK phosphorylées ont aussi une affinité significativement plus faible pour le trametinib que les formes inactives non phosphorylées (315).

<u>Surexpression de COT</u> (Figure 5-G)

De forts niveaux d'expression de l'ARN messager de COT ont été retrouvés dans des échantillons de métastases de mélanome chez des patients en rechute après un traitement par vemurafenib, par rapport au niveau d'expression retrouvé dans la tumeur primitive (293); associé au fait que la surexpression de COT soit un mécanisme de résistance primaire décrit dans des lignées mutées *BRAF* V600E, il semble très probable que COT participe à l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs de BRAF.

<u>Réactivation des RTK</u> (Figure 5-H)

L'activation des RTK, tels que PDGFRβ (*platelet-derived growth factor receptor β*) (308), PDGFRα (*platelet-derived growth factor receptor* α) (321), FGFR3 (*fibroblast growth factor receptor 3*) (322), EGFR (284, 323), HER3/ERBB3 (*human epidermal growth factor/erb-b2*

receptor tyrosine kinase 3) (324), IGF-1R (*insulin growth factor 1 receptor*) (313), EPHA2 (*EPH receptor A2*) (325) peut conduire à des résistances acquises aux inhibiteurs de BRAF par l'activation de voies parallèles ou par l'augmentation de l'activité de RAS.

La surexpression et l'activation du PDGFRβ était l'une des premières altérations à être identifiée *in vitro* comme un mécanisme de résistance des inhibiteurs de BRAF (308). *In vitro*, les cellules de mélanomes mutées *BRAF* exprimant PDGFRβ ne sont pas sensibles à l'inhibiteur du PDGFR l'imatinib (216), mais les cellules résistantes aux inhibiteurs de BRAF pourrait être sensibles à une inhibition combinée de BRAF et de la voie PI3K/AKT (326).

De plus, des analyses en immunohistochimie de 16 échantillons de mélanomes métastatiques avant et après traitements par inhibiteurs de BRAF (15/16) ou de MEK (1/16) ont révélé que 6 échantillons de tumeur ayant progressé sous traitement avaient acquis une expression du récepteur EGFR. En général, le récepteur EGFR n'est pas exprimé par les cellules de mélanome, et les études *in vitro* ont montré que l'expression de ce récepteur est un désavantage pour les cellules mutées *BRAF* V600E en l'absence d'inhibiteurs de BRAF ou de MEK, alors qu'elle confère un avantage sélectif en présence de ces médicaments. L'ajout d'un inhibiteur d'EGFR au vemurafenib ne permet pas d'inhiber la prolifération cellulaire, de même que l'inhibition d'autres récepteurs impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF tels que les RTK, PDGFRβ et ERBB (275), en raison de leur action à la fois sur la voie MAPK et sur la voie PI3K/AKT. Ainsi, une double inhibition de ces voies pourrait restaurer la sensibilité des cellules avec une forte expression d'EGFR aux inhibiteurs de BRAF (284, 318). De plus, à l'arrêt des inhibiteurs de BRAF, l'expression acquise d'EGFR se perd, ce qui est en faveur de l'intérêt de traitements séquentiels qui pourraient permettre de restaurer la sensibilité lorsque la résistance est due à ce mécanisme (318).

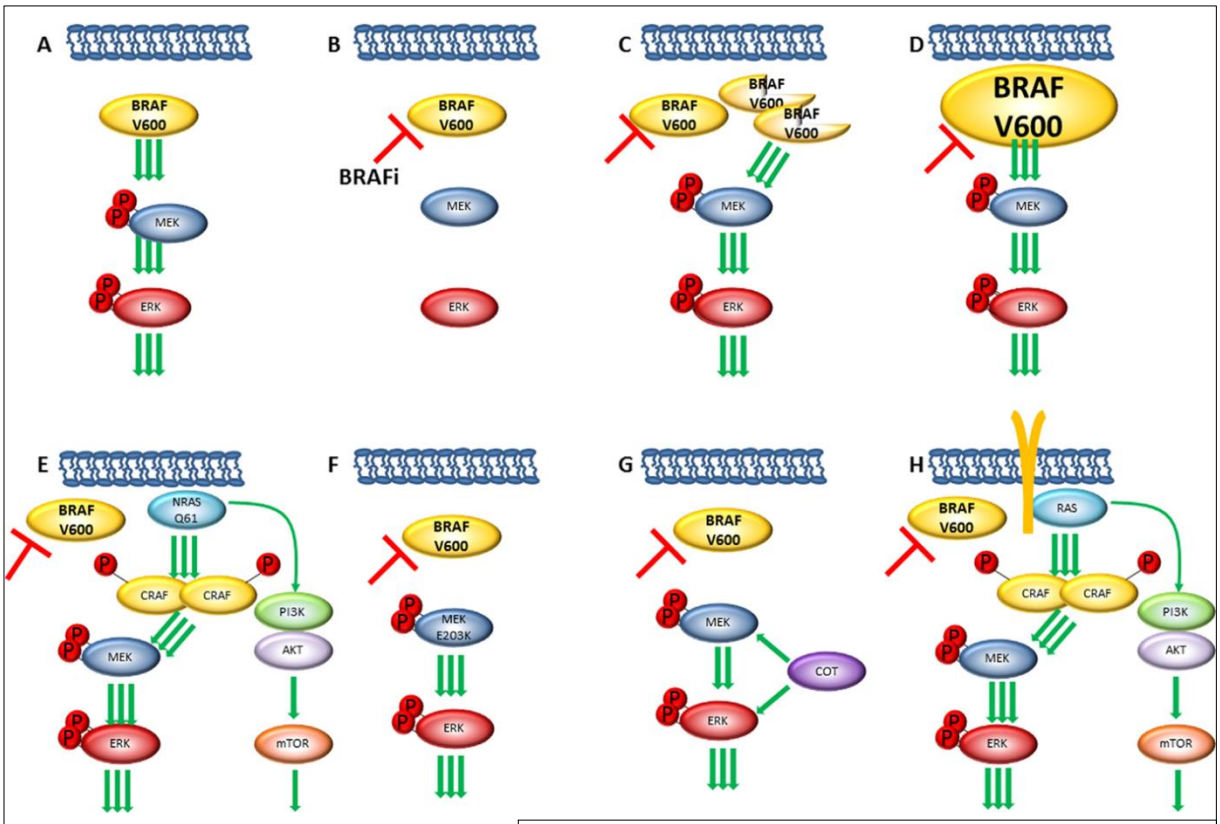
Villanueva *et al.* ont montré que le récepteur IGF1-R peut être surexprimé à la surface de cellules résistantes au vemurafenib après une longue exposition. Ce RTK active la voie PI3K/AKT, et *in vitro* un traitement combinant un inhibiteur de MEK avec un inhibiteur du récepteur IGF1-R ou un puissant inhibiteur de PI3K induit la mort des cellules résistantes aux inhibiteurs de BRAF (313).

Miao *et al*. ont retrouvé une surexpression d'EPHA2 à la fois dans des lignées cellulaires de mélanome rendues résistances aux inhibiteurs de BRAF et dans des biopsies de patients

ayant développé une résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF ; de plus l'ajout d'un inhibiteur d'EPHA2 permettait de surmonter cette résistance (325).

En effet, ces récepteurs membranaires impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF peuvent constituer des cibles thérapeutiques pour freiner ou empêcher l'évolution vers la résistance ; des essais de phase précoce testant des inhibiteurs de ce type sont en cours. Un traitement par un inhibiteur d'HSP90 semble également prometteur pour lutter contre la résistance induite par l'activation de PDGFR et IGF1-R (309).

Les principaux mécanismes de résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF sont résumés dans la figure 5 (327).



D'après Carlino MS et al. Crit Rev Oncol Hematol. 2015

Figure 5. Schéma résumant les principaux mécanismes de résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF.

Dans le mélanome muté BRAF V600 la voie MAPK est hyperactivée (A). Les inhibiteurs de BRAF (BRAFi) se lient à la protéine mutée ce qui bloque l'activation de MEK et d'ERK (B). Les inhibiteurs de BRAF (BRAFi) ont une faible affinité avec les variants d'épissage de BRAF, qui peuvent alors phosphoryler MEK malgré la présence de l'inhibiteur de BRAF (C). Les amplifications de BRAF conduisent à un excès de protéines mutées qui est capable de maintenir la voie MAPK active malgré la présence de l'inhibiteur de BRAF (D). Les mutations acquises de NRAS entrainent une activation de la voie MAPK par la formation de dimères CRAF et aussi par l'activation de la voie PI3K/AKT (E). Les mutations de MEK1 et MEK2 activent la voie MAPK en aval de BRAF (F). La surexpression de COT permet la phosphorylation de MEK et d'ERK, indépendamment de BRAF (G). La surexpression de RTK active la voie MAPK via la formation de dimères CRAF et aussi par l'activation de la voie PI3K/AKT (H).

Surexpression de la protéine CRAF

Plusieurs études réalisées sur des lignées humaines de mélanomes ont montré que des niveaux élevés d'expression de la protéine CRAF étaient associés une résistance acquise (304, 328-330), *via* une augmentation de la dimérisation de RAF induisant une activation de la voie MAPK. Ces taux élevés de CRAF semble être le reflet d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle plutôt que d'une amplification du gène *CRAF* (328). On notera qu'une surexpression de CRAF contribuant à une résistance intrinsèque a également été observée

dans quelques lignées de mélanome. A la fois les lignées résistantes de façons intrinsèque ou acquise étaient sensibles à un inhibiteur d'HSP90 (328). Très récemment, une étude *in vitro* et sur des modèles de xénogreffes de mélanomes humains, a montré qu'un composé naturel le rocaglamide 1, empêchant l'interaction entre les protéines PHB (prohibitine) et CRAF (interaction nécessaire à l'activation de CRAF), permettait de lever la résistance aux inhibiteurs de BRAF (dabrafenib et vemurafenib) induite par la surexpression de CRAF (330).

Toutefois, ce mécanisme de résistance n'a pas été rapporté dans des échantillons tumoraux provenant de patients.

Mutations des gènes de la voie PI3K/AKT

Des mutations acquises des gènes *AKT1 et AKT3* et des mutations de gènes impliqués dans la stimulation (*PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) et *PIK3CG* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma*)) ou dans l'inhibition (*PIK3R2* (*phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2*) et du gène *PHLPP1* (*PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1*) de la voie PI3K/AKT peuvent réactiver la voie PI3K/AKT, à l'origine d'une résistance secondaire aux inhibiteurs de BRAF (277, 278, 287, 302).

Hétérogénéité tumorale

Des réponses dissociées aux inhibiteurs de BRAF sont parfois observées, elles peuvent s'expliquer, entre autres, par la présence au sein d'un même patient, de mécanismes de résistance différents selon les différentes métastases.

Poulikakos *et al*. ont montré que les inhibiteurs de BRAF pouvaient augmenter paradoxalement la prolifération des cellules non mutées *BRAF*, *via* la formation d'homodimère CRAF-CRAF ou d'hétérodimères CRAF-BRAF capables d'activer les MAPK en aval, malgré la présence de l'inhibiteur, rendant ces cellules insensibles au traitement (331).

Quelques auteurs ont rapporté la possibilité chez un même patient d'une hétérogénéité tumorale au niveau du statut mutationnel de BRAF avec des métastases de mélanome non mutées *BRAF* et d'autres mutées *BRAF* (332, 333) pouvant alors être un mécanisme de résistance possible. Cependant, il n'a pas été observé de perte de la mutation initiale *BRAF* V600E qui persiste dans l'ensemble des tumeurs en progression, montrant que les

inhibiteurs de BRAF ne sélectionnent pas de sous-clones non mutés *BRAF* préexistants (278, 292, 334).

Les nouvelles techniques de détection d'ADN tumoral circulant plasmatique, ou de cellules tumorales circulantes plasmatiques, permettent de mettre en évidence des mécanismes de résistance au cours du suivi des patients sous traitement, de façon non invasive, et ont l'avantage de refléter cette hétérogénéité tumorale (335).

Des techniques de quantification de l'ADN tumoral circulant muté *BRAF* V600 durant le suivi des patients sous inhibiteurs de BRAF et de MEK, ont permis de montrer que la quantité d'ADN tumoral circulant muté *BRAF* V600 diminue initialement sous traitement et que son augmentation pourrait être un facteur prédictif précoce de la présence d'un mécanisme de résistance acquise (336).

Activation de STAT3 et sécrétion de PAX3

La protéine STAT3 est impliquée dans la régulation de la croissance, la prolifération, la survie cellulaire ou encore de l'apoptose. Lors de l'activation de la voie JAK (*Janus kinase*)/STAT3, les kinases de la famille JAK recrutent et activent STAT3 par la phosphorylation de résidus tyrosine. Son activation entraîne une dimérisation de STAT3 et une translocation dans le noyau où elle joue un rôle de facteur de transcription. STAT3 est aussi un transactivateur direct du promoteur de PAX3, un facteur de transcription impliqué dans l'activation du récepteur MET dans le mélanome.

Il a été montré que les lignées de mélanomes mutées *BRAF* V600E ou *NRAS* Q61K résistantes au vemurafenib ont une activation de STAT3 et une surexpression de PAX3, suite à une augmentation de la sécrétion de facteur de croissance fibroblastique 2 (FGF2) (337).

3.4 Mécanismes de résistance adaptative

Une réponse adaptative précoce aux inhibiteurs de BRAF, en outre de limiter l'efficacité initiale conduisant à des réponses incomplètes, peut favoriser la sélection de sous-populations de clones résistants et l'acquisition d'altérations qui mènent à cette résistance secondaire, causant inévitablement une progression de la maladie.

Levée du rétrocontrôle négatif de la protéine ERK

Dans les mélanomes mutés *BRAF*, la protéine BRAF mutée existe principalement sous la forme d'un monomère actif, qui active la voie MAPK en aval. Lorsque la voie MAPK est activée, cela induit un rétrocontrôle négatif dépendant de la protéine ERK, qui va alors supprimer l'activation de RAS. Ces cellules de mélanomes ont une sensibilité diminuée aux facteurs de croissance et la transduction du signal des RTK est supprimée.

L'exposition aux inhibiteurs de BRAF produit une levée de ce rétrocontrôle négatif de la protéine ERK, avec en conséquence une plus forte capacité des ligands, dont les facteurs de croissance, à augmenter l'expression de RAS-GTP, ce qui favorise la formation de dimères de BRAF, et qui active la voie. Les inhibiteurs de BRAF se lient à l'un des composants du dimère et causent une activation allostérique de l'autre composant. Ainsi, la levée du rétrocontrôle négatif dépendant de la protéine ERK restaure la sensibilité des facteurs de croissance et peut diminuer l'effet des inhibiteurs de BRAF par l'activation de RAS. Cependant, les voies de rétrocontrôle négatif sont partiellement restaurées avec le temps, conduisant à la formation d'un nouvel état d'équilibre de réactivation du signal d'ERK ; le niveau d'activation de RAS est variable dans les différentes lignées cellulaires, et dans la plupart des mélanomes il ne suffit pas à induire une résistance en l'absence d'autres signaux activateurs, mais peut coopérer avec des mécanismes qui nécessitent des RTK activés (338).

Ce mécanisme apporte une explication partielle à la variabilité des réponses observées chez les patients traités par inhibiteurs de BRAF, et suggère l'intérêt d'un traitement combiné associant un inhibiteur d'ERK à un inhibiteur de BRAF pour obtenir des réponses complètes et/ou prolongées (275).

Altérations de la voie PI3K/AKT

Dès le début de l'inhibition de la voie MAPK, on observe une activation de la voie PI3K/AKT. L'activation d'AKT est normalement limitée par l'activité de PTEN, ce qui soutient l'hypothèse que la perte de fonction de PTEN a un rôle important dans l'échec du traitement par inhibiteurs de BRAF. Cette réponse adaptative de la voie PI3K/AKT sous inhibiteurs de BRAF, de même que la fréquence élevée de mélanomes avec une perte de PTEN ou avec d'autres altérations en lien avec cette voie, indique que l'ajout d'inhibiteur de PI3K/AKT à des inhibiteurs de BRAF peut être nécessaire pour obtenir un bénéfice clinique prolongé (275).

Stimulation de la voie FOXD3 (*forkhead box D3*)

Il a été montré que le facteur de transcription FOXD3 était stimulé suite à l'inhibition de la voie MAPK, conférant une résistance à la mort cellulaire (339). L'association d'inhibiteurs de BRAF avec des inhibiteurs des intégrines pourrait surmonter ce mécanisme de résistance, en atténuant la stimulation de FOXD3 *in vitro* (340). De plus, puisque ERBB3 a été identifié comme cible transcriptionnelle directe de FOXD3, une restauration de la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF a pu être obtenue en associant le vemurafenib avec un traitement par inhibiteur de la signalisation d'ERBB, le lapatinib (324).

Stimulation de la synthèse mitochondriale et du métabolisme oxydatif

Le vemurafenib augmente le niveau respiratoire mitochondrial et la production d'espèces réactives de l'oxygène. Les cellules résistantes au vemurafenib présentent une addiction à ce métabolisme oxydatif mitochondrial, ainsi paradoxalement, l'association d'agents pro-oxydants, tel que l'elesclomol, permettent de surpasser ce mécanisme de résistance et induisent une mort cellulaire (341).

Mécanismes épigénétiques de résistance adaptative

L'inhibition de la voie MAPK, outre des altérations génétiques, peut conduire à des altérations épigénétiques qui vont moduler la transcription des gènes et donc l'expression des protéines avec des conséquences fonctionnelles entrainant une résistance à l'inhibition de la voie MAPK (310, 342).

Les modifications épigénétiques sont définies comme les mécanismes moléculaires qui régulent l'expression des gènes sans provoquer de modifications de la séquence d'ADN, en modifiant la compaction de la chromatine, ce qui permet ou non l'accès de la machinerie transcriptionnelle aux promoteurs de gènes.

Le gène *MITF* qui code pour le facteur de transcription MITF, spécifique de linéage mélanocytaire, responsable de la pigmentation de la peau et indispensable au développement et à la survie des mélanocytes, est un oncogène connu pour avoir son expression régulée par de nombreux mécanismes épigénétiques (342, 343). Il a été montré que des taux élevés d'expression de MITF jouaient un rôle important dans la résistance à l'inhibition de BRAF (287), à l'inhibition de MEK (344), et à la thérapie combinée (278, 345). En revanche, d'autres études ont retrouvé que des mélanomes avec une perte d'expression de MITF pouvaient être tout autant résistants que les mélanomes avec une expression de MITF élevée (346). Une corrélation inverse entre la perte de MITF et l'expression de RTK tels que EGFR, PDGFRβ ou AXL a été montrée comme ayant pour effet l'activation de signaux activateurs à l'origine de la résistance (346, 347) ; l'ajout de traitements ciblant ces RTK chez les patients ayant des mélanomes mutés *BRAF* (ou *NRAS*) avec une forte expression de MITF et une faible expression de l'un de ces RTK serait rationnel, mais reste à tester cliniquement.

Il a également été décrit que la réactivation de l'expression d'EGFR pouvait résulter de différents mécanismes épigénétiques dont la déméthylation de l'ADN au niveau de structures régulatrices du gène *EGFR* situées en amont et en aval du site de départ de la transcription ou par une modulation de l'expression d'EGFR par des mécanismes épigénétiques entrainant un déséquilibre de la machinerie cellulaire endosome/lysosome (348, 349).

De plus, *in vitro*, sur des lignées cellulaires, il a été montré qu'en présence d'inhibiteurs de BRAF, apparaissaient progressivement des modifications de la méthylation de certains gènes, tels que *MET*, *LEF1* (*lymphoid enhancer binding factor 1*), *DUSP4* (*dual specificity phosphatase 4*), influençant leur niveau d'expression d'ARN, leur conférant une résistance adaptative aux inhibiteurs de BRAF ; ces mêmes modifications de méthylation étaient observées sur des biopsies de mélanomes progressant sous inhibiteurs de BRAF et de MEK (310).

Outre les méthylations de l'ADN, d'autres mécanismes épigénétiques tels que les modifications des histones, et les ARN non codants, sont impliqués dans les mécanismes de résistances aux inhibiteurs de la voie MAPK, ainsi que dans les résistances aux immunothérapies, et sont des cibles thérapeutiques potentielles (343).

La résistance aux inhibiteurs de BRAF est associée à un faible niveau d'expression de protéines pro-apoptotiques (BH3 only protein, Bim-EL, Bmf) (350) et à un niveau assez élevé de molécules anti-apoptotiques (343). Les traitements agissant sur les mécanismes épigénétiques, et particulièrement les inhibiteurs d'histone déacétylase (HDAC), peuvent jouer un rôle clé pour restaurer un état apoptotique, en inhibant l'expression de protéines anti-apoptotiques et en restaurant le niveau d'expression de protéine apoptotique (343); ainsi, les inhibiteurs d'HDAC pourraient permettre de surmonter la résistance à l'inhibition de BRAF (350). De plus, les inhibiteurs d'HDAC agissent également sur la baisse du niveau d'expression de CRAF, de la protéine chaperonne HSP90 ou encore d'AKT, agissant alors à la fois sur la voie MAPK et sur la voie PI3K/AKT. Il a aussi été montré que les inhibiteurs d'HDAC pouvaient supprimer l'expression de MITF, mais également l'augmenter permettant alors de surmonter la résistance à l'inhibition de BRAF (345). Ces données contradictoires montrent que le rôle exact de MITF dans la résistance à l'inhibition de la voie MAPK n'est pas encore clairement élucidé (343).

Cibler les protéines BET (bromodomaine et domaine terminal), protéines qui reconnaissent les histones lysine acétylées et de cette façon régulent l'expression des gènes par des inhibiteurs de BET, en association aux inhibiteurs d'HDAC semble également être une stratégie thérapeutique intéressante pour surmonter la résistance aux inhibiteurs de la voie MAPK (351).

Bloquer la réactivation de la voie MAPK est également possible en ciblant la protéine BPTF (*bromodomain PHD finger transcription factor*) impliquée dans le remodelage de la chromatine. Il a été démontré que BPTF est impliquée dans la résistance aux inhibiteurs de la voie MAPK : la suppression de l'expression de BPTF induisait une diminution des niveaux d'expression des protéines ERK et phospho-ERK, et donc une restauration de la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF (352).

Il est intéressant de noter que les nouvelles technologies permettent l'identification de mécanismes épigénétiques impliqués dans la résistance, telle que la détection des méthylation de l'ADN, sur les ADN tumoraux circulants ou sur les cellules tumorales circulantes, permettant alors de refléter l'hétérogénéité tumorale intra-individuelle de ces mécanismes épigénétiques, et de suivre leur évolution sous traitement de façon non-invasive.

Rôle du microenvironnement

Il est maintenant clairement admis que le microenvironnement tumoral, notamment par la présence de fibroblastes ou de lymphocytes associés à la tumeur, a un rôle dans la réponse aux inhibiteurs de BRAF.

La plupart des études s'est intéressée aux cellules du système immunitaire, particulièrement les TIL, et à leur rôle dans la réponse au traitement. Les études faites sur des biopsies de tumeurs de patients traités par inhibiteur de BRAF ont retrouvé une augmentation significative du taux de lymphocytes CD4, de CD8 et de lymphocytes exprimant PD1 entre les prélèvements réalisés avant traitement et peu après son initiation (3 à 14 jours) (p = 0,001, p = 0,001, p = 0,017, respectivement), de même qu'une augmentation du taux de CD4 et de CD8 étaient observée sous traitement combiné par inhibiteurs de BRAF et de MEK (p = 0,017, p = 0,021) (353). De plus, une augmentation des lymphocytes exprimant CD8 serait associée à une diminution de la taille tumorale sous traitement (272), et il a été montré que les patients conservant une forte proportion de clones de TIL préexistants après l'administration du traitement avaient une meilleure réponse au traitement que les patients qui ne conservaient qu'une fable proportion de ces clones (354). De plus, des études ont confirmé que l'absence d'expression de PD-L1 en immunohistochimie et la présence de TIL dans les tumeurs étaient associées à une meilleure réponse au traitement par inhibiteurs de BRAF (355) ; *in vitro* des lignées résistantes au vemurafenib avaient une augmentation de l'expression de PD-L1, celle-ci étant empêchée par les inhibiteurs de MEK (356).

Ainsi, ces résultats soulignent la nécessité de prendre en compte l'influence du système immunitaire du patient dans la résistance au traitement et de l'intérêt de traitement associant des inhibiteurs de BRAF/MEK à des anti-PD1/PDL1 en combinaison ou en traitement séquentiel. Un essai randomisé de phase III vient de se terminer (NCT02224781)

comparant un traitement par ipilimumab et nivolumab remplacé à la progression par un traitement par dabrafenib et trametinib *versus* un traitement initial par dabrafenib et trametinib remplacé par l'association ipilimumab et nivolumab à la progression, chez des patients atteints de mélanomes stades III et IV mutés *BRAF* V600E/K (analyse en cours).

De plus EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*), enzyme qui a un rôle important dans la différentiation des lymphocytes T CD4, et particulièrement dans les lymphocytes T régulateurs qui suppriment la réponse immune dans le mélanome, est activée suite à la réactivation de la voie MAPK, *via* les voies Rb-E2F et NF-κB2 (*nuclear factor-kappa B2*), ce qui est faveur de l'intérêt d'associer des inhibiteurs d'EZH2 aux traitements par inhibiteurs de la voie MAPK pour prévenir le développement d'une immunosuppression dans le microenvironnement tumoral (357).

Les fibroblastes associés au cancer (appelés CAF pour *cancer associated fibroblasts*) sont connus pour contribuer à une résistance aux agents anti-cancéreux, dont les différents mécanismes sont peu connus. Parmi ces mécanismes, il a été montré que les CAF formaient une structure matricielle compacte et bien organisée empêchant les molécules d'atteindre les cellules de mélanome au sein du tissu tumoral (358), qu'ils pouvaient modifier la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose induite par les agents anti-cancéreux *via* les interactions entre les cellules tumorales et la matrice extracellulaire, qu'ils sécrétaient des facteurs de croissance et des cytokines favorisant la survie et la croissance des cellules tumorales, et qu'ils pouvaient interagir directement avec les cellules tumorales pour induire des modifications épigénétiques activant des signaux de survie cellulaire (359, 360). Plusieurs études ont ainsi montré qu'il y avait bel et bien une communication bidirectionnelle entre les CAF et les cellules de mélanomes induisant une résistance adaptative aux inhibiteurs de BRAF, mais que les inhibiteurs de BRAF avaient également une action directe sur les CAF. En effet, il a été montré que, d'une part le vemurafenib entrainait une augmentation de la sécrétion du TGFβ dans les cellules de mélanome, ayant alors pour effet sur les CAF de stimuler leur différenciation avec notamment l'expression de la neuroréguline 1 (NRG1), ligand du récepteur ERBB3 présent sur les cellules de mélanome, activant alors la voie PI3K/AKT (361, 362), et d'autre part que le vemurafenib, *via* une activation paradoxale de la voie MAPK des CAF qui sont non-mutés *BRAF* V600, stimulait la sécrétion d'HGF, ligand de MET, activant alors la voie PI3K/AKT dans les cellules de

mélanome (361). De la même façon, il a été montré que l'activation paradoxale de la voie MAPK des CAF induite par le vemurafenib entrainait un remodelage de la matrice extracellulaire stimulant alors la voie de signalisation intégrine β2/FAK/Src dans les cellules de mélanome (363), à l'origine d'une résistance au vemurafenib. L'ajout d'un inhibiteur de MEK au vemurafenib permettait de stopper cette activation paradoxale, de diminuer la sécrétion d'HGF des CAF et ainsi de restaurer une sensibilité au traitement (361). De plus, Fedorenko *et al*. ont montré que la sécrétion de fibronectine par les CAF en réponse au vemurafenib activait la voie de signalisation conduite par les RTK exprimés à la surface des cellules de mélanome, leur permettant de tirer pleinement profit de la présence des facteurs de croissance (HGF, NRG1) sécrétés par les CAF (364).

Par ailleurs, une étude a montré *in vitro*, que l'ajout de liquide céphalo-rachidien à des cellules de mélanomes traitées par inhibiteurs de BRAF, réduisait drastiquement la mort de ces cellules ; la sensibilité aux inhibiteurs de BRAF était restaurée par l'ajout d'un inhibiteur de PI3K. Ces résultats laissent suggérer que des facteurs extrinsèques, activant notamment la voie PI3K/AKT, contenus dans le liquide céphalo-rachidien, peuvent conférer une résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le système nerveux central ; cela peut être une explication au fait que les métastases cérébrales soient celles qui aient le plus fort taux de progression (365).

PROJET ET OBJECTIFS

PARTIE I

Un proto-oncogène est un gène qui va favoriser la prolifération des cellules cancéreuses. Les trois principales modifications génétiques qui peuvent altérer un proto-oncogène sont les mutations, les translocations et les amplifications. Le produit obtenu est hyperactif, avec un pouvoir oncogénique renforcé, stimulant la division cellulaire indépendamment de tout signal et échappant à la régulation normale.

Les deux principaux oncogènes ayant des mutations activatrices dans le mélanome cutané sont les oncogènes *BRAF* et *NRAS*, mutés dans respectivement 40 à 50% et 20 à 25% des cas (34, 74, 102) ; ces mutations sont le plus souvent mutuellement exclusives (104).

La protéine BRAF est codée par le gène *BRAF* situé sur le chromosome 7q. Les mutations les plus fréquentes de la protéine BRAF surviennent sur le codon 600. La plus fréquente (74 à 90% des cas) est la mutation V600E, elle correspond à la substitution d'une thymine (T) par une adénine (A) sur le nucléotide 1799 (G**T**G → G**A**G) situé sur l'exon 15, ce qui engendre au niveau de la protéine mutée un changement d'acide aminé en position 600 : une valine (V) est remplacée par un acide glutamique (E). Cette mutation BRAF V600E se produit au niveau du domaine kinase (Figure 6) (366), ainsi son activité kinase est 500 fois supérieure à la forme sauvage de la protéine BRAF, induisant une stimulation exagérée de la phosphorylation de la protéine ERK et de la signalisation cellulaire. La deuxième mutation la plus fréquente dans les mélanomes cutanés (16 à 29%) est la mutation BRAF V600K, ayant également une activité kinase augmentée. Certaines mutations, plus rares (G465E, G465V, D593V, G595R), ont une activité kinase réduite par rapport à celle de la forme sauvage, mais paradoxalement elles induisent aussi activation de la protéine ERK, probablement *via* des phénomènes de dimérisation de protéines de la famille de RAF (ARAF, BRAF, CRAF).

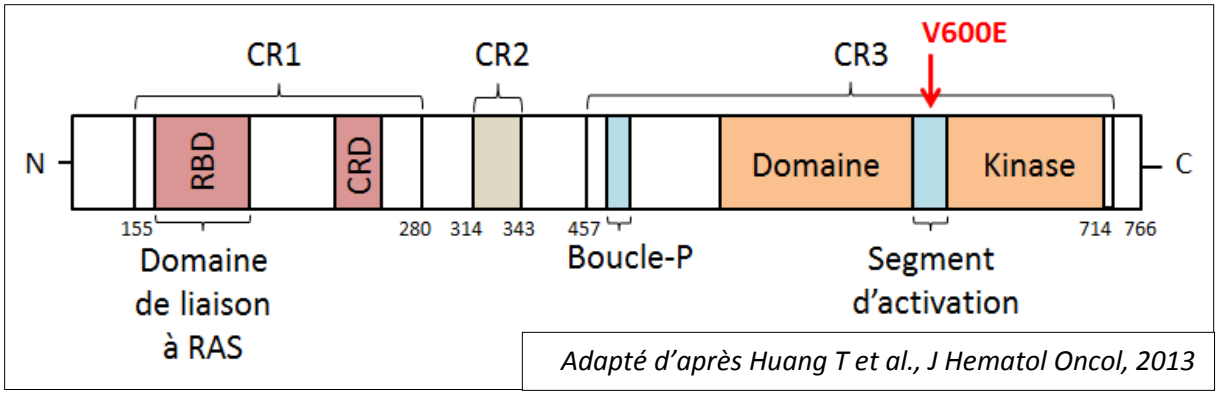


Figure 6. Représentation des 3 domaines structuraux de BRAF.
La position de la mutation oncogène V600E est indiquée par une flèche rouge. CR : Conserved region (CR1, CR2 et CR3, correspondant aux 3 régions conservées dans toutes les protéines RAF) ; RBD : RAS binding domain ; CRD : Cystein rich domain.

La présence d'une mutation d'un oncogène qui est la cible d'un traitement, est un biomarqueur *oncothéranostique*. L'adjectif théranostique est un néologisme anglosaxon provenant de la contraction de *therapeutic* et de *diagnosis*, le préfixe *onco-* désigne son utilisation dans le domaine de la cancérologie. Les inhibiteurs de BRAF, le vemurafenib et le dabrafenib, sont spécifiques des produits des gènes *BRAF* porteurs d'une mutation sur le codon V600 ; l'oncogène mutant *BRAF* V600 est alors un parfait exemple de biomarqueur oncothéranostique.

Ainsi, en pratique clinique, la prise en charge d'un patient avec un mélanome métastatique débute par la recherche d'une mutation *BRAF* V600, car cela va orienter le choix thérapeutique. Cette recherche peut-être issue de l'analyse du génotypage réalisée sur la biopsie d'une métastase accessible ou par défaut, des ganglions du curage ou de la tumeur primitive si ce sont les seuls tissus disponibles (accord d'expert, en raison de données de la littérature hétérogènes sur les discordances intra-individuelles selon les sites métastatiques) (367).

Les techniques de détection des mutations de *BRAF* V600 sont nombreuses, et diffèrent par leur sensibilité, leur spécificité, leur coût, voire leur délai de mise en œuvre. Les mutations peuvent être détectées au niveau de l'ADN, de l'ARN, voire des protéines, à partir d'un échantillon tumoral congelé ou fixé dans le formol puis inclus en paraffine (FFPE),

préalablement sélectionné par un contrôle histologique pour vérifier la présence et le pourcentage de cellules tumorales.

Les principales techniques utilisées sont :
- le test commercial Cobas (peu utilisé en France)
- le séquençage de Sanger
- le pyroséquençage
- la PCR (*polymerase chain reaction*) en temps réel (Taqman)
- la PCR gouttelette
- Séquençage de nouvelle génération (NGS)
- l'immunohistochimie par l'anticorps VE1 (spécifique de la protéine mutée BRAF V600E).

De telles techniques sont réalisées en France par des plateformes de biologie moléculaire agréées par l'Institut National du Cancer, engagées dans une démarche qualité, selon la norme ISO 15189 ; le résultat de l'analyse moléculaire doit être validé par un médecin (368).

Dans le laboratoire de biologie moléculaire de l'hôpital Ambroise Paré, en routine dans le mélanome, suite à une demande des cliniciens de recherche de mutations de BRAF, seules les mutations de BRAF sur le codon V600 sont recherchées ; la méthode de choix est le pyroséquençage, méthode rapide et fiable avec une sensibilité et une spécificité proche de 100%.

Le résultat du pyroséquençage de *BRAF* fournit un résultat quantitatif avec un pourcentage de nucléotide A et un pourcentage de nucléotide T au niveau du nucléotide 1799, correspondant alors au pourcentage d'allèles mutés de *BRAF* V600E et au pourcentage d'allèle sauvage de *BRAF* (la somme des deux faisant 100%). Le pourcentage d'allèles mutés de *BRAF* correspond alors à la charge allélique mutée (CAM) de l'oncogène *BRAF* ; la CAM est définie par le rapport muté/total, exprimée en pourcentage.

Compte-tenu d'un seuil de détection autour de 5-6%, les prélèvements pour lesquels le pourcentage de A est en-deçà de ce seuil sont considérés comme étant *BRAF* sauvages, non porteurs d'une mutation de *BRAF*. Les prélèvements avec un pourcentage de A au-dessus de 10%, sont considérés comme étant mutés *BRAF*. Les résultats autour de la zone seuil entre 7 et 10% sont d'interprétation plus difficile, prenant en considération le pourcentage de

cellules tumorales du prélèvement, et nécessitent parfois d'être contrôlés par une autre technique.

En routine, ce pourcentage de A, correspondant donc au pourcentage d'allèles mutés au sein de l'échantillon tumoral, n'est pas nécessairement fourni aux cliniciens, car aucune étude n'a montré son intérêt en pratique clinique. En effet, à notre connaissance, aucune étude n'a eu comme objectif principal de rechercher l'impact pronostique ou thérapeutique de la CAM des oncogènes *BRAF* ou *NRAS* dans le mélanome cutané métastatique.

De plus, suite à l'observation, dans le service de dermatologie de l'hôpital Ambroise Paré, de 2 cas de patients traités par vemurafenib en monothérapie pour un mélanome multi-métastatique stade IV (dont l'un avec des métastases cérébrales), ayant obtenu des réponses complètes et prolongées (supérieures à 2 et 3 ans), nous avons recherché des facteurs pouvant expliquer ces très bonnes réponses. Nous avons alors constaté que ces deux patients avaient des CAM de *BRAF* V600E très élevées (> 85 %), faisant suspecter qu'une CAM élevée pouvait être associée à une meilleure réponse au traitement par vemurafenib. Cette hypothèse est confortée par quelques études qui retrouvent une sensibilité au vemurafenib plus forte et plus fréquente des lignées de mélanomes humains mutées *BRAF* V600E homozygotes, par rapport à des lignées de mélanomes humains mutées *BRAF* V600E hétérozygotes (369, 370). Toutefois, la prévalence des mélanomes mutés *BRAF* V600E avec une CAM de *BRAF* élevée n'est pas connue ; cela ne semble pas être un événement rare, une seule étude portant sur 138 mélanomes, a retrouvé que la moitié des mélanomes mutés *BRAF* V600E, détecté par séquençage Sanger, avait une mutation homozygote (371).

Dans les cancers solides, le phénomène de l'augmentation de la CAM d'un oncogène par rapport à la charge allélique des allèles sauvages a été identifié par l'équipe de Gadzar, qui l'a appelé « déséquilibre spécifique de l'allèle muté» (ou MASI pour « *Mutant allele-specific imbalance* ») (372). Ce terme a l'avantage de refléter tous les mécanismes génétiques majeurs actuellement connus conduisant à l'excès d'allèles mutés, à savoir une amplification de la région mutée, une polysomie du chromosome qui contient l'allèle muté (ces deux mécanismes ayant pour conséquence une augmentation du nombre de copies de l'allèle muté), et la perte d'hétérozygotie, terme regroupant la perte d'un seul allèle (délétion d'un

chromosome ou d'une région chromosomique) et ce même mécanisme de délétion suivi d'une duplication d'un chromosome (paternel ou maternel) ou d'une région chromosomique, appelé « perte d'hétérozygotie à copie neutre » (Figure 7).

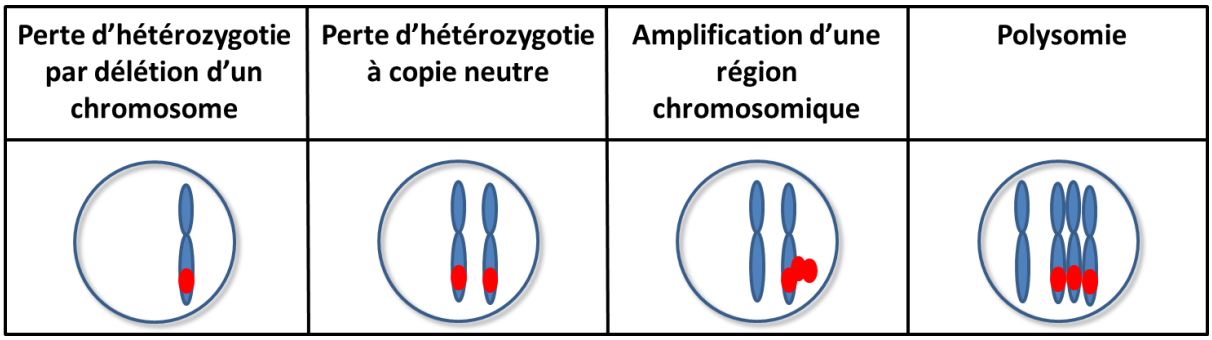


Figure 7. Représentation schématique des mécanismes majeurs augmentant la charge allélique mutée.
L'allèle muté (ou la région chromosomique porteuse de l'allèle muté) est représenté par un point rouge. Les chromosomes sont représentés en bleu ; les cellules tumorales mono- ou disomiques ont respectivement un ou deux chromosomes représentés ; l'exemple de polysomie est représenté par une cellule tétraploïde (quatre chromosomes dont trois sont porteurs de l'allèle muté).

Le mécanisme de perte d'hétérozygotie à copie neutre est fréquent dans de nombreux cancers solides (373), et hémopathies (374). Il affecte des segments courts d'ADN. Il ne peut pas être détecté par FISH (*fluorescent in situ hybridization*), contrairement aux mécanismes d'amplification (si le segment amplifié est assez grand) et de polysomie.

Au sein d'une tumeur, plusieurs de ces mécanismes coexistent, avec des sous-clones ayant un mécanisme prépondérant (Figure 8).

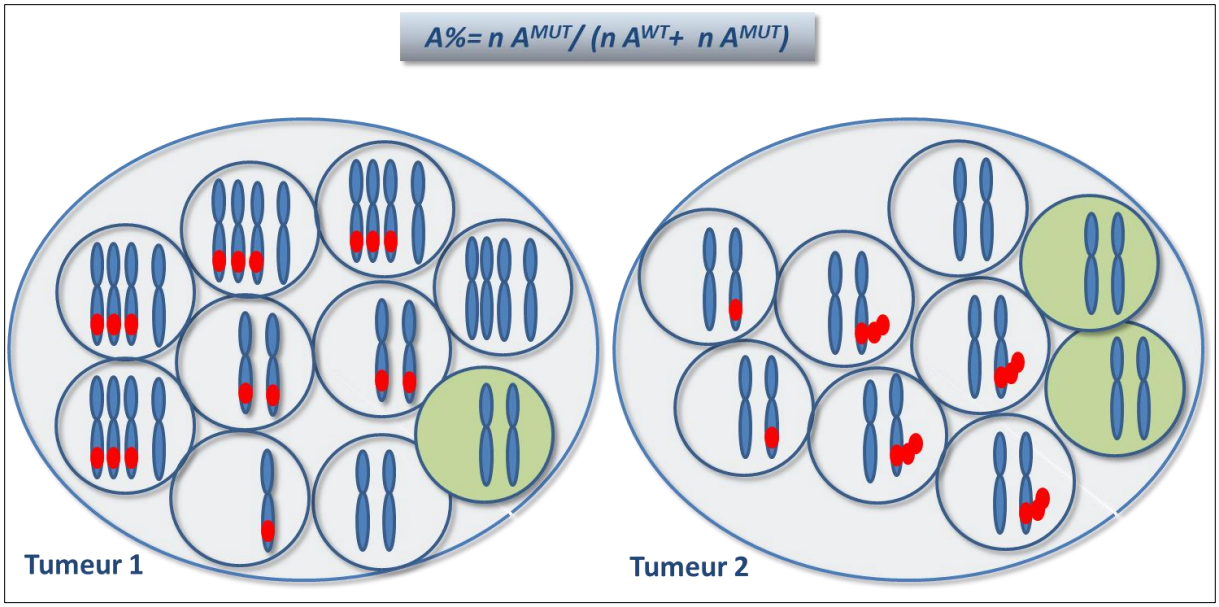


Figure 8. Modèles représentant la coexistence des différents mécanismes à l'origine des variations de la charge allélique mutée.
La charge allélique mutée correspond aux pourcentages d'allèles mutés (A%), c'est-à-dire au ratio de la quantité d'allèles mutés (n A^{MUT}) sur la quantité d'allèles totaux (allèles sauvages (n A^{WT}) + allèles mutés). La présence de cellules non-tumorales (représentées en vert), apporte une quantité d'allèles sauvages prise en compte dans le calcul de la charge allélique.

En théorie, dans une cellule disomique, comprenant un allèle paternel et l'autre maternel, la survenue d'une mutation d'un oncogène sur un seul allèle suffit pour produire une protéine ayant un gain de fonction avec un effet sur la cellule. Cette cellule, qui contient un allèle muté pour cet oncogène et un autre allèle non muté, a donc une CAM de 50% et est dite « hétérozygote ». Ainsi, dans l'hypothèse où les échantillons de mélanomes humains mutés *BRAF* contiendraient 100% de cellules tumorales identiques, que celles-ci soient toutes disomiques, sans amplification de l'oncogène muté *BRAF*, et qu'elles répondent à cette théorie, les CAM de *BRAF* devraient être autour de 50%.

Or, nous avions constaté que certains échantillons de mélanome mutés *BRAF* pouvaient avoir des CAM nettement supérieures à 50%, ou à l'inverse nettement inférieures.

Ainsi, le déséquilibre spécifique de l'allèle muté d'un oncogène défini par l'équipe de Gazdar pour décrire l'excès d'allèles mutés, peut également être étendu aux cas avec une CAM faible. En effet, les mêmes mécanismes d'amplification, de polysomie, ou de perte d'hétérozygotie peuvent également toucher les allèles sauvages au sein des cellules tumorales. De plus, au sein des échantillons tumoraux peuvent résider des cellules non

tumorales, sans mutation d'oncogène, et pouvant ainsi diminuer la CAM (Figure 7). C'est pourquoi des techniques de microdissection, sélectionnant les zones tumorales les plus riches en cellules tumorales sont utilisées, et l'interprétation de la CAM doit tenir compte du pourcentage de cellules tumorales dans la zone sélectionnée.

Nous avions également constaté que ce déséquilibre de l'allèle muté d'un oncogène, témoin d'une perte de l'état « hétérozygote global » des échantillons tumoraux, était possible dans les mélanomes mutés pour l'oncogène *NRAS*.

La plupart des mutations *NRAS* dans le mélanome se situe sur le codon 61 ; il s'agit, par ordre de fréquence, des mutations Q61R, Q61K, Q61L, et Q61H. Ces mutations correspondent à la substitution d'un seul nucléotide, entraînant un remplacement d'acide aminé dans la protéine mutée. Ces mutations peuvent également être détectées par pyroséquençage. Plus rarement, les mutations touchent les codons 12 et 13. A ce jour, les mélanomes mutés *NRAS* n'ont pas encore accès aux thérapies ciblées en dehors du cadre d'essais thérapeutiques. Les résultats de l'étude de phase III NEMO testant l'efficacité d'un inhibiteur de MEK en monothérapie dans les mélanomes mutés *NRAS* Q61, en comparaison avec un traitement par dacarbazine, ont été rapportés récemment et ont montré des résultats prometteurs (238), toutefois les CAM avant le début du traitement et leur valeur prédictive sur la survie sans progression (ou sur la survie globale) n'ont pas été rapporté.

Le premier objectif de ce projet était alors d'étudier la CAM de l'oncogène *BRAF* en tant que biomarqueur prédictif potentiel de la réponse aux inhibiteurs de BRAF en monothérapie dans le mélanome cutané métastatique, puis d'étudier la CAM de l'oncogène *NRAS* comme biomarqueur pronostique, indépendamment du traitement reçu, ce sous-groupe n'ayant pas encore d'accès à une thérapie ciblée en routine.

PARTIE II

Outre les paramètres biologiques intra ou péri-tumoraux, la réponse aux thérapies ciblées dépend de paramètres pharmacologiques. Ainsi, cette deuxième partie avait pour objectif d'étudier l'intérêt de la mesure de la concentration plasmatique de vemurafenib (CPV) lors du suivi des patients traités en monothérapie par du vemurafenib. En effet, aucune relation entre la CPV et l'efficacité ou la tolérance du vemurafenib ne figure dans le résumé des caractéristiques du produit, et aucune étude sur ce sujet n'avait été rapportée lorsque nous avons débuté nos travaux.

Les concentrations plasmatiques d'un médicament dépendent des modalités d'administration (voie d'administration, galénique, posologie,…). Ces modalités ont été choisies lors du développement du médicament afin d'assurer le maintien de ses concentrations plasmatiques dans la zone thérapeutique, zone dans laquelle l'efficacité est optimale et le risque d'effets indésirables minimal (Figure 9).

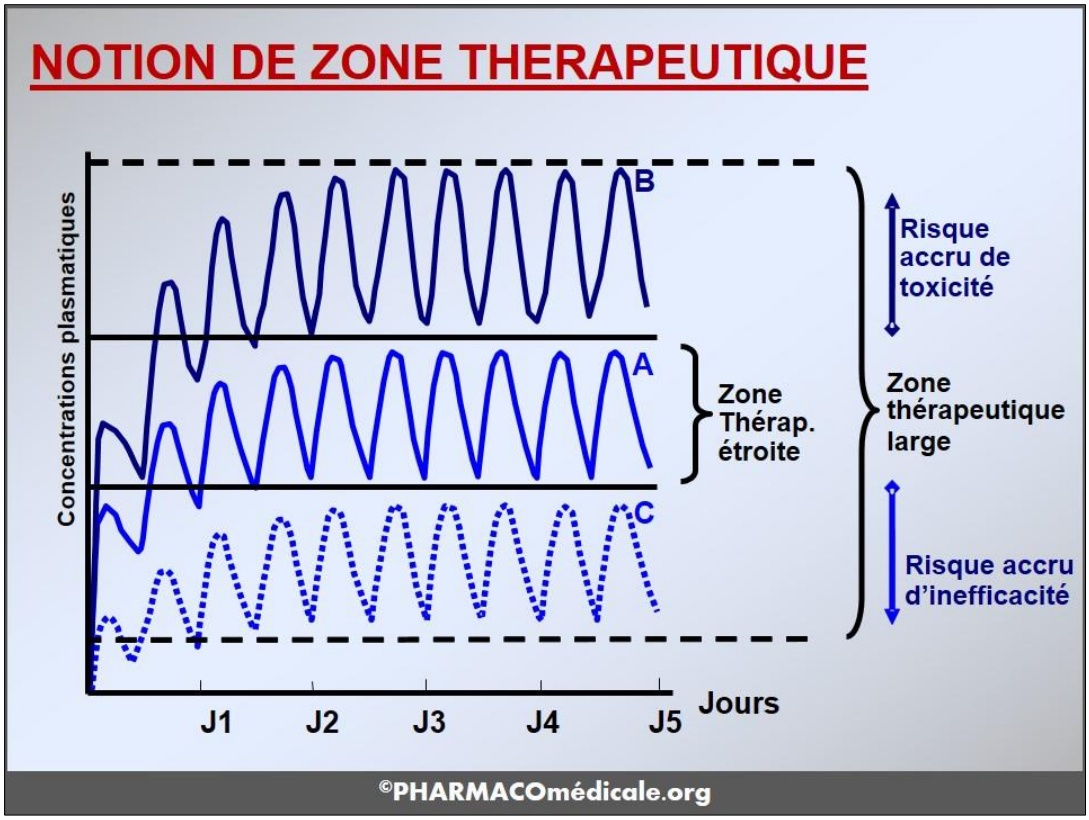


Figure 9. Intervalle thérapeutique d'un médicament.

Outre les modalités d'administration (qui conditionnent l'absorption du médicament), les concentrations plasmatiques d'un médicament dépendent de paramètres pharmacocinétiques tels que le volume de distribution (capacité de diffusion dans l'organisme), la clairance (élimination), la demi-vie (persistance du médicament, qui dépend de la clairance et du volume de distribution), la biodisponibilité (après une administration extravasculaire, fraction du médicament atteignant la circulation générale, qui dépend de l'absorption digestive ou l'effet du premier passage hépatique). Ces paramètres pharmacocinétiques sont sous l'influence de nombreux facteurs physiologiques, pathologiques, ou environnementaux.

Suite à l'administration d'une dose de médicament, les variations des concentrations plasmatiques au cours du temps sont la résultante de l'ensemble des transferts entre le milieu extérieur, le sang et les tissus. Elles dépendent donc des vitesses de transfert propres à chacune des étapes pharmacocinétiques (absorption, distribution, métabolisme, élimination). C'est pourquoi l'on raisonne sur des concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre. Le temps pour arriver à l'état d'équilibre est estimé en fonction de la durée de la

demi-vie d'élimination du médicament. La demi-vie correspond au temps nécessaire pour que la concentration plasmatique d'un médicament diminue de moitié. Après l'arrêt d'un médicament, on considère qu'il est totalement éliminé après une durée équivalente à 5 demi-vies (Tableau 3).

Nombre de demi-vie (s)	Fraction éliminée (% dose administrée)
1	50
2	75
3	87
4	94
5	97

Tableau 3. Fraction de médicament éliminée, exprimée en pourcentage (%) de dose administrée, en fonction sa demi-vie.
La fraction de médicament éliminée en fonction du temps dépend de sa demi-vie ; on considère que la quasi-totalité du médicament est éliminée au bout de 5 demi-vies (tiré de pharmacomedicale.org).

Lorsque l'administration d'un médicament est répétée, et qu'il s'accumule (ou lors d'une perfusion continue), le temps nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre est déterminé par la demi-vie. De manière similaire, l'état d'équilibre est atteint après un temps correspondant à 5 demi-vies à partir de la première administration (ou à partir de tout changement posologique de dose) (figure 10).

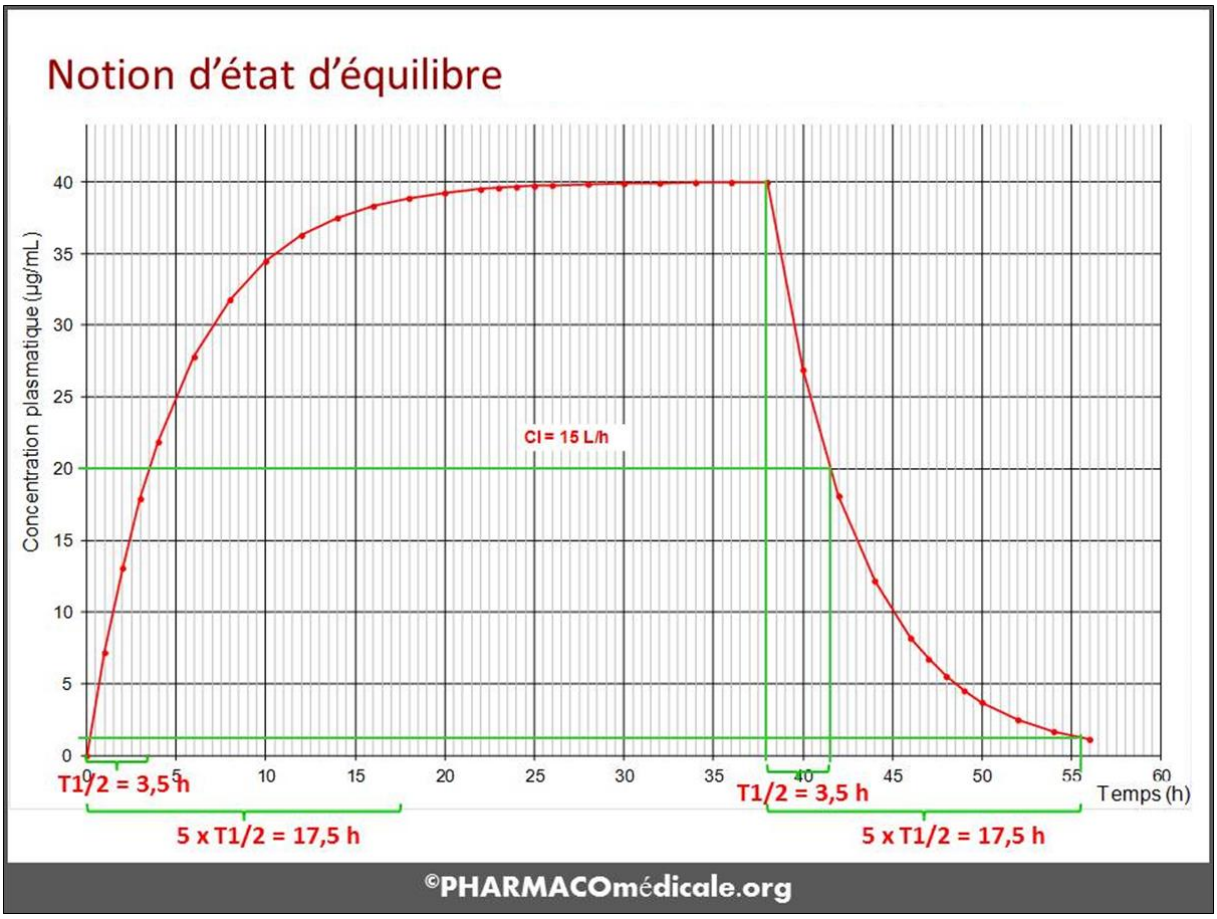


Figure 10. Courbe des concentrations plasmatiques d'un médicament en fonction du temps, lors d'une perfusion continue : notion d'équilibre pharmacocinétique.
Lors de l'administration répétée d'un médicament qui s'accumule, la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps suit la même cinétique que celle d'une perfusion continue. La demi-vie d'élimination d'un médicament détermine donc le temps pour atteindre l'état d'équilibre, défini par 5 fois la demi-vie à partir de la première administration (exemple ici avec une demi-vie de 3,5 heures ; la demi-vie du vemurafenib est estimée à 51,6 heures).

Bien que le vemurafenib ait été la première thérapie ciblée disponible en France dans le traitement du mélanome métastatique, suite aux résultats de l'étude BRIM 3 (218), peu de données pharmacocinétiques du vemurafenib sont disponibles (375).

Les résultats de l'analyse de suivi à long terme de cette étude (14) comparant un traitement par vemurafenib en monothérapie au traitement de référence par dacarbazine en première ligne de traitement, en particulier chez les patients atteints d'un mélanome métastatique porteur de la mutation *BRAF* V600E, ont montré qu'en début de traitement par vemurafenib, les patients répondaient vite, avec la moitié des patients qui obtenait une réponse en 1,4 mois, avec un taux de réponse objective (réponses complètes ou partielles,

avec une forte prédominance de réponses partielles) de 59%. Cependant, 50% des patients progressaient après 6,9 mois de traitement par vemurafenib.

En revanche, quelques patients ont des réponses prolongées, sans que l'on ne connaisse les raisons de ces différences.

En effet, aucun marqueur fiable à ce jour ne permet de prédire si un patient va répondre au traitement, échapper rapidement ou développer des effets indésirables importants. En effet, la tolérance à ces traitements est parfois mauvaise, avec notamment des effets indésirables cutanés fréquents (220).

A notre connaissance, aucune équipe avant la nôtre n'avait recherché de facteurs explicatifs de ces variabilités interindividuelles de réponse et de tolérance dans la pharmacologie du vemurafenib.

La demi-vie d'élimination est estimée à 51,6 heures mais il existe une variabilité interindividuelle importante pouvant faire varier la demi-vie apparente d'élimination d'un facteur 4 entre sujets. La biodisponibilité n'est pas connue. L'alimentation (un repas riche en graisses) augmente la biodisponibilité relative d'une dose unique de 960 mg de vemurafenib. L'effet des aliments sur l'exposition au vemurafenib à l'état d'équilibre est actuellement mal connu ; la prise à jeun de vemurafenib de manière constante peut conduire à un état d'équilibre significativement plus bas par rapport à la prise de vemurafenib de manière constante au cours ou peu de temps après un repas. La variabilité de l'exposition peut aussi être causée par des différences de contenu du liquide gastro-intestinal, de volume, de pH, de motilité et de temps de transition et de composition de la bile. Le vemurafenib est fortement lié aux protéines plasmatiques humaines *in vitro* (>99%). Le CYP3A4 est la principale enzyme responsable du métabolisme du vemurafenib *in vitro*. Des métabolites issus de la conjugaison (glucuronidation et glycosylation) ont également été identifiés chez l'homme. Toutefois, le produit parent est le composé prédominant (95 %) dans le plasma (375).

Devant ces données, et notamment face à cette forte variabilité interindividuelle, nous avons postulé que le dosage de la CPV pouvait avoir un intérêt lors du suivi des patients sous traitement, notamment en termes de réponse, et également de tolérance au traitement.

Le deuxième objectif de ce travail était alors d'évaluer l'impact du dosage de la CPV lors du suivi des patients atteints de mélanomes métastatiques avancés traités en monothérapie par vemurafenib.

PARTIE I - LA CHARGE ALLELIQUE MUTEE DES ONCOGENES *BRAF* ET *NRAS* : IMPACT DU DESEQUILIBRE ALLELIQUE

1. La charge allélique mutée *BRAF* V600E

1.1 Article 1 : Variations *BRAF* mutant allele percentage in melanomas, *BioMed Central Cancer*, 2015

Dans un premier temps, nous avons souhaité évaluer la prévalence des mélanomes mutés porteurs d'une mutation *BRAF* V600E ayant un déséquilibre allélique de *BRAF* V600E sur des échantillons sélectionnés provenant du Centre de Ressources Biologiques de l'hôpital Ambroise Paré (près de 700 échantillons disponibles).

Tout d'abord, nous avons validé la technique de mesure de la CAM par pyroséquençage de l'ADN provenant d'échantillons tumoraux, principalement FFPE, afin de confirmer que cette mesure est réalisable en routine, lors de la recherche du statut mutationnel de *BRAF*.

Puis, nous avons défini le concept de déséquilibre allélique par une CAM ≤ 30% ou > 60% dans les échantillons constitués de plus de 80% de cellules tumorales (ce qui nécessite un contrôle histologique des prélèvements étudiés sur des lames colorées à l'hématéine-éosine). En effet, un échantillon dit « hétérozygote », constitué de 100% de cellules tumorales, devrait avoir une CAM de 50%, soit autant de quantité d'allèles sauvages que d'allèles mutés. Les échantillons dits « hétérozygotes » ont donc été définis dans des échantillons constitués d'au moins 80% de cellules tumorales par une CAM comprise entre 30 et 60%.

Une fois le concept de « déséquilibre allélique » défini et confirmé sur les échantillons, nous avons mis en évidence les mécanismes pouvant être à l'origine de ce déséquilibre par FISH.

Résumé de l'article : Variations *BRAF* mutant allele percentage in melanomas, *BioMed Central Cancer*, 2015

Contexte. Les mutations de *BRAF* sont présentes dans 40% des mélanomes cutanés chez l'homme. Les tumeurs porteuses de la mutation *BRAF* V600E ayant une CAM de *BRAF* V600E élevée pourraient avoir une meilleure réponse aux inhibiteurs de BRAF/MEK. Nous avons évalué la CAM de *BRAF* V600E dans des échantillons de mélanomes cutanés humains, et les causes génétiques de ses variations.

Méthodes. La CAM de *BRAF* V600E a été quantifiée par pyroséquençage, PCR en temps réel et/ou en PCR gouttelettes. L'expression de BRAF a été détectée par immunohistochimie. Les altérations chromosomiques ont été analysées par FISH et par l'analyse du polymorphisme nucléotidique (SNP : *simple nucleotide polymorphism*).

Résultats. La quantification de la CAM de *BRAF* V600E obtenue avec la technique de pyroséquençage était fortement corrélée (r = 0,94) avec la technique de PCR en temps réel et de PCR en gouttelettes. La CAM de *BRAF* V600E quantifiée à partir de l'ADN et de l'ARN était fortement corrélée (r = 0,98). Parmi 368 échantillons avec plus de 80% de cellules tumorales, 38,6% avaient une mutation de *BRAF* V600E. Seuls 66,2% des cas étaient hétérozygotes (CAM de *BRAF* V600E comprise entre 30 et 60%). Une CAM de *BRAF* V600E augmentée (> 60%) était observée dans 19% des cas. Les analyses de FISH ont montré une polysomie du chromosome 7 dans 13,6%, 35,3% et 54,5% des échantillons de mélanomes de types *BRAF* sauvages, mutés *BRAF* V600E hétérozygotes et mutés *BRAF* V600E non-hétérozygotes respectivement (p < 0,005). Une amplification (5,6%) et une perte (3,2%) du locus de *BRAF* étaient rares. En revanche, le chromosome 7 était disomique dans 27/27 des nævus mutés *BRAF*.

Conclusion. La CAM de *BRAF* V600E est hétérogène et souvent augmentée dans les mélanomes mutés *BRAF*. Une aneuploïdie du chromosome 7 est plus fréquente dans les mélanomes mutés *BRAF*, en particulier pour ceux qui ont une CAM de *BRAF* V600E élevée.

Mots clés. Mélanome, *BRAF*, aneuploïdie, hétérozygotie.

Hélias-Rodzewicz et al. BMC Cancer (2015) 15:497
DOI 10.1186/s12885-015-1515-3

BMC Cancer

RESEARCH ARTICLE Open Access

Variations of *BRAF* mutant allele percentage in melanomas

Zofia Hélias-Rodzewicz[1,2], Elisa Funck-Brentano[1,3†], Laure Baudoux[1†], Chan Kwon Jung[4], Ute Zimmermann[1,2], Cristi Marin[1,2], Thierry Clerici[1,2], Catherine Le Gall[1,2], Frédérique Peschaud[1,5], Valérie Taly[6], Philippe Saiag[1,3] and Jean-François Emile[1,2*]

Abstract

Background: *BRAF* mutations are present in 40 % of human skin melanomas. Mutated tumors with an increased percentage of *BRAF* mutant alleles (BRAF-M%) may have a better response to RAF/MEK inhibitors. We evaluated the BRAF-M% in melanomas, and the genetic causes of its variation.

Methods: BRAF-M% was quantified by pyrosequencing, real-time PCR (rtPCR) and/or picoliter-droplet PCR (dPCR). BRAF mutant expression was detected by immunohistochemistry. Chromosomal alterations were analyzed with fluorescence *in situ* hybridization (FISH), and single nucleotide polymorphism (SNP) arrays.

Results: BRAF-M% quantification obtained with pyrosequencing was highly correlated (R = 0.94) with rtPCR, and with dPCR. BRAF-M% quantified from DNA and RNA were also highly correlated (R = 0.98). Among 368 samples with >80 % tumor cells, 38.6 % had a $BRAF^{V600E}$ mutation. Only 66.2 % cases were heterozygous (BRAF-M% 30 to 60 %). Increased BRAF-M% (>60 %) was observed in 19 % of cases. FISH showed a polysomy of chromosome 7 in 13.6 %, 35.3 % and 54.5 % of *BRAF* wild-type, heterozygous and non-heterozygous *BRAF*-mutated samples, respectively ($P < 0.005$). Amplification (5.6 %) and loss (3.2 %) of *BRAF* locus were rare. By contrast, chromosome 7 was disomic in 27/27 *BRAF*-mutated nevi.

Conclusions: BRAF-M% is heterogeneous and frequently increased in *BRAF*-mutant melanomas. Aneuploidy of chromosome 7 is more frequent in *BRAF* mutant melanomas, specifically in those with high BRAF-M%.

Keywords: Melanoma, *BRAF*, Aneuploidy, Heterozygosity

Background

Since the discovery of gain of function mutations in the proto-oncogenes *NRAS* [1] and *BRAF* [2], thousands of human skin melanoma samples have been analyzed, and the estimated incidence of *NRAS* and *BRAF* mutations are 18 % and 41 %, respectively [3]. These mutations are often mutually exclusive [4, 5]. The *BRAF* locus is localized on chromosome 7q, and most *BRAF* mutations involve the kinase activation loop at the p.V600 position. The most common *BRAF* mutation is a substitution of a valine to a glutamic acid (c.1799 T > A, p.V600E). *BRAF* V600E accounts for 85 % of exon 15 mutations in the most recent studies [6, 7]. Another mutation, V600K is present in 9 % of melanomas. These *BRAF* mutations constitutively activate the MAPK signaling pathway [8].

Two BRAF inhibitors, vemurafenib and dabrafenib, targeting the BRAF p.V600 mutated protein, have recently been shown to prolong the progression-free and/or the overall survival of *BRAF* V600-mutated advanced melanoma, as compared to dacarbazine [9–11]. However, both are limited by the development of acquired resistance in many patients, with a median progression-free survival (PFS) of 6.9 and 6.7 months for vemurafenib and dabrafenib, respectively [10, 12].

Mechanisms underlying acquired resistance to BRAF inhibitors have been extensively studied, and most of them involve acquired mutations within the same RAS-RAF-ERK pathway [13]. By contrast, only little data is available concerning biomarkers of good/prolonged response to

* Correspondence: jean-francois.emile@uvsq.fr
†Equal contributors
[1]EA4340, Versailles University, Boulogne-Billancourt, France
[2]Department of Pathology, Ambroise Paré Hospital, APHP, Boulogne-Billancourt, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2015 Hélias-Rodzewicz et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

BRAF inhibitors. Recently, a high ratio of mutant/wild-type alleles of *BRAF* was reported to be associated with a good response to BRAF inhibitors [14].

Like most oncogenes, somatic mutations of *BRAF* are thought to be heterozygous in tumors. Some studies reported that *BRAF* mutations are not heterozygous in some cases [15]. Additionally, in contrast to wild-type BRAF, which is only active as a dimer, products of alleles with gain of function mutations are also active as monomers [16].

We present herein a validated quantification of mutated *BRAF* in a large series of human skin melanoma samples, and demonstrate that several cases are not heterozygous. We also present the results of a genetic study on mechanisms of the *BRAF* mutant allele increase in melanoma.

Methods

Samples and nucleic acid extraction

All samples were obtained from the bank of biological resources of Ambroise Paré Hospital. All surgical or fine needle biopsies were performed for routine diagnosis or evaluation of disease progression. The research was performed in compliance with the ethical principles of the Helsinki Declaration (1964). In accordance with French ethics laws, all patients were informed that part of their samples could also be used for research purposes, and that they could refuse this. None of patients refused the use of samples for research. Tumor sample collection was declared to the French Ministry of Research (DC 2009-933) and CPP IDF 8 ethics committee approved the MelanCohort study (030209), which is registered with Clinicaltrials.gov (NCT00839410). Signed informed consent for translational research was obtained from patients still alive. All diagnoses were confirmed by pathology review.

For most of the nucleic acid quantification studies, the tumor DNA was extracted from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue. However, for mRNA extraction and high density SNP analysis, frozen samples were used. In all cases, a 4 micrometers-thick section was stained with hematoxylin & eosin and reviewed by a pathologist before extraction, to confirm the presence of melanoma and to select areas with the highest density of tumor cells for macrodissection. For all samples, tumors cell content was estimated in the percentage of tumor cells and the data was noted. To evaluate the accuracy of tumor cell content assessment, a series of 41 randomly selected samples was assessed by three independent pathologists.

For each sample, serial sections or punch sampling were then used for nucleic acid extraction. For DNA extraction, samples were digested by an overnight incubation in the presence of proteinase K, followed by the application of the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) as previously described [17]. The RNeasy Mini Kit (Qiagen) was applied for RNA extraction. DNA and RNA were controlled with a spectrophotometer (ND-100, Nanodrop®).

Real-time PCR

Real-time PCR (rtPCR) was performed as previously described [18]. 1 μL of DNA brought to 25 ng/μL was applied to each reaction mixture. The amplification reaction was performed in Applied Prism 7900 HT (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Each sample was analyzed in two different reaction mixes: in the first one, all *BRAF* alleles present in the tumors were amplified; in the second one, only the mutated allele was detected by peptide nucleic acids (PNAs)-specific inhibition of wild-type (WT) allele amplification. Each PCR reaction was carried out in duplicate. The primers and probe sequences were published previously [17]. The relative quantification method was used to compare expression levels of wild type allele and *BRAF* V600E mutated allele using comparative Ct method as described by Livak *et al.* [19].

Picoliter-droplet digital PCR

Picoliter-droplet digital PCR (dPCR) testing was performed using previously described protocols [20, 21] with the Raindrop Instrument (RainDance Technologies, Billerica, MA). Shortly, in a pre-PCR environment, 12.5 μL Taqman Genotyping Master Mix (Life Technologies, Saint Aubin, France) was mixed with the assay solution. The assay solution contained: 0.75 μL of 40 mM dNTP Mix (New England BioLabs, Evry, France), 0.5 μL of 25 mM MgCl2, 2.5 μL of 10x Droplet Stabilizer (RainDance Technologies), 1.25 μL of 20x Taqman® Assay Mix containing 8 μM of forward and reverse primers, 200 nM of 6-FAM and 200 nM of VIC Taqman® labelled-probes (Additional file 1) and target DNA template to a final reaction volume of 25 μL. A minimum of 280 ng of DNA was used in each assay. 5 millions highly monodispersed droplets were generated using the Raindrop source instrument following manufacturer's instructions. The emulsions were submitted to thermocycling, starting with 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 45 cycles of: 95 °C, 15 s and 60 °C, 1 min (using a 0.6 °C/min ramp rate). After completion, the end-point fluorescence signals from each droplet were measured using the Raindrop Sense instrument. Analyses of the data were performed using the Raindrop analyst software as previously described [20, 21]. The reference sequence was B-RAF cDNA sequence (GenBank NM_00433.4).

Pyrosequencing

Pyrosequencing was performed as previously described [22]. It is a method of DNA sequencing based on the "sequencing by synthesis" principle. The results are displayed in the form of peaks corresponding to the detection of pyrophosphate release after nucleotides incorporation

The chi2 test supplemented when necessary in Yates correction was used to analyze the differences between different BRAF-M% groups and chromosome 7 status. The t-test was used to compare tumors with less or more than 80 % of tumor cells. The results were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Validation of *BRAF* mutated allele quantification

The percentage of *BRAF* mutant alleles (BRAF-M%) in patients with melanoma was evaluated with two quantitative methods. Both pyrosequencing and real-time PCR allowed quantification of the relative amount of c.1799 T > A substitution. However these methods are only used qualitatively in determining *BRAF* status in clinical practice. We analyzed DNA extracted from 77 FFPE melanoma samples with both methods, and found a high positive correlation (R = 0.94) of BRAF-M% (Additional file 2A). For 7 samples, BRAF-M% obtained by pyrosequencing was compared with the absolute number of both alleles assessed by picoliter-droplet digital PCR in limiting dilution conditions and obtained similar results (Additional file 3A, B). We thus decided to use pyrosequencing for the subsequent quantitative analysis of *BRAF* V600E mutation.

As quantification of genomic DNA obtained from FFPE samples may not be representative of *BRAF* mutated messenger RNA (mRNA), we extracted both mRNA and genomic DNA (gDNA) from 27 frozen melanoma samples. Each sample was then analyzed with pyrosequencing assays designed to be specific for either cDNA or gDNA. A high correlation (R = 0.98) of BRAF-M% between *BRAF* V600E cDNA and gDNA was observed (Additional file 2B). Thus, the BRAF-M% assessed in genomic DNA from FFPE samples by pyrosequencing may be considered representative of the relative quantities of mutated/WT *BRAF* in mRNA.

Quantification of *BRAF* mutation

Pyrosequencing quantification was obtained in 475 FFPE melanoma samples from 428 patients with AJCC stage III or IV melanoma with either V600E or WT *BRAF*, after histological evaluation of the percentage of tumor cells (flow chart in Additional file 4). No discordance concerning *BRAF* mutational status was observed among the 46 patients with at least two distinct melanoma samples, and the median BRAF-M% variation was 2.5 %. As expected, according to the percentage of tumor cells in mutated *BRAF* melanomas, we observed a distinct distribution of the percentage of mutated allele (Fig. 1a). The inter-pathologist reproducibility for the evaluation of tumor cell content was substantial for the 80 % cut-off ($\kappa = 0.79$), and was only moderate for the 70 % cut-off ($\kappa = 0.49$). Thus, we decided to use the cut-off of 80 % of tumor cells. The distribution of mutated *BRAF* amounts in samples with less (n = 107) or more (n = 368) than 80 % of tumor cells were significantly different ($P < 0.05$). Therefore, we thus excluded samples with less than 80 % of melanoma cells from further analysis.

Among the 368 remaining samples, 142 were considered *BRAF* mutated (38.6 %); however BRAF-M% was highly heterogeneous (Fig. 1b), ranging from 10 % to 90 %. The majority of *BRAF* mutant cases (66.2 %, n = 94) had 30 % to 60 % of BRAF-M%, and were therefore considered heterozygous. By contrast, 48 cases were considered non-heterozygous for the *BRAF* mutation with BRAF-M% >60 % (n = 27) or <30 % (n = 21). Most *BRAF* mutated cases with BRAF-M% from 10 % to 30 % have been confirmed with another method and/or on another sample of the same patient. Immunohistochemistry with VE1 was performed on whole slides in cases with BRAF-M% <30 % when available (n = 14/21), and none of these cases contained any tumor area with loss of BRAF mutant expression.

In order to validate our results showing heterogeneous distribution of BRAF-M% in mutated melanoma tumors, we investigated the next-generation sequenced DNA mutation data of the 104 mutated skin melanomas in the TCGA database. The BRAF-M% from TCGA database ranged from 8 to 97 %, and the distribution was in keeping with our observation (Table 1).

Genetic causes of BRAF-M% heterogeneity

To elucidate mechanisms leading to BRAF-M% variation, we analyzed copy number alterations of chromosome 7 and *BRAF* locus. FISH was performed on TMA with two probes specific for the *BRAF* locus and for the chromosome 7 centromere. Among 125 samples, four types of chromosome 7 alterations were observed with *BRAF* probe RP11-121G9/centromere 7 (Fig. 2): no alteration (disomy), disomy but rare cells with polysomy, polysomy, and monosomy, which were respectively detected in 18.4 % (n = 23), 43.2 % (n = 54), 29.6 % (n = 37) and 3.2 % (n = 4) of cases. *BRAF* locus was amplified (6 to numerous *BRAF* copies) in 5.6 % of cases (n = 7).

FISH was also performed on 44 samples with another probe for the *BRAF* locus (SureFISH 7q34 *BRAF*) and similar results were obtained in all cases. To further confirm FISH results, we analyzed single nucleotide polymorphisms on chromosome 7 in 18 samples, and again all genomic results obtained were concordant with FISH (Table 2 and Additional file 5).

We then compared *BRAF* mutation allele quantity and chromosome 7 copy number changes (Additional file 6). Disomy of chromosome 7 - or only few cells with polysomy - were detected in 78 % (n = 46/59) of BRAF wild-type samples, but in only 47 % (n = 31/66) of *BRAF* mutants; however the difference didn't reached statistical significance ($P = 0.08$). Quantification of BRAF-M% was

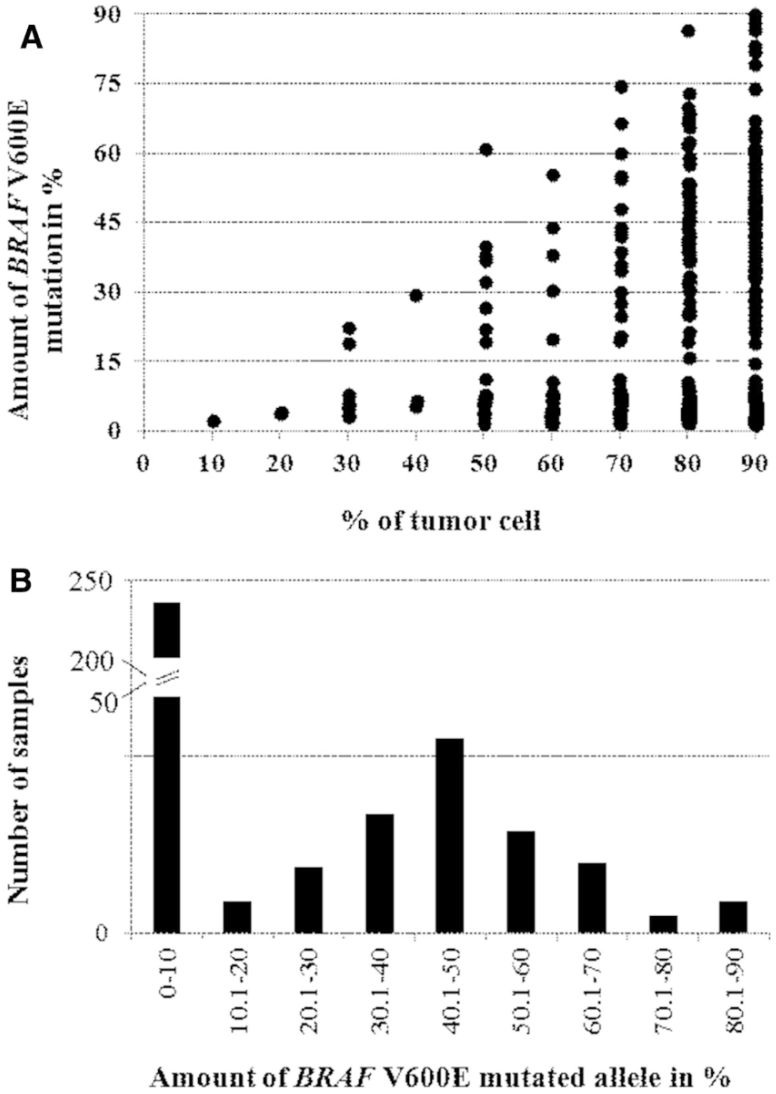


Fig. 1 Variations in the percentage of *BRAF* V600E mutation in melanomas. **a** Scatter plot representation of the amounts of wild-type and V600E *BRAF* allele distribution in relation to the percentage of tumor cells in 475 FFPE melanoma samples. **b** Histogram representation of the percentage of *BRAF* V600E mutated allele in 368 melanomas obtained by pyrosequencing analysis. The Y axis corresponding to the number of cases is broken between 50 and 200

not validated in samples with mutations other than V600E (n = 10/66). Correlation with FISH showed a polysomy of chromosome 7 in 13.6 % (n = 8/59), 35.3 % (n = 12/34) and 54.5 % (n = 12/22) of wild-type, heterozygous and non-heterozygous samples, respectively ($P < 0.05$) (Fig. 3). Furthermore, none of the 22 non-heterozygous cases, versus 33.9 % (n = 20/59) of the *BRAF* WT group, were diploid ($P < 0.05$). Among the 22 non-heterozygous samples, six had low BRAF-M% (Additional file 6). Six of the 10 samples with other *BRAF* mutations had a polysomy of chromosome 7.

Table 1 Comparison of the percentage of *BRAF* V600E mutation between our series and the TCGA database

Mutant allele frequency	Our study No. (%)	TCGA No. (%)
<30 %	21 (14.8 %)	19 (18.3 %)[a]
30-60 %	94 (66.2 %)	60 (57.7 %)[b]
<60 %	27 (19.0 %)	25 (24.0 %)
Total	142 (100.0 %)	104 (100.0 %)

[a]includes one complex mutation (P318F;V600E)
[b]includes one complex mutation (K183E;V600E)

BRAF copy number and BRAF expression

We also investigated the VE1 data for 114 samples from TMA slides. Both VE1 and FISH data were available for 45 *BRAF* V600E mutated melanomas. The VE1 staining were stronger in mutated cases showing hyperploidy or amplification for chromosome 7 (74 %, 17/23) than in tumors with only one chromosome 7 or with no (disomy) or minor (rare cells with polysomy)

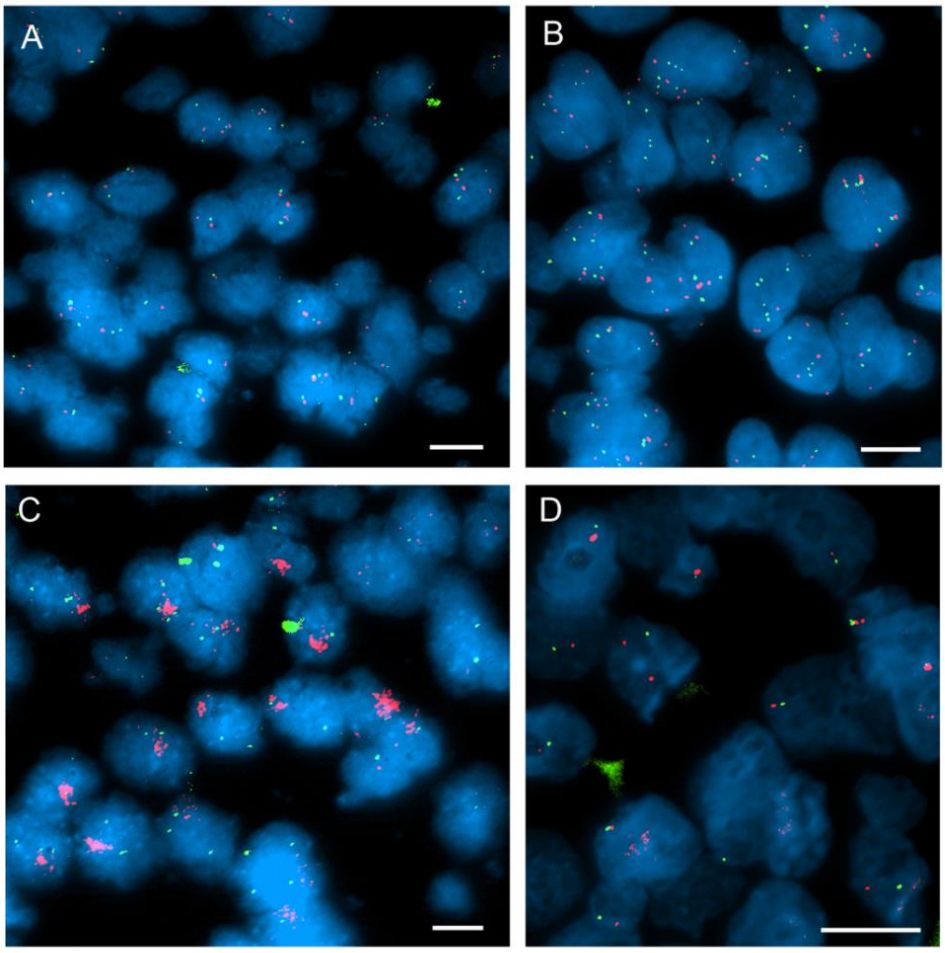


Fig. 2 Chromosome 7 alterations in human melanomas by FISH. Representative images of FISH with *BRAF*/chromosome 7 centromere probes in melanomas with different chromosome 7 alterations. **a** no alteration (disomy) but rare cells with chromosome 7 polysomy; **b** chromosome 7 polysomy; **c** *BRAF* amplification; d) chromosome 7 monosomy. White bar = 10 μm

alterations (32 %, 7/22) ($P < 0.05$). Interestingly, the VE1 staining was stronger in melanomas with BRAF-M% >60 % than in those <60 %, but this was not statistically significant.

BRAF and chromosome 7 statuses in melanocytic nevi

The frequent chromosome 7 aneuploidy may be the cause or the consequence of *BRAF* mutations in melanomas. Alternatively, it may occur in melanocyte proliferations regardless of *BRAF* mutations. To address this question we analyzed 42 dermic and/or junctional melanocytic nevi. BRAF p.V600E mutation were detected by immunohistochemistry with VE1 on tissue arrays in 78.6 % (n = 33) of nevi. *In situ* hybridization with probes corresponding to the *BRAF* locus and the chromosome 7 centromere was interpretable in 27 of these 33 BRAF mutant benign tumors (81.2 %), and chromosome 7 was diploid in all cases (Fig. 3).

Discussion

The primary objective of this study was to assess the percentage of *BRAF* mutated allele (BRAF-M%) in a large series of human melanoma samples. For this purpose, we first validated quantification by pyrosequencing by comparing it with 2 other methods: real-time PCR and picoliter-droplet digital PCR. We also demonstrated a close correlation of BRAF-M% quantifications in genomic DNA and messenger RNA. The best inter-pathologist reproducibility of the estimation of the percentage of tumor cells in mutated melanoma was obtained with a cut-off at 80 %. Furthermore, the mean BRAF-M% was significantly lower for cases with <80 % of tumor cells, probably due to the presence of the wild type non-tumor cells. We therefore limited the analysis to samples containing at least 80 % of tumor cells.

Using this validated quantitative method, we analyzed BRAF-M% in a series of 368 melanoma samples and found that it was very heterogeneous. We then investigated the

Table 2 Summary of chromosome 7/*BRAF* genetic status by SNP array and FISH analyses in melanomas

Samples	Tumor polyploidy[1]	BRAF Chromosome 7q34		FISH[2]	Amount of mutated allele by pyrosequencing	% of tumor cell	V600 status	Chromosome 7 rearrangements[3]
		Copy number	Allele disequilibrium					
B243039	Diploid	2	AB	2	2	90	WT	7pA/7qAB
B227278	Diploid	2	AB	2	2	90	WT	7pter-7q35 AB/7q35-qter A
B231355	Poly 3	2	AA	3	3	80	WT	7pter-7p21.3 AAB/7p21.3 AAB/7p21.3-p15.2AAABB/7p15.2-14.3 AAB/7q11.1-q11.2AAABB[a]/7q11.2-q11.3 AAB[a]/7q11.3-q21.11 AAABB[a]/7q21.11-q31.1 AAB[a]/7q31.1-7qter AA[a]
B228256	Poly 3	3	AAB	3	3	90	WT	Non
B210964	Diploid	3	AAB	4A	3	80	WT	7pAABB/7qAAB/7qAA/7qAAB 7q complex rearrangements
B233522	Diploid	2	AB	2	4	90	WT	Non
B202779	Diploid	2	AB	NR	4	90	WT	Non
B232220	Diploid	2	AB	3	5	90	WT	Non
B236394	Diploid	2	AB	NR	5,5	90	WT	Non
B233492	Diploid	2	AB	3	35,5	90	V600E	Non
B235230	Diploid	3	AAB	3	43	80	V600E	Non
B239110	Poly 3	4	AABB	NR	45	90	V600E	Non
B230177	Diploid	2	AB	3	46	90	V600E	Non
B226709	Poly 3	4/5	AABB/AAABB[a]	4B	48	90	V600E	7pter - 7q11.2 AAB/7q11.2-q35 AAABB/q35-qterAABB
B230962	Poly 3	5	AAABB	4B	50	80	V600E	7pter-7q11.22 AABB/7q11.22-7qter AAABB
B236134	Poly 3	4/5	AABB/AAABB[a]	4A	51,5	90	V600E	7pter-7p21.1 AABB/7p21.1-p12.1 AAB/7p21.1-7q31.1AABB/7q31.1-qter AABB/AAABB[a]
B227502	Diploid	3	AAB	NR	55,5	80	V600E	7p-7q22.3 AB/7q22.3-qter AAB
B217182	Poly 3	3	AAB	4A	61	80	V600E	Non
B230859	Poly 3	5	AAABB	3	68,5	80	V600E	7pter-p21.1 AAB/7p21.1-7p11.1 AB/7qAAABB
B231121	Poly 3	3	AAB	3	74,5	90	V600E	7pter-7q13 AB/7p13-7qter AAB
B230002	Diploid	3	AAA	4A	NA	90	V600K	7pter-7q21.1 AA/7q21.1-q34 AAA/7q34-qterAA
B223249	Diploid	4	AAAA	NI	NA	80	V600K	7pAB/7qAAA

[1]Tumor ploidy level was estimated by copy number analysis of SNP data
[2]*BRAF*/chromosome 7 centromere interpretation of FISH analysis: 2 – cells with two copies of chromosome 7; 3 – cells with two copies of chromosome 7 but rare cells showing an increased number of chromosome 7; 4 – cells with chromosome 7 gains, (A) chromosome 7 in 3 or 4 copies, (B) chromosome 7 in more than 4 copies, NI – not interpretable
[3]Chromosome 7 genetic status presents as disequilibrium of alleles A and B (SNP analysis).
NA - not available, WT – wild-type,[a] - clonal aberration

genetic cause of this high heterogeneity by FISH and high density SNP array, and demonstrated that chromosome 7 aneuploidy was the main mechanism of unbalanced *BRAF* allelic ratio. Finally we showed that, as opposed to melanomas, benign melanocytic tumors with *BRAF* mutations did not have any chromosome 7 instability.

Although oncogenic mutations are expected to occur in only one of the two parental alleles, we found that only two thirds of *BRAF* mutated melanomas were heterozygous. Decreased (<30 %) and increased (>60 %) levels of V600E mutations were detected in 14.8 % and 19 % of mutated *BRAF* p.V600E melanomas, respectively. Unbalanced *BRAF* mutations have been previously reported to be frequent in smaller series of melanoma [14, 16, 25]; however quantitative methods were not clearly validated, and correlation with mRNA levels was not established. Our results were further confirmed by analysis of the TCGA database. These results raise

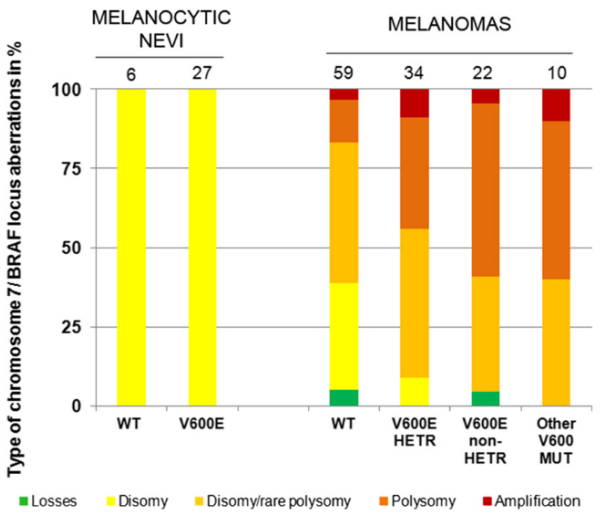


Fig. 3 Frequency of chromosome 7 aberrations in *BRAF* mutant melanoma (n = 125) and melanocytic nevi groups (n = 33).Histogram representation of prevalence of chromosome 7 abnormalities evaluated by FISH in 115 melanomas depending on the amounts of V600E mutation, in 10 melanomas with *BRAF* exon 15 mutations different from V600E and in 33 melanocytic nevi. WT – wild-type, HETR – heterozygous, MUT – mutation

important questions concerning BRAF targeted therapies. Indeed, ATP-competitive RAF inhibitors have different effects in cells expressing wild-type or mutant BRAF forms, with up- or down-regulation of the ERK signaling pathway in certain *in vitro* conditions [26]. Furthermore, activation of the wild-type form depends on dimerization, while monomeric mutant forms have been shown to be active [16]. As BRAF-M% appears to be highly heterogeneous in melanomas, one could expect differences in response to ATP-competitive RAF inhibitors between tumors. Data from a recent clinical study support this hypothesis, showing that the *BRAF* V600 mutation level was significantly associated with a better response rate to vemurafenib during the first 10 months of treatment [14]. In our series, two patients with increased *BRAF* V600E levels (86.6 % and 86.7 %) had a prolonged disease-free survival during respectively 25 and 39 months of BRAF p.V600 inhibitors therapy. These results emphasize the appeal of mutant *BRAF* quantification assessment prior to BRAF inhibitor treatment, to correlate with clinical response rate and survival. In clinical practice, the quantification of BRAF mutations deserves to be considered as a standard item in reporting the mutational status of BRAF. Furthermore, *in vitro* screening of new drugs should include cell lines with different BRAF mutant levels, thus more closely representative of BRAF-M% in patients' melanomas. Of note, an *in vitro* study showed that 4/4 melanoma cell lines with homozygous $BRAF^{V600E}$ mutations were sensible to vemurafenib, while 3/6 with heterozygous $BRAF^{V600E}$ mutations were resistant [27].

Our initial hypothesis was that amplification of the BRAF locus is responsible for high BRAF-M%. However, *BRAF* amplification was observed in only 5.6 % of samples (n = 7), including 5 *BRAF* mutated cases. By contrast, we detected a polysomy of chromosome 7 in the majority of cases with high BRAF-M%. A second FISH analysis with another probe specific for the *BRAF* locus and SNP analysis on chromosome 7 confirmed the quality of our FISH data.

The low BRAF-M% may be related to the presence of non-tumor cells. Indeed, we observed a relationship between percentage of tumor cells and BRAF-M%. However cases with low BRAF-M% were also detected when including only samples with >80 % of tumor cells. Tumor heterogeneity of *BRAF* mutated melanomas, including some areas without *BRAF* mutations, have been reported by a few groups [28, 29], and could also be responsible for low BRAF-M%. Therefore, we performed an *in situ* analysis of cases with <30 % of mutant allele by immunohistochemistry with the BRAF p.V600E-specific VE1 antibody on whole slide sections. In all cases available for analysis, no negative areas were detected. Thus the main cause of low BRAF-M% is probably similar to high BRAF-M%. Unfortunately, we cannot confirm this in the present study, because only 6 cases were analyzed by FISH. Interestingly, *BRAF* mutated tumors with numerous copies of chromosome 7 displayed stronger VE1 staining, suggesting a higher expression of the *BRAF* mutant allele.

We report herein that only 18.4 % of melanomas had no alterations of chromosome 7. Other groups have already shown that chromosome instability is not restricted to chromosome 7. Indeed DNA copy number alterations were widely studied in both primary melanomas [30, 31] and melanoma cell lines [31–34] and frequent gains of 6p, 7, 8, 17q and 20q and losses of 9p, 10, 21q were reported. However, these studies did not quantify the amounts of the mutated BRAF allele. Two groups correlated chromosome 7 copy numbers with BRAF mutational status [15, 35]; however BRAF-M% was evaluated on sequence electropherogram peaks. Willmore-Payne et al. detected seven cases with chromosome 7 polysomy and two with *BRAF* amplification [15]. The percentage of *BRAF*-mutated and WT alleles were compared with 100 K SNP chip data for chromosome 7 by Spittle and colleagues [25]. However, this analysis, carried out in eight melanoma cell lines, showed the preferential amplification of mutant *BRAF* as a mechanism of an increased ratio of mutant/WT *BRAF*.

We detected the *BRAF* p.V600E mutation in 78.6 % of dermal and/or junctional melanocytic naevi. These results were obtained through immunohistochemistry with the VE1 antibody, whose specificity, sensitivity and reproducibility were demonstrated in melanomas [17, 22, 36]. A similar frequency of *BRAF* mutations in the same types of nevi has already been reported [37]. We then analyzed

chromosome 7 aneuploidy in *BRAF* mutated nevi with FISH of chromosome 7. As opposed to the results obtained in melanoma, no alterations were detected in the 27 cases of nevi available, thus excluding a causal link between *BRAF* mutations and chromosomal instability in melanocytic tumors. These results are in keeping with previously published data [38]. *BRAF* was previously proposed to be the driver of copy number increase in melanoma [35]. The present data do not support this hypothesis. However, association of chromosome 7 aneuploidy with malignancy was significant in *BRAF* mutated melanocytic tumors (35/66 versus 0/27, $P < 0.05$). Our results suggest that, among the high number of genetic alterations present in melanomas, a frequent oncogenic pathway is characterized by an early gain of function mutation in *BRAF* and a late transforming mutation in another gene responsible for chromosomal instability. However, this has to be confirmed in cell models.

Conclusions

BRAF inhibitors are widely used to treat patients with *BRAF* mutated melanoma, but most metastatic patients with initial tumor response develop acquired resistance with a median PFS of less than 7 months [10, 12]. Biomarkers of long-term response are still missing; however a high BRAF-M% was recently reported to be correlated with a prolonged response. We show here that only two thirds of *BRAF* V600E melanomas have a heterozygous mutation. Thus quantitative, rather than qualitative, evaluation of *BRAF* mutation deserves to be considered as a standard item in reporting the mutational status of melanoma. Prospective clinical studies are necessary to determine the BRAF-M% prognostic impact in term of response rate or prolonged response to BRAF inhibitors, and to confirm that BRAF-M% could be used as a biomarker of long-term response in clinical practice.

Additional files

Additional file 1: Oligonucleotides used for *BRAF* gDNA/cDNA analysis and *BRAF* dPCR.

Additional file 2: Correlation analysis of BRAF V600E mutated allele frequency. *A*) in 77 FFPE melanoma samples by pyrosequencing and rtPCR. B) in gDNA and cDNA in 27 frozen melanoma samples.

Additional file 3: Picoliter-droplet digital PCR (dPCR) analysis for *BRAF* V600E in melanomas. A) Representative results of dPCR analysis for *BRAF* V600E on DNA obtained from 2 melanomas with different percentage of mutated allele evaluated by pyrosequencing. On the x and y axis are reported the fluorescence intensity of droplets positive for *BRAF* V600E and *BRAF* wild-type, respectively. The percentage of *BRAF* V600E, *BRAF* wild-type and empty droplets are reported in images. B) Comparison of *BRAF* mutated allele frequency detected by pyrosequencing and dPCR for 7 melanoma samples.

Additional file 4: Workflow for melanoma and melanocytic nevi samples regarding the type of molecular analysis carried out.

Additional file 5: Chromosome 7 alterations by Illumina BeadChip HumanCore SNP array. Examples of chromosome 7 alterations in 5 *BRAF* V600E mutated and in one *BRAF* wild-type melanoma (C). In each case, $\log R_2$ ratios for the SNP and B allele frequency are plotted on the X axis above the chromosome ideogram. For $\log R_2$ ratios, values centered on 0 indicate diploid copy number. Values under and above 0 indicate losses and gains respectively. For B allele frequency, values differ from around 0.5 indicated LOH.

Additional file 6: Summary of pyrosequencing and FISH results. BRAF-M% and FISH results obtained for 125 melanomas analyzed by FISH with BRAF BAC/chromosome 7 centromere probes.

Abbreviations

BAC: Bacterial artificial chromosome; BRAF-M%: Percentage of *BRAF* mutant alleles; dPCR: Picoliter droplet PCR; FFPE: Formalin fixed paraffin embedded; FISH: Fluorescence *in situ* hybridization; PFS: Progression-free survival; rtPCR: real-time PCR; SNP: Single nucleotide polymorphism; TMA: Tissue microarray; WT: Wild type.

Competing interests

VT has received honoraria from RainDance Technologies. JFE received honoraria from Roche and Glaxo Smith Kline for counseling on patients with melanomas on the diagnosis and/or treatment with BRAF inhibitors. PS received honoraria for counseling on diagnosis and/or treatment of patients with melanomas from Roche and Glaxo Smith Kline.

Authors' contributions

Conception and design: PS and JFE. Development of methodology: ZHR, LB, CLG, VT and JFE. Study supervision: ZHR, PS and JFE. Writing of the manuscript: ZHR, EFB, JFE. All authors participated in the acquisition, analysis and interpretation of data (acquired and managed patients, provided facilities, etc.). All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Arthur Frohlich, Maxence Tondu, Mariama Bakari, Glwadys Faucher, Dominique Péchaud, Yolaine Pothin, Sylvie Surel and Nathalie Terrones for technique contribution and/or data collection, Dr Alain Beauchet for statistical analysis and Astrid Blom for article review. This work was supported partly by grants from the Association Vaincre le Mélanome, Ligue Contre le Cancer (Comité 92 WB2013-232), and Association pour la Recherche et l'Enseignement en Pathologie (AREP).

Author details

[1]EA4340, Versailles University, Boulogne-Billancourt, France. [2]Department of Pathology, Ambroise Paré Hospital, APHP, Boulogne-Billancourt, France. [3]Department of Dermatology, Ambroise Paré Hospital, APHP, Boulogne-Billancourt, France. [4]Department of Hospital Pathology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea. [5]Department of Surgery, Ambroise Paré Hospital, APHP, Boulogne-Billancourt, France. [6]INSERM UMR-S1147, University Paris Sorbonne Cite, Paris, France.

Received: 9 January 2015 Accepted: 26 June 2015
Published online: 04 July 2015

References

1. Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, Cordon-Cardo C, McNutt NS, Bressler J, et al. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. Oncogene. 1989;11:1363–74.
2. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002;417:949–54.
3. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. Br J Dermatol. 2011;164:776–84.
4. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. Clin Cancer Res. 2003;9:6483–8.
5. Akslen LA, Angelini S, Straume O, Bachmann IM, Molven A, Hemminki K, et al. BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are

not associated with tumor cell proliferation or patient survival. J Invest Dermatol. 2005;125:312–7.
6. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. J Clin Oncol. 2011;29:1239–46.
7. Greaves WO, Verma S, Patel KP, Davies MA, Barkoh BA, Galbincea JM, et al. Frequency and spectrum of BRAF mutations in a retrospective, single-institution study of 1112 cases of melanoma. J Mol Diagn. 2013;15:220–6.
8. Yang H, Higgins B, Kolinsky K, Packman K, Go Z, Iyer R, et al. RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. Cancer Res. 2010;70:5518–27.
9. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. N Engl J Med. 2010;363:809–19.
10. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. N Engl J Med. 2011;364:2507–16.
11. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. N Engl J Med. 2012;366:707–14.
12. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. Lancet. 2012;380:358–65.
13. Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. Nat Med. 2013;19:1401–9.
14. Lebbé C, How-Kit A, Battistella M, Sadoux A, Podgorniak MP, Sidina I, et al. BRAF(V600) mutation levels predict response to vemurafenib in metastatic melanoma. Melanoma Res. 2014;24:415–8.
15. Willmore-Payne C, Holden JA, Hirschowitz S, Layfield LJ. BRAF and c-kit gene copy number in mutation-positive malignant melanoma. Hum Pathol. 2006;37:520–7.
16. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). Nature. 2011;480:387–90.
17. Colomba E, Hélias-Rodzewicz Z, Von Deimling A, Marin C, Terrones N, Pechaud D, et al. Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing. J Mol Diagn. 2013;15:94–100.
18. Didelot A, Le Corre D, Luscan A, Cazes A, Pallier K, Emile JF, et al. Competitive allele specific TaqMan PCR for KRAS, BRAF and EGFR mutation detection in clinicalformalin fixed paraffin embedded samples. Exp Mol Pathol. 2012;92:275–80.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). Method Methods. 2001;25:402–8.
20. Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. Clin Chem. 2013;59:1722–31.
21. Emile JF, Diamond EL, Hélias-Rodzewicz Z, Cohen-Aubart F, Charlotte F, Hyman DM, et al. Recurrent RAS and PIK3CA mutations in Erdheim-Chester disease. Blood. 2014;124:3016–9.
22. Moreau S, Saiag P, Aegerter P, Bosset D, Longvert C, Hélias-Rodzewicz Z, et al. Prognostic value of BRAFV600 mutations inmelanoma patients after resection of metastatic lymph nodes. Ann SurgOncol. 2012;19:4314–21.
23. Marin C, Beauchet A, Capper D, Zimmermann U, Julié C, Ilie M, et al. Detection of BRAF p.V600E Mutations in Melanoma by Immunohistochemistry Has a Good Interobserver Reproducibility. Arch Pathol Lab Med. 2014;138:71–5.
24. Kim MH, Bae JS, Lim DJ, Lee H, Jeon SR, Park GS, et al. Quantification of BRAF V600E alleles predicts papillary thyroid cancer progression. Endocr Relat Cancer. 2014;21:891–902.
25. Spittle C, Ward MR, Nathanson KL, Gimotty PA, Rappaport E, Brose MS, et al. Application of a BRAF pyrosequencing assay for mutation detection and copy number analysis in malignant melanoma. J Mol Diagn. 2007;9:464–71.
26. Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. Nature. 2010;464:427–30.
27. Søndergaard JN, Nazarian R, Wang Q, Guo D, Hsueh T, Mok S, et al. Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032. J Transl Med. 2010;8:39.
28. Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, Ng E, Shapiro RL, Berman RS, et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E))mutations in primary and metastatic melanoma. PLoS One. 2012;7:e29336.
29. Wilmott JS, Menzies AM, Haydu LE, Capper D, Preusser M, Zhang YE, et al. BRAF(V600E) protein expression and outcome from BRAF inhibitor treatment in BRAF(V600E) metastatic melanoma. Br J Cancer. 2013;108:924–31.
30. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. N Engl J Med. 2005;353:2135–47.
31. Greshock J, Nathanson K, Medina A, Ward MR, Herlyn M, Weber BL, et al. Distinct patterns of DNA copy number alterations associate with BRAF mutations in melanomas and melanoma-derived cell lines. Genes Chromosomes Cancer. 2009;48:419–28.
32. Stark M, Hayward N. Genome-wide loss of heterozygosity and copy number analysis in melanoma using high-density single-nucleotide polymorphism arrays. Cancer Res. 2007;67:2632–42.
33. Jönsson G, Dahl C, Staaf J, Sandberg T, Bendahl PO, Ringnér M, et al. Genomic profiling of malignant melanoma using tiling-resolution arrayCGH. Oncogene. 2007;26:4738–48.
34. Gast A, Scherer D, Chen B, Bloethner S, Melchert S, Sucker A, et al. Somatic alterations in the melanoma genome: a high-resolution array-based comparative genomic hybridization study. Genes Chromosomes Cancer. 2010;49:733–45.
35. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. J Natl Cancer Inst. 2003;95:1878–90.
36. Long GV, Wilmott JS, Capper D, Preusser M, Zhang YE, Thompson JF, et al. Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for the detection of V600E BRAF mutation in melanoma. Am J Surg Pathol. 2013;37:61–5.
37. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. Nat Genet. 2003;33:19–20.
38. Bauer J, Bastian BC. Distinguishing melanocytic nevi from melanoma by DNA copy number changes: comparative genomic hybridization as a research and diagnostic tool. Dermatol Ther. 2006;19:40–9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

1.2 La charge allélique de *BRAF* V600E, biomarqueur prédictif de la réponse aux inhibiteurs de BRAF ? (Données non publiées)

Nous avons souhaité étudier si la charge allélique de *BRAF* V600E, dont nous avons montré qu'elle était augmentée dans presque 20% des cas, pouvait être un biomarqueur prédictif de la réponse aux inhibiteurs de BRAF en monothérapie.

Pour cela, nous avons réalisé dans le cadre d'un travail collaboratif avec le Dr Amélie Boespflug de l'équipe du Pr Luc Thomas et du Pr Stéphane Dalle de l'Université Lyon-Sud (Service de Dermatologie, Hospices Civils de Lyon ; Centre de recherche contre le cancer, UMR, Inserm 1052 CNRS 52856) des expériences *in vitro* sur des lignées cellulaires de mélanome et sur des échantillons tumoraux provenant de métastases de mélanome de patients avant tout traitement par inhibiteur de BRAF, ainsi que des analyses des données de ces lignées obtenues à partir du CCLE (*Cancer Cell Line Encyclopedia*) et des données sur des échantillons humains tumoraux obtenues à partir du TCGA. Enfin, nous avons réalisé une étude clinique rétrospective chez les patients atteints de mélanomes métastatiques mutés *BRAF* V600E traités dans les deux centres (Hôpital Ambroise Paré et Hospices de Lyon) par inhibiteur de BRAF en monothérapie (vemurafenib ou dabrafenib).

Méthodes

Méthodes des expériences *in vitro.*

Pour les expériences d'IC50 réalisées par l'équipe de Lyon (Dr Amélie Boespflug), les lignées A375, SKMEL5, RMPI 7951, SKMEL28, WM115, MALME3M, WM793, M4BE, G361, SKMEL24, WM9, 501mel et SKMEL3 ont été obtenues de l'ATCC (*American Type Culture Collection*). Toutes ces lignées ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) glutamax avec 10% de sérum de veau fœtal, avec 1% d'antibiotique (pénicilline et streptomycine), à 37°C avec 5% de CO_2. La CAM de *BRAF* V600E pour ces lignées a été obtenue par NGS. Pour les tests d'IC50 au vemurafenib : toutes les lignées ont été ensemencées dans des plaques 96 puits avec 3000 cellules/puits. La molécule PLX4032 (vemurafenib) a été achetée chez Genentech® San Francisco USA. Un test ATP a été réalisé

72 heures après traitement par vemurafenib en utilisant le CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. L'IC50 a été calculée en utilisant le logiciel Compusyn®. Chacune de ces expériences a été réalisée au moins deux fois, sauf pour les lignées WM115 et 501mel où l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois.

Pour les expériences d'immunoempreinte, les lignées A375, SKMEL5, MALME3M, SKMEL24 ont été fournies par l'équipe de Lyon et ont été mises en culture dans les mêmes conditions. Les lignées 888MEL et SKMEL3 ont été fournies par Valérie Petit de l'équipe du Docteur Lionel Larue (CNRS UMR3347, INSERM U1021, Institut Curie, Orsay, France) qui avaient été initialement obtenues auprès du Dr Florence Faure (Institut Curie) pour la lignée 888MEL et auprès du Dr CR Codin (Ludwig Institute, Oxford, UK) pour la lignée SKMEL3. La lignée 888MEL a été cultivée dans les mêmes conditions que celles décrites pour les autres lignées ci-dessus. La lignée SKMEL3 a été cultivée dans du RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium* ; RMPI 1640 de GIBCO®) avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 1% de L-Glutamate et avec 1% d'antibiotique (pénicilline et streptomycine) à 37°C avec 5% de CO_2.

Lorsque les cellules étaient à une confluence de 70%, elles étaient traitées par de la trypsine 1X, centrifugées à 1300 tours/min pendant 7 minutes, puis après un lavage dans 50mL de tampon phosphate salin (PBS) et une nouvelle centrifugation identique, un culot cellulaire était obtenu pour réaliser soit une procédure d'extraction d'ADN, soit une procédure d'extraction protéique. Pour la procédure d'extraction d'ADN, le culot cellulaire était resuspendu dans une solution tampon d'ATL (Quiamgen®) de 180 µL, conservée à -20°C, et qui servait ensuite pour les analyses de pyroséquençage (techniques d'extraction d'ADN et de pyroséquençage décrites dans l'article Hélias-Rodzewitz, *BMC Cancer* 2015). Pour la procédure d'extraction protéique, le culot cellulaire était resuspendu dans 800 µL d'une solution tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases, et laissé incubé 30 minutes dans la glace, avant d'être centrifugé à 13 000 tours/min pendant 20 minutes, puis le surnageant était récupéré et conservé à -80°C. Les volumes d'ATL et de tampon de lyse pouvaient être doublés en cas d'un volumineux culot globulaire (souvent obtenu avec des flasques T175, à 70% de confluence).

Les échantillons humains de mélanomes sélectionnés étaient issus du Centre de Ressources Biologiques d'Ambroise Paré (certifié NF96900), provenant de patients suivis dans le service

de dermatologie de l'hôpital Ambroise Paré pour lesquels nous avions les données cliniques. Il s'agissait d'échantillons congelés provenant de prélèvements biopsiques (ou chirurgicaux) de métastases de mélanomes et pour lesquels des échantillons synchrones avaient été inclus en paraffine, et dont le résultat de l'analyse de biologie moléculaire par pyroséquençage pour la recherche de la mutation de *BRAF* V600E (et de la quantification de la CAM de *BRAF* V600E) était connu. Chacun des échantillons congelés sélectionnés a été coupé au cryostat, pour l'extraction de l'ADN (10 coupes de 20 µm, conservées dans de l'ATL (Quiagen®) à -20°C), pour l'extraction des protéines (10 coupes de 20 µm, conservées dans une solution tampon avec des inhibiteurs de protéases et de phosphatases à -80°C), et pour un contrôle histologique sur lame colorée à l'hématéine-éosine (5 coupes de 4 µM) pour vérifier la présence de tumeur et pour l'évaluation du pourcentage de cellules tumorales dans chaque échantillon. Seuls les échantillons avec un pourcentage de cellules tumorales > 70% étaient retenus pour les analyses.

Les coupes d'échantillons tumoraux dans le tampon de lyse ont été broyées mécaniquement (mixer Mill MM 300, Retsch) pendant 3 minutes à la fréquence de 30 rotations par seconde puis, après 30 minutes d'incubation dans la glace et après une centrifugation à 13 000 rotations par minute pendant 20 minutes à +4°C, le surnageant était récupéré et conservé à -80°C.

Le tampon de lyse était constitué d'une solution d'inhibiteurs de protéases (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific®, Waltham, Massachussetts, USA) à 1X, d'une solution d'inhibiteur de phosphatases (Phosphatase Inhibitor Cocktail, Cell Signaling® Technology, Danvers, Massachussetts, USA) à 1X, avec de l'EDTA à 50mM à 10X, et d'un tampon Tissue-*PE* LB™ Buffer pour les échantillons humains, et Mammalian Cell-PE LB™ Buffer pour les lignées cellulaires, de G-Biosciences® (St Louis, Missouri, USA).

Pour l'étape de dénaturation des protéines, après avoir mesuré les concentrations protéiques par la méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay ; micro BCA™ protein assay kit, Pierce, Biotechnology, Rockford, USA), 20 µg d'extraits protéiques étaient mélangés dans du tampon Laemmli 5X avec 5% de β-mercapto-ethanol et chauffés 5 min dans de l'eau à 100°C. Ainsi, 20µL de ces échantillons dénaturés étaient déposés sur un gel de polyacrylamide 10% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis) pour la migration

électrophorétique à voltage constant de 140 V pendant environ 1 heure, en présence de tampon de migration (Tris/Glycine/SDS 10X (Biorad®, Hercules, Californie, USA) dans 900 mL d'eau pure) puis transférés par électrophorèse (à 300 V, 900 mA et 300 watts pendant 1 heure) sur des membranes de nitrocellulose en présence de tampon de transfert (Tris/Glycine 10X Buffer, Biorad®, Hercules, Californie, USA) dans 4.2 litres d'eau pure et 1.2L d'éthanol. Le transfert sur les membranes était bloqué par du T-PBS (Dulbecco's-Phosphate Buffered Saline 10X + 0.05% Tween-20) avec 5% de lait écrémé reconstitué pour les protéines non phosphorylées ou avec du BSA (*Bovine Serum Albumine*) 5% pour les protéines phosphorylées, puis les membranes étaient incubées toute une nuit à 4°C avec les anticorps primaires. Les anticorps primaires utilisés étaient P-MEK ½ (Ser 217/221) (41G9) Rabbit mAb #9154, MEK ½ #9122 Rabbit, DUSP4/MKP2 (D9A5) Rabbit mAb #5149, MET (D1C2) XP® Rabbit mAb #8198, PTEN (138G6) #9559 Rabbit IgG, P-AKT (Ser 473) #9271, Rabbit, AKT #9272 Rabbit de chez Cell Signaling Technology® (Danvers, Massachussetts, USA), les anticorps NF1, Neurofibromin (D): sc-67 #Co513, Rabbit polyclonal IgG, et Cycline D1 (A-12), sc-8396, mouse monoclonal IgG2b de chez Santa Cruz Biotechnology® (Dallas, Texas, USA) et l'anticorps anti-β-actine, Sigma-Aldrich® (Saint-Louis, Missouri, USA). Puis, après 3 lavages au T-PBS, les membranes étaient incubées avec un anticorps secondaire de lapin ou de souris couplé à la horseradish peroxidase (anti-rabbit IgG, ThermoFisher Scientific®, #31460, Waltham, Massachussetts, USA; anti-mouse IgG, ThermoFisher Scientific, #31430, Waltham, Massachussetts, USA) pendant 2 heures à température ambiante. La révélation des membranes se faisait grâce à un kit de détection ECL (GE Healthcare, Amersham Biosciences®), puis les bandes d'intérêt étaient détectées par chimioluminescence (analyseur LAS-3000, Fujifilm®, Tokyo, Japan). Les résultats étaient analysés *via* le logiciel Multigauge (version 2.02) du LAS-3000.

Compte-tenu de la rareté des échantillons congelés répondant à l'ensemble des critères (données cliniques disponibles pour vérifier l'absence de thérapies ciblées reçues avant la réalisation du prélèvement, présence de tumeur, pourcentage de cellules tumorales > 70% et peu de nécrose tumorale), les protocoles d'immunoempreinte n'ont été réalisés qu'une seule fois par échantillon.

La méthode de pyroséquençage à partir de l'ADN issu des lignées et des échantillons étaient identiques et a déjà été décrite dans l'article Hélias-Rodzewicz *et al.*, *BMC Cancer*, 2015, de même que le protocole de FISH.

Pour les tests statistiques : la comparaison des moyennes des IC50 a utilisé un test non paramétrique de Mann et Whitney bilatéral, la représentation graphique (*Heat map*) de l'analyse de regroupements (*clusters*) non supervisée a été réalisée avec le logiciel R (software 3.0.2, 2013) (R Development Core Team. R: A Language Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL: http: //www.R-project.org 2013.), les données issues du TCGA ont été analysées par une corrélation de Pearson. Les tests statistiques ont été considérés comme significatifs quand les valeurs *p* étaient inférieures à 5%.

Méthodes de l'étude clinique.

Nous avons colligé en octobre 2015, rétrospectivement, les données cliniques des patients consécutifs traités dans les deux centres par vemurafenib ou par dabrafenib en monothérapie. Les éléments recueillis étaient les caractéristiques cliniques des patients, les caractéristiques anatomo-cliniques du mélanome primitif (siège, type histologique, Breslow, ulcération, index mitotique), le stade AJCC au premier jour de traitement par inhibiteur de BRAF (et la présence ou non de métastases cérébrales), les lignes de traitement antérieur reçues, les données sur les échantillons utilisés pour réaliser les techniques de biologie moléculaire (type de prélèvement : mélanome primitif ou métastase, pourcentage de cellules tumorales, technique utilisée : Sanger ou pyroséquençage, type de la mutation de *BRAF*), et les éléments de suivi (évaluation de la réponse par examens d'imagerie, selon les critères RECIST 1.1 (376)).

Pour chaque patient, un prélèvement d'un échantillon tumoral avait permis, avant la mise sous traitement par inhibiteur de BRAF, de réaliser la recherche du statut mutationnel de *BRAF* (par Sanger pour le centre de Lyon, par Sanger et/ou pyroséquençage pour notre centre). Pour les patients ayant plusieurs échantillons tumoraux disponibles, le choix s'est porté sur les échantillons ayant le plus fort pourcentage de cellules tumorales et/ou sur les prélèvements réalisés dans le délai le plus court avant la mise sous traitement.

Les patients étaient exclus de l'étude s'ils avaient un mélanome porteur d'une autre mutation de *BRAF* que V600E, avaient reçu un traitement par inhibiteur de MEK en association à l'inhibiteur de BRAF, ou n'avaient pas reçu le traitement assez longtemps pour avoir au moins un suivi jusqu'à la première évaluation par imagerie.

Les critères principaux de cette étude étaient la survie sans récidive et la survie globale. Pour les deux critères, la date d'origine était la mise sous traitement par inhibiteur de BRAF. La date de fin était la date de décès, ou de progression, pour les individus présentant un événement, et la date des dernières nouvelles pour les patients ne présentant pas d'évènement. Ces derniers étaient donc censurés à la date des dernières nouvelles. Le délai de suivi a été calculé entre la date des dernières nouvelles et le premier jour de traitement par inhibiteur de BRAF. Les survies sans récidive et les survies globales ont été estimées et décrites par la méthode de Kaplan-Meier.

Les tests ont été considérés comme significatifs quand les valeurs *p* étaient inférieures à 5%. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel R (software 3.0.2, 2013) (R Development Core Team. R: A Language Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL: http: //www.R-project.org 2013). Les tests statistiques utilisés pour les données du tableau 1 sont spécifiés dans le tableau ; un test du logrank a été utilisé pour l'analyse statistique des courbes de survies.

1.2.1 Impact du déséquilibre allélique de *BRAF* V600E sur l'activation et la régulation de la voie MAPK : P-MEK/MEK et DUSP4

Nous avons étudié l'expression des protéines de la voie MAPK par immunoempreinte dans des lignées cellulaires de mélanomes humains mutés *BRAF* V600E qui avaient des CAM de *BRAF* V600E différentes et dans des échantillons de mélanome provenant de patients n'ayant pas reçu de traitement par inhibiteurs de la voie MAPK (Figure 11).

Sur les lignées, aucune différence n'a pu être mise en évidence : phospho-MEK, qui témoigne de l'activation de la voie MAPK, ainsi que DUSP4 qui témoigne d'un rétrocontrôle négatif actif, et qui est donc un signe indirect d'activation de la voie, sont toutes deux des

protéines fortement exprimées dans toutes les lignées, quel que soit le pourcentage d'allèles mutés *BRAF* V600E (Figure 11-A).

Sur les échantillons humains en revanche, les expressions les plus fortes à la fois de phospho-MEK et de DUSP4 étaient seulement observées dans les échantillons avec une CAM de *BRAF* V600E > 60% ; cependant, une faible expression de ces deux protéines était également observée dans certains prélèvements ayant une CAM élevée (> 60%), avec des niveaux d'expression similaires à ceux observés dans les prélèvements avec une CAM faible (≤ 30%) (Figure 11-B).

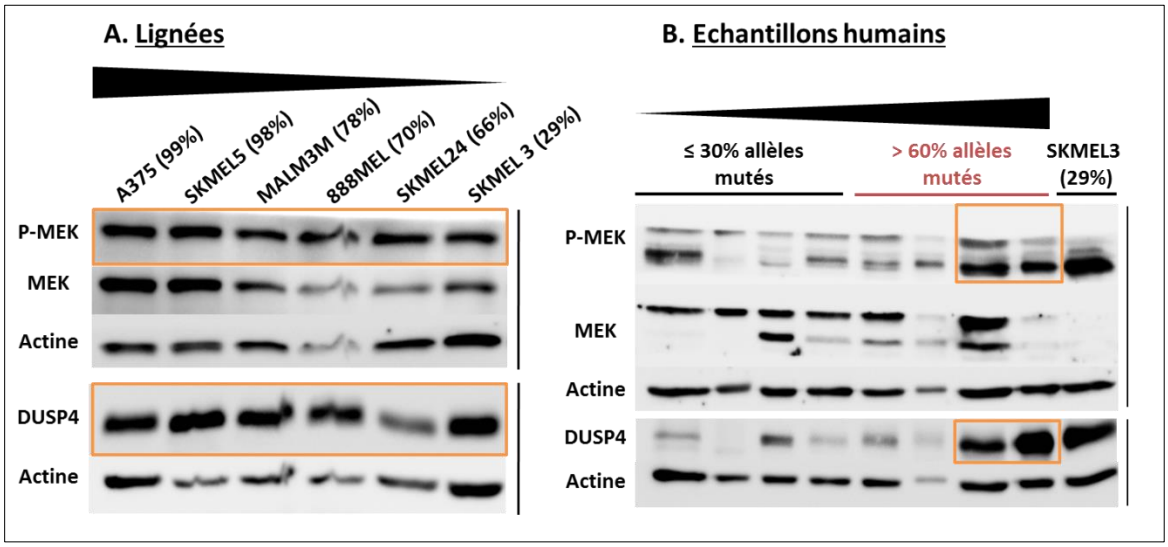


Figure 11. Immunoempreinte reflétant l'activité de la voie MAPK dans les lignées cellulaires de mélanome (A) et dans les échantillons humains de mélanome (B) mutés *BRAF* V600E en fonction de leur CAM de *BRAF* V600E (%).
Les CAM (ou pourcentage (%) d'allèles mutés) ont été déterminées par pyroséquençage. Lorsque la voie MAPK est activée, la protéine phospho-MEK (P-MEK) est fortement exprimée, de même que DUSP4 qui intervient dans le rétrocontrôle de la voie.

1.2.2 Impact du déséquilibre allélique de *BRAF* V600E sur l'expression des protéines impliquées dans la résistance primaire aux inhibiteurs de BRAF

Nous avons examiné par immunoempreinte sur les mêmes lignées cellulaires de mélanomes mutées *BRAF* V600E et sur les mêmes échantillons tumoraux de patients naïfs de toutes thérapies ciblées, l'expression de protéines impliquées dans les mécanismes de résistances primaires aux inhibiteurs de BRAF, tels que la diminution ou la perte d'expression de produits des gènes suppresseurs de tumeur *NF1* et *PTEN*, une activation de la voie PI3K/AKT, une surexpression de la protéine MET ou encore un surexpression de cycline D1 (Figure 12).

Les lignées cellulaires de mélanomes sont constituées de 100% de cellules tumorales, d'une (voire deux) population(s) a priori homogène(s), constituée(s) de cellules ayant le même nombre de chromosomes (ploïdie) et le même pourcentage d'allèles mutés *BRAF* V600E. C'est pourquoi, dans les études les lignées cellulaires de mélanomes mutées *BRAF* sont appelées « homozygotes » lorsqu'elles ont une CAM proches de 100%. De la même façon, les lignées cellulaires BRAF sauvage sont constituées d'une charge allélique de *BRAF* sauvage proche de 100%. Enfin, les lignées cellulaires de mélanomes ayant une CAM de *BRAF* V600E positive mais inférieure à 100% sont donc appelées « hétérozygotes ».

Sur les lignées homozygotes A375 (CAM *BRAF* V600E 99%) et SKMEL5 (CAM *BRAF* V600E 98%), nous observions à la fois une faible expression de NF1 (mais pas de perte complète d'expression), une faible expression de cycline D1, de MET, et de phospho-AKT (sans perte de PTEN associée). Ces résultats étaient donc en faveur de l'absence de ces mécanismes de résistances primaires dans ces deux lignées. En revanche, parmi les lignées hétérozygotes, une forte expression de cycline D1 était observée dans les lignées MALM3M et 888MEL (avec une CAM *BRAF* V600E de 78% et 70% respectivement en pyroséquençage) ; une forte expression de MET dans les lignées 888MEL, SKMEL24 et SKMEL3 (avec une CAM *BRAF* V600E de 70%, 66% et 29% respectivement) ; et une perte de PTEN était observée dans la lignée SKMEL24, associée à une expression modérée de phospho-AKT (Figure 12-A).

Sur les échantillons humains, aucun des mécanismes de résistance explorés ne prédominait dans les différents sous-groupes avec CAM faible (≤ 30% d'allèles *BRAF* V600E) ou une CAM élevée (> 60%) (Figure 12-B).

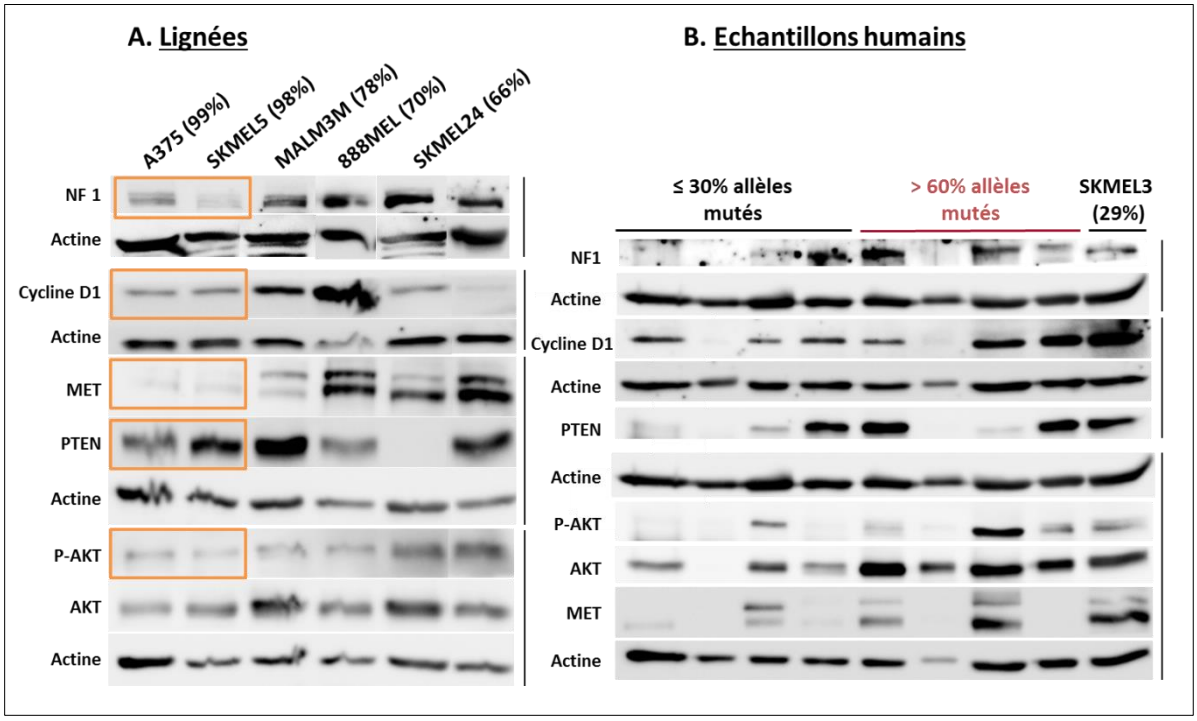


Figure 12. Immunoempreinte de principales protéines intervenant dans les mécanismes de résistances primaires aux inhibiteurs de BRAF dans les lignées cellulaires de mélanomes (A) et dans les échantillons humains (B) en fonction de leur CAM de *BRAF* V600E.
Les CAM de BRAF V600E (ou pourcentage (%) d'allèles mutés) ont été déterminées par pyroséquençage. Une perte d'expression de NF1, une surexpression de MET, une perte ou une diminution de l'expression de PTEN +/- une activation de la voie PI3K/AKT ou encore une surexpression de cycline D1, sont des mécanismes de résistances primaires aux inhibiteurs de BRAF. Lorsque la voie PI3K/AKT est activée, la protéine phospho-AKT (P-AKT) est fortement exprimée.

Ces données préliminaires (Figure 11 et Figure 12) nous indiquent, bien que les échantillons tumoraux soient très hétérogènes (ce qui était attendu), qu'une très forte activation de la voie MAPK n'a été observée que dans les échantillons avec une CAM de *BRAF* V600E élevée, suggérant alors que certains échantillons tumoraux appelés « homozygotes », définis par une CAM > 60%, puissent avoir une plus forte activation de la voie MAPK, témoignant peut-être d'une addiction oncogénique importante. Ce phénomène n'a cependant pas été retrouvé dans les lignées.

De plus, plusieurs mécanismes de résistance primaire semblent présents dans un même échantillon tumoral, tel que cela l'a déjà été rapporté dans la littérature ; la survenue de ces mécanismes semble indépendante de la CAM de *BRAF* V600E, dans la limite du faible nombre d'échantillons étudiés.

On notera que les deux échantillons avec une CAM de *BRAF* V600E > 60% ayant une forte activation de la voie MAPK n'avaient pas de perte de NF1, pouvant expliquer l'hyper-activation de la voie ; l'un des deux échantillons avait une expression de MET pouvant être à l'origine de la surexpression de phospho-MEK.

1.2.3 Evaluation de la sensibilité au vemurafenib des lignées selon leur statut homozygote *versus* hétérozygote

Après avoir déterminé par NGS le statut homozygote et hétérozygote de 13 lignées cellulaires de mélanomes humains, nous avons mesuré l'IC50 du vemurafenib de 5 lignées homozygotes et de 8 lignées hétérozygotes. Nous avons tout d'abord observé que toutes les lignées homozygotes étaient sensibles au vemurafenib (IC50 basses), alors que certaines lignées « hétérozygotes » étaient résistantes (Figure 13).

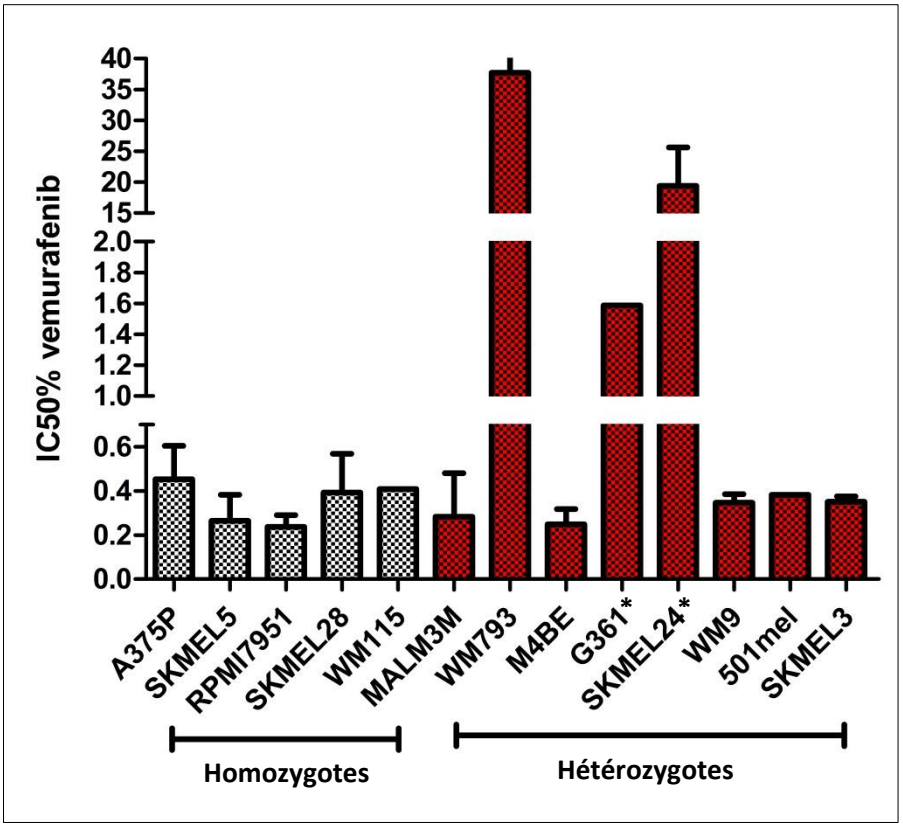


Figure 13. Sensibilité au vemurafenib des lignées cellulaires de mélanomes mutées BRAF V600E, selon leur statut homozygote ou hétérozygote.
*La sensibilité est estimée par l'IC50, soit la concentration nécessaire de vemurafenib pour inhiber 50% des cellules en culture, après 72 heures de traitement. Le graphique représente la moyenne d'au moins deux expériences sauf pour WM115 et 501mel, où une seule expérience a été réalisée (les barres verticales représentent les écart-types). Les lignées avec une perte de PTEN sont marquées par * (Figure d'Amélie Boespflug).*

Parmi ces lignées, 4 lignées ont eu des analyses par FISH qui ont révélé que les lignées A375 et SKMEL5, toutes deux homozygotes et sensibles au vemurafenib, étaient triploïdes sans gain du nombre de copies du gène *BRAF*, et que les lignées hétérozygotes SKMEL24 et MALM3M étaient tri- et tétraploïdes avec un gain du nombre de copies du gène *BRAF* (entre 6 et 9 copies) (données non montrées). Toutefois, l'une de ces lignées hétérozygotes était sensible au vemurafenib (MALM3M) mais pas l'autre.

Cette différence de sensibilité selon le statut homozygote ou hétérozygote, pourtant recherchée sur 5 lignées homozygotes et sur 8 lignées hétérozygotes, n'était cependant pas significative statistiquement : l'IC50 moyenne du vemurafenib des lignées hétérozygotes était de 0,35µM *versus* 8,56 µM pour les lignées homozygotes (p = 0,62) (Figure 14). De plus, parmi les lignées hétérozygotes, deux étaient connues pour avoir une mutation de *PTEN* entrainant une perte d'expression de PTEN, qui est un mécanisme de résistance primaire au vemurafenib connu. Si l'on retirait ces deux lignées du calcul, l'IC50 moyenne du vemurafenib des lignées hétérozygotes diminuait à 6,75µM.

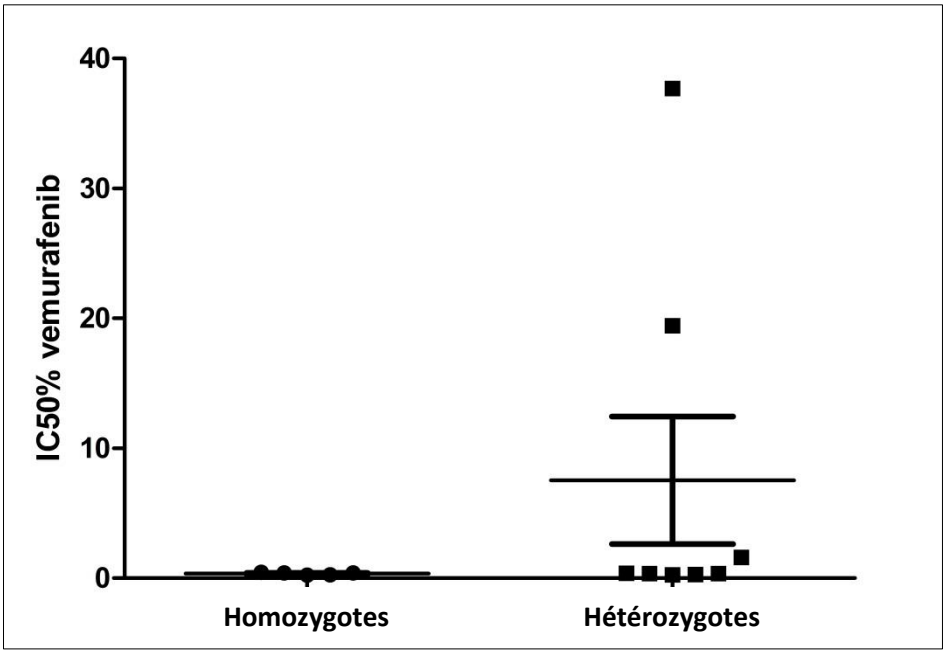


Figure 14. Graphique représentant les IC50 moyennes du vemurafenib des différentes lignées cellulaires de mélanomes en fonction du statut homozygote ou hétérozygote de la mutation *BRAF* V600E.
Chaque point représente l'IC50 moyenne pour une lignée ; les moyennes des IC50 des lignées homozygotes et hétérozygotes sont représentées par une barre horizontale, les barres verticales représentent les écart-types.

Ce résultat était en accord avec des résultats antérieurs publiés ayant montré que les lignées cellulaires de mélanomes mutées *BRAF* V600E homozygotes étaient modérément plus sensibles au vemurafenib que les lignées hétérozygotes avec des résultats significatifs dans deux études (370, 377) et une tendance pour une autre étude (p = 0,16) (369).

Afin de savoir si les lignées hétérozygotes avaient un taux mutationnel global plus important que les lignées homozygotes, ce qui pourrait expliquer une partie de l'hétérogénéité des sensibilités au vemurafenib observée, nous avons étudié les données de profils mutationnels de 10 lignées cellulaires de mélanomes disponibles dans le CCLE (*Cancer Cell Line Encyclopedia*) (5 lignées homozygotes et 5 lignées hétérozygotes). Nous avons réalisé une analyse de regroupements (*clusters*) non supervisée sur l'ensemble des mutations présentes dans ces lignées en fonction de leur statut homozygote ou hétérozygote. Aucun regroupement (*cluster*) n'a pu être mis en évidence en fonction du statut homozygote ou hétérozygote (Figure 15).

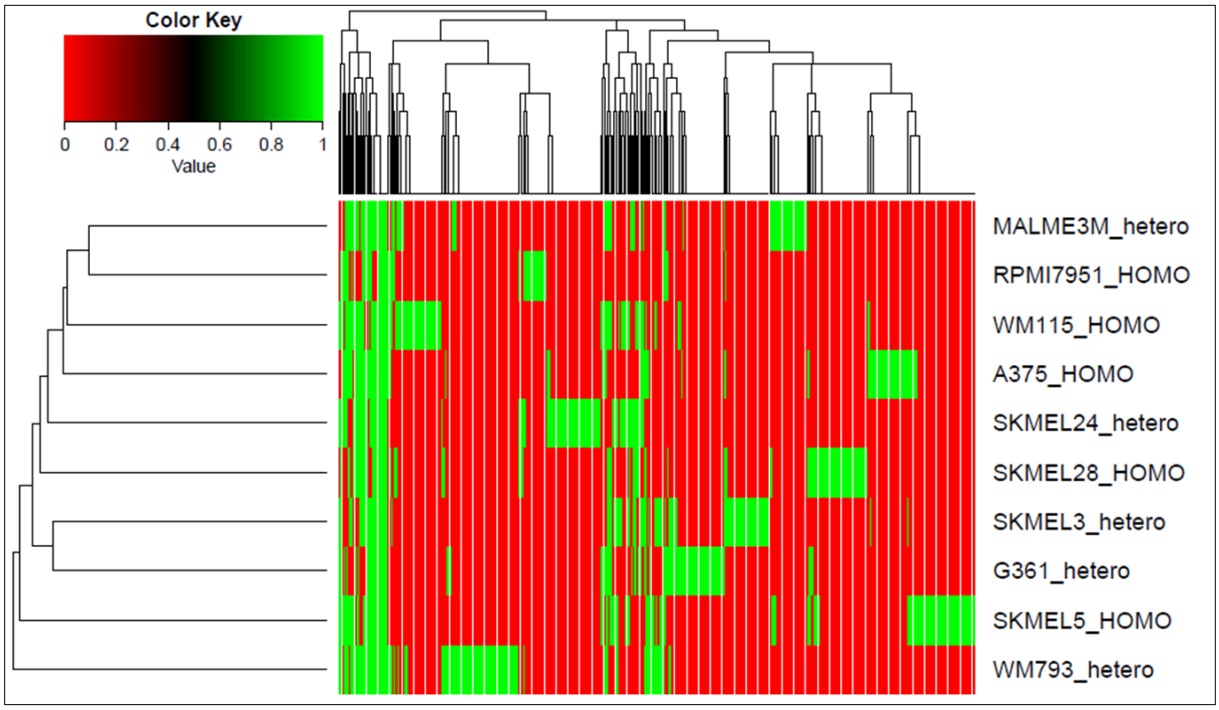


Figure 15. Représentation graphique (*Heat map*) d'une analyse de regroupements (*clusters*) non supervisée de la présence ou non de mutation des différents gènes mutés dans 10 lignées cellulaires de mélanomes, d'après les données du CCLE, selon le statut homozygote (HOMO) ou hétérozygote (hetero).

En vert, le gène est muté, en rouge, il n'est pas muté. La liste des mutations et des délétions de 1651 gènes a été déterminée par séquençage parallèle ciblé via un processus de capture hybride (Hybrid capture sequencing) (Figure d'Amélie Boespflug).

Puis nous avons souhaité étudier si l'on retrouvait des résultats similaires au sein d'échantillons de mélanome humains. Nous avons pour cela étudié les données provenant du TCGA.

Dans un premier temps, nous avons appliqué une méthode publiée récemment qui permet de déterminer une estimation statistique du pourcentage de pureté tumorale (378). En effet, les échantillons avec une faible cellularité peuvent avoir un CAM faible de manière artéfactuelle en raison de la présence de cellules non tumorales non mutées, et fausser ainsi les résultats.

A partir des données du TCGA provenant de 470 échantillons de mélanome mutés *BRAF*, nous avons regardé la distribution de la CAM de *BRAF* en fonction de la pureté tumorale calculée selon cette méthode ; on a choisi d'analyser exclusivement les données des échantillons ayant une pureté (ou cellularité) tumorale de plus de 65% (Figure 16).

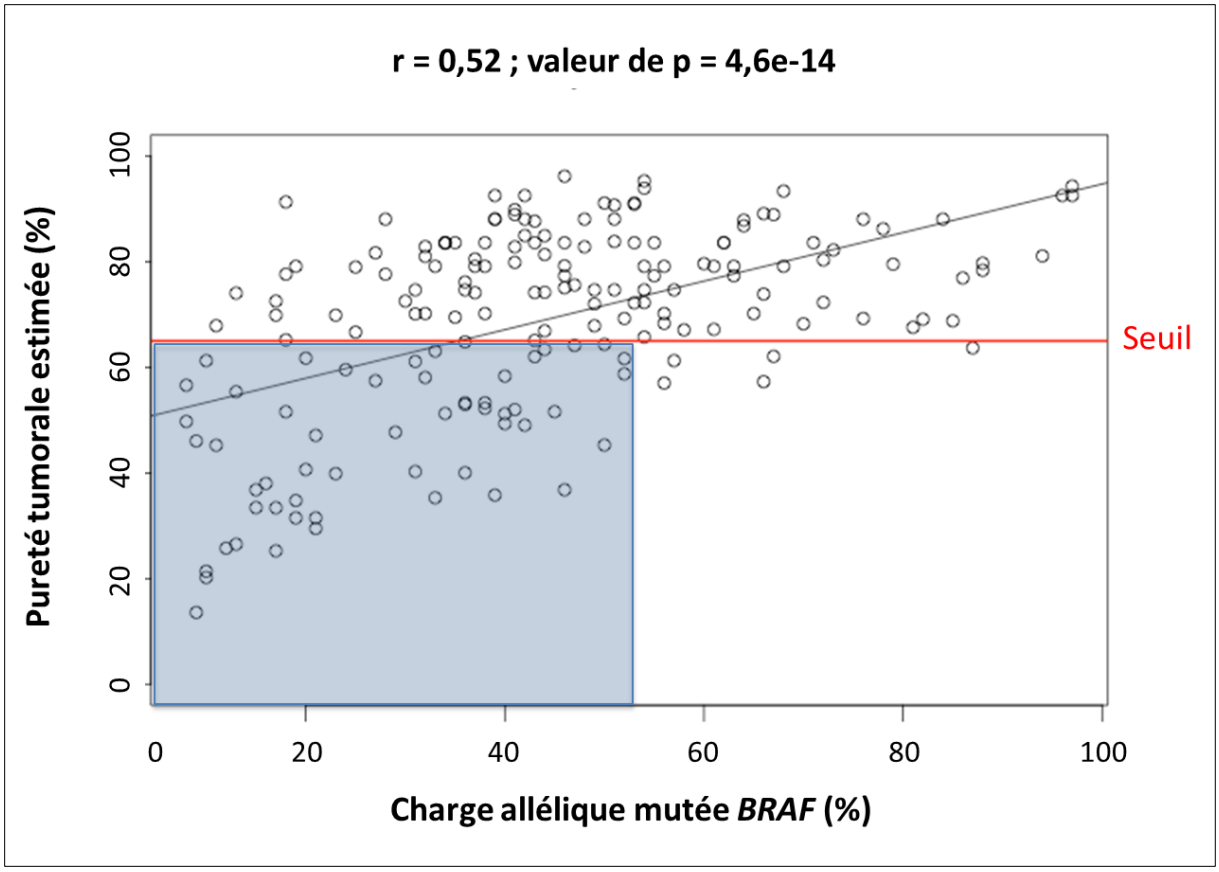


Figure 16. Graphique représentant la pureté tumorale estimée selon la méthode d'Aran *et al.* (2015) en fonction de la CAM de *BRAF* des échantillons mutés *BRAF* du TCGA (n = 470).
La valeur seuil retenue est celle de 65% (trait horizontal rouge), la zone bleue correspond aux échantillons dont la CAM est basse probablement en raison d'une faible cellularité tumorale.

Parmi les échantillons tumoraux mutés *BRAF* avec plus de 65% de cellules tumorales, l'analyse a été restreinte aux échantillons porteurs d'une mutation *BRAF* V600 (n = 102). Un nombre plus importants d'altérations génétiques a été pris en compte dans le TCGA par rapport aux données du CCLE, en raison probablement de l'utilisation d'une technique de NGS plus précise et plus sensible. Aucune corrélation entre le taux mutationnel global et la CAM de *BRAF* n'a été mise en évidence (coefficient de corrélation de Pearson de 0,04) (Figure 17).

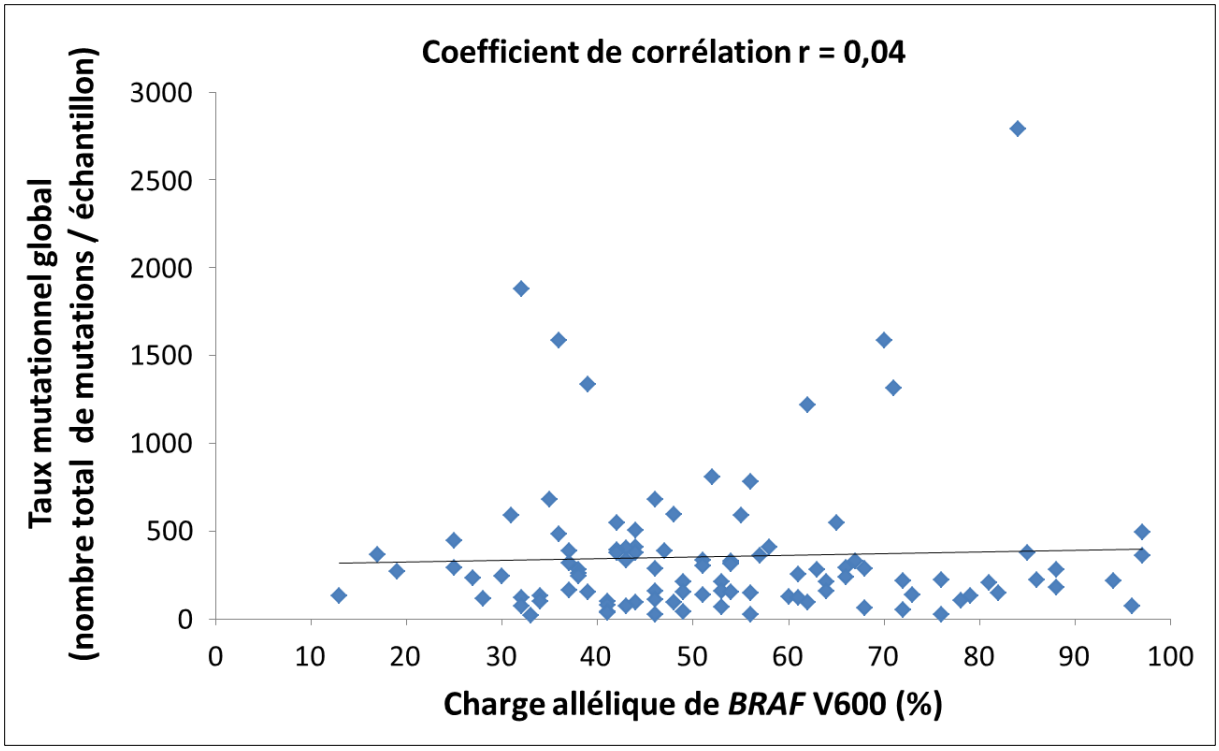


Figure 17. Graphique représentant le taux mutationnel global en fonction de la charge allélique de *BRAF* V600 de chaque échantillon tumoral de mélanome (n = 102), préalablement sélectionné pour avoir une pureté tumorale > 65%.
On note ici l'absence totale de corrélation.

Notre deuxième hypothèse était alors que la meilleure sensibilité au vemurafenib des lignées homozygotes pouvait s'expliquer par l'absence dans ces lignées de mutations associées connues pour conférer un mécanisme de résistance primaire aux inhibiteurs de BRAF, ou à l'inverse par la présence de mutations empêchant la survenue de mécanismes de résistance adaptative, comme cela l'a été suggéré par Capaldo *et al.* avec des mutations de gènes codants pour des RTK, tels que EGFR, ne pouvant alors plus être activés et participer au développement de mécanismes de résistance adaptative des RTK (377). Pour vérifier cette hypothèse, une analyse supervisée ciblée sur les gènes de résistance primaire aux inhibiteurs de BRAF afin de mettre en évidence des regroupements (*clusters*) selon le statut hétérozygote et homozygote est en cours.

1.2.4 Etude rétrospective de données cliniques de patients traités en monothérapie par vemurafenib ou dabrafenib

Toujours dans le même but d'étayer notre hypothèse de la valeur prédictive potentielle de la CAM supérieure à 60% sur la réponse aux inhibiteurs de BRAF en monothérapie, nous avons réalisé une étude rétrospective des patients suivis dans les services de Dermatologie de l'hôpital Ambroise Paré et des Hospices de Lyon (collaboration avec la même équipe de l'université de Lyon-Sud), traités en monothérapie par inhibiteurs de BRAF (veramurafenib ou dabrafenib) pour un mélanome métastatique stade IIIC non résécable ou stade IV porteur de la mutation V600E, quelle que soit la ligne de traitement.

Les méthodes de cette étude clinique ont été détaillées en début de chapitre.

Un total de 123 patients porteurs d'un mélanome métastatique muté *BRAF* V600E consécutifs traités entre mai 2010 et juin 2014 dans les deux centres ayant eu au moins une première évaluation à 2 ou 3 mois après le début du traitement a été inclus dans cette étude. Parmi ces patients, 12 patients (9,8%) avaient reçu un traitement par vemurafenib, 96 (78%) un traitement par dabrafenib et 15 patients (12,2%) avaient reçu l'un puis l'autre ; 42 patients (34,1%) provenaient de l'hôpital Ambroise Paré.

Les cas de mélanomes porteurs d'autres mutations *BRAF* V600 que V600E, bien que pouvant être traités par inhibiteur de BRAF, n'étaient pas inclus dans l'étude en raison de l'absence de mise au point fiable de la technique de quantification de la CAM pour ces mutations par pyroséquençage.

Un seul échantillon tumoral correspondait à un seul patient, parmi l'ensemble des échantillons tumoraux analysés en biologie moléculaire, 83,7% (n = 103/123) provenaient d'une métastase, et 16,3% (n = 20/123) du mélanome primitif. Seuls les échantillons provenant de l'hôpital Ambroise Paré avaient eu une estimation du pourcentage de cellules tumorales (sur lame colorée hématéine-éosine), la cellularité tumorale moyenne était de 82,1% (± 9,1%). Pour les échantillons provenant des Hospices de Lyon, leur technique de microdissection assurait des échantillons avec une cellularité tumorale supérieure à 70%.

Les techniques de séquençage pour rechercher le statut *BRAF* V600E étaient la technique de Sanger aux Hospices de Lyon et la technique de pyroséquençage à l'hôpital Ambroise Paré. Parmi les 81 patients provenant des Hospices de Lyon, de l'ADN extrait de 36 échantillons tumoraux (44%) a été envoyé à l'hôpital Ambroise Paré afin de réaliser la technique de pyroséquençage, qui permet une quantification plus précise de la CAM de *BRAF* V600E que la technique de Sanger. Ainsi, au total, parmi les 123 échantillons, 78 (n = 42/42 de l'hôpital Ambroise Paré, et n = 36/81 des Hospices de Lyon) ont été analysés par pyroséquençage afin de quantifier précisément le pourcentage d'allèles mutés *BRAF* V600E.

Les résultats de pyroséquençage retrouvaient un pourcentage d'allèles mutés *BRAF* V600E médian de 45 % [4-96%].

Les caractéristiques cliniques des patients et les caractéristiques histologiques des prélèvements, en fonction d'une CAM de BRAF *V600E* inférieure ou égale ou supérieure à 60%, résumées dans le Tableau 4, étaient similaires dans les 2 groupes ($p > 0,05$). Aucune des caractéristiques cliniques ou histologiques initiales n'était corrélée à une CAM de *BRAF* V600E inférieure ou supérieure à 60%.

Résultats de pyroséquençage *BRAF* V600E	CAM ≤ 60% (n = 59)	CAM > 60% (n = 19)	Valeur *p* (test)	Total (n = 78)
Age moyen au moment du diagnostic, en années (± écart-type)	52,32 (± 16,42)	51,93 (± 12,85)	0,857 (Kruskal-Wallis)	52,22 (± 15,55)
Age médian au moment du diagnostic, en années [bornes]	54,43 [20,69-85,41]	54,31 [24,78-71,86]		54,37 [15,55-85,41]
Sexe				
Homme (%)	34 (57,6%)	13 (68,4%)	0,403 (Chi^2)	47 (60,3%)
Femme (%)	25 (42,4%)	6 (31,6%)		31 (39,7%)
Breslow, en mm				
Moyenne (écart-type)	4,19 (± 4.40)	3,72 (± 2.39)	0,697 (Kruskal-Wallis)	4,08 (± 3,99)
Médiane [bornes]	2,80 [0,30-21,00]	3,45 [1,37 – 5,32]		2,80 [0,30–21,00]
Index mitotique (1/mm2)				
Oui	30 (76,9%)	8 (72,7%)	1 (Fisher)	38 (76 ,0%)
Non	9 (23,1%)	3 (27.3%)		12 (24,0%)
Extension régionale ou à distance opérable*				
Oui	25 (42,4%)	7 (36,8%)	0,670 (Chi^2)	32 (41,0%)
Non	34 (57,6%)	12 (63,2%)		46 (59,0%)
Stade AJCC M1c*				
Oui	44 (74,6%)	13 (68,4%)	0,599 (Chi^2)	57 (73,1%)
Non	15 (25,4%)	6 (31,6%)		
Métastases cérébrales*				
Oui	19 (32,2%)	2 (10,5%)	0,064 (Chi^2)	21 (26,9%)
Non	40 (67,8%)	17 (89,5%)		57 (73,1%)
Délai moyen entre la date du diagnostic et le début du traitement, en mois (± écart-type)	49,55 (± 66,85)	66,85 (± 92,70)	0,688 (Kruskal-Wallis)	53,76 (± 73,70)
Délai moyen entre la date du prélèvement de biologie moléculaire et le début du traitement, en mois (± écart-type)	9,08 (± 9,63)	9,64 (± 11,76)	0,802 (Kruskal-Wallis)	9,19 (± 10,39)

Tableau 4. Caractéristiques anatomo-cliniques des mélanomes primitifs mutés *BRAF* V600E et leur évolution, selon la CAM de *BRAF* V00E (≤ 60% *versus* > 60%).

Les CAM de BRAF V00E ont été obtenues par pyroséquençage sur des échantillons tumoraux dont les prélèvements avaient été réalisés avant la mise sous inhibiteurs de BRAF.

** Paramètres de l'évolution évalués avant la mise sous traitement.*

Les données sont des nombres (pourcentage). Les tests statistiques utilisés sont spécifiés.

La durée médiane de suivi de ces 78 patients était de 14,2 mois [1,7 – 57,0]. Les patients avaient reçu le traitement par vemurafenib ou dabrafenib en 1ère ligne dans 79,5% des cas (n = 62), en 2ème ligne dans 12,8% des cas (n = 10), en 3ème ligne dans 6,4% des cas (n = 5) et en 4ème ligne dans 1,3% (n = 1).

On retrouvait une répartition des échantillons en fonction de leur CAM de *BRAF* V600E semblable à celle observée dans l'article précédent (Hélias-Rodcewitz *et al.*, *BMC Cancer* 2015) (Figure 18) : 60,3% des patients étaient hétérozygotes (CAM comprise entre 30 et 60%) et 24,4% des patients avaient une CAM de *BRAF* V600E supérieure à 60%, dit « homozygotes ».

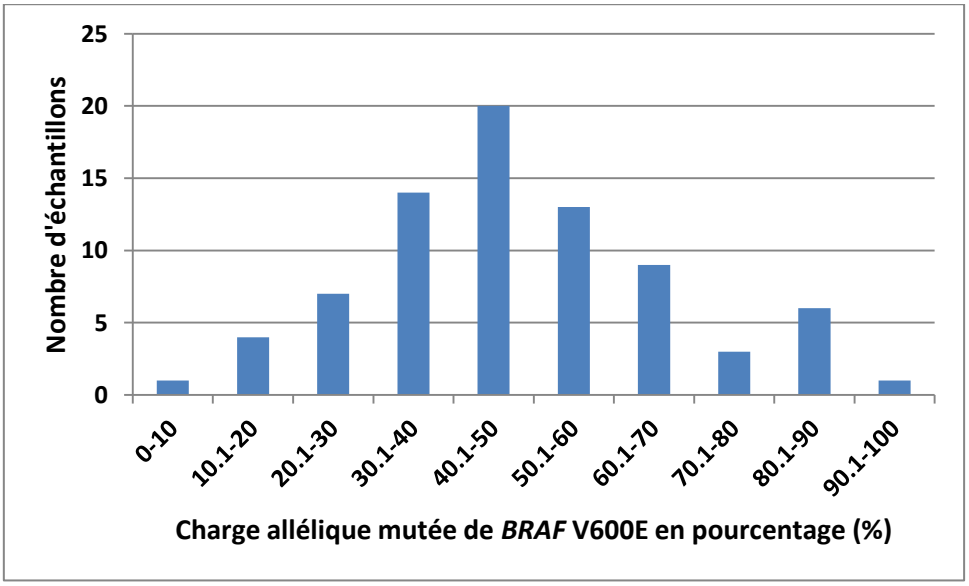


Figure 18. Histogramme des CAM de *BRAF* V600E.
Les CAM de BRAF V600E ont été obtenues par pyroséquençage, à partir de l'ADN de 78 échantillons de mélanome considérés mutés BRAF V600E, chez des patients avant traitement par inhibiteurs de BRAF.

Le test du logrank de comparaison de courbes de survie ne montre pas de différence statistiquement significative entre les groupes ayant une CAM de *BRAF* V600E avant traitement inférieure ou égale à 60% *versus* supérieure à 60%, qu'il s'agisse de la survie globale (p = 0.27) ou de la survie sans progression (p = 0.20) (Figure 19). Toutefois, les

patients ayant une CAM de *BRAF* V600E avant traitement supérieure à 60% ont tendance à avoir un bénéfice, notamment sur la survie sans progression.

Les analyses multivariées en prenant en compte d'autres paramètres influençant la survie tels que la présence de métastase cérébrale, le stade AJCC initial, un traitement antérieur par immunothérapie n'ont pas été réalisées du fait de l'absence de significativité des résultats de survie. Malheureusement, le taux sérique de LDH initial n'était pas une donnée assez souvent rapportée dans les dossiers pour qu'elle soit exploitable.

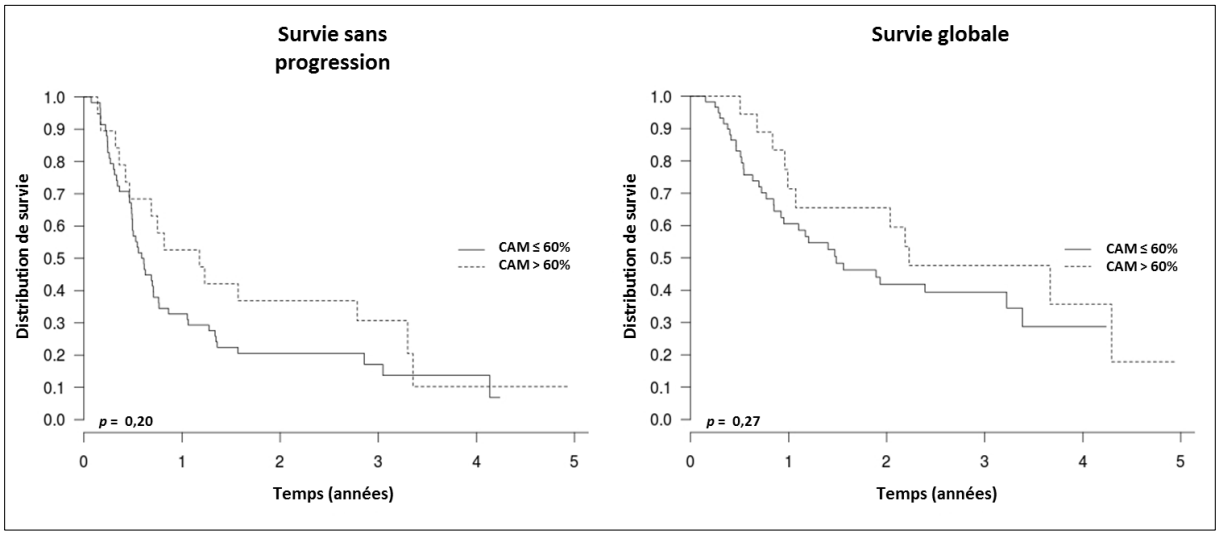


Figure 19. Courbes de Kaplan-Meier de survie sans progression et de survie globale des patients traités par inhibiteurs de BRAF en monothérapie selon leur CAM de *BRAF* V600E avant traitement (≤ 60% *versus* > 60%).

Discussion

Cette étude rapporte une prévalence de mélanomes mutés *BRAF* V600E homozygotes, définis par une CAM de *BRAF* V600E supérieure à 60%, de 24,4%, valeur assez proche de ce que nous avions retrouvé dans notre article précédent (19% ; Hélias-Rodzewicz *et al.*, *BMC Cancer*, 2015). Nous confirmons alors que les mélanomes « homozygotes » ne sont pas rares.

Dans d'autres types de tumeurs, un déséquilibre allélique des oncogènes mutés a déjà été décrit et semble être assez fréquent pour certains oncogènes ; ainsi, une étude a rapporté une CAM d'*EGFR* de 75% et une CAM de *KRAS* de 58% dans des cancers pulmonaires, colorectaux et pancréatiques (372). Dans cette étude, les auteurs décrivent deux formes de déséquilibre allélique : la première est associée à un gain du nombre de copies du gène (qui peut être partiel ou total), la deuxième est associée à une perte complète de l'allèle sauvage ; ils rapportent également que pour *KRAS* muté, l'association d'une CAM élevée avec un gain du nombre de copies est un facteur de mauvais pronostic (372). Il est intéressant de noter que nous avons montré que sur 4 lignées cellulaires de mélanome (2 lignées homozygotes et 2 lignées hétérozygotes), un gain du nombre de copies du gène *BRAF* (par polysomie) n'était observé que dans les lignées hétérozygotes, sans que cela toutefois n'interfère sur la sensibilité au vemurafenib, l'une de ces 2 lignées hétérozygotes étant sensible et l'autre résistante.

Dans les mélanomes mutés *KIT*, une CAM élevée de *KIT* a été montrée comme étant associée à un meilleur taux de réponse à l'imatinib (86).

Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative sur la survie sans progression ni sur la survie globale, nos deux critères principaux, chez les patients traités en monothérapie par vemurafenib ou dabrafenib, selon leur statut homozygote ou hétérozygote de l'allèle muté *BRAF* V600E. Cependant, une tendance était observée en faveur d'un bénéfice clinique pour les patients atteints d'un mélanome porteur d'une mutation *BRAF* V600E homozygote, notamment sur la survie sans progression qui a l'avantage de ne pas tenir compte des traitements reçus ultérieurement (p = 0,20). Dans cette étude, certains patients considérés en progression ont poursuivi le traitement lorsqu'il s'agissait de progression lente ou accessible à un traitement local, en raison de l'absence d'altérative thérapeutique efficace à proposer à cette époque, notamment pour les patients qui avaient reçu un traitement antérieur par ipilimumab (n = 12 ; 9,8%). En effet, une étude monocentrique précédente a montré l'intérêt de poursuivre le traitement par inhibiteur de BRAF malgré une progression selon les critères RECIST 1.1, permettant une amélioration de la survie globale à partir de la date de mise sous traitement : 17,8 mois pour les patients ayant poursuivi le traitement après une progression *versus* 7 mois pour ceux qui l'avait

arrêté ($p < 0,001$) ; la survie globale à partir de la date de progression était aussi plus longue pour les patients qui avaient poursuivi le traitement (11,6 mois *versus* 2 mois, $p < 0,001$) (379). Cela suggère que le contrôle de clones sensibles à l'inhibition de BRAF pourrait avoir une action sur la sensibilité au vemurafenib de clones ayant pourtant développé des mécanismes de résistance (à l'origine de la progression). Une autre étude a montré récemment que la poursuite d'un traitement par vemurafenib après une progression pouvant être contrôlée par un traitement local (chirurgie ou radiothérapie) peut s'avérer bénéfique pour certains patients car la maladie résiduelle peut continuer à répondre à l'inhibition de BRAF (219). Une première étude avait suggéré sur l'observation de quelques cas qu'une CAM de *BRAF* V600 pouvait prédire la réponse aux inhibiteurs de BRAF (380), puis une seule autre étude avant la nôtre, à notre connaissance, a recherché une corrélation entre la CAM de *BRAF* sur des prélèvements réalisés avant la mise sous traitement, et la réponse aux inhibiteurs de BRAF en monothérapie (381). Dans cette étude, Satzger *et al.* n'ont pas retrouvé de corrélation entre la survie globale, la survie sans récidive, le taux de réponse et la CAM de *BRAF* (mesurée par NGS). Cependant, cette étude présente plusieurs défauts. Tout d'abord, la CAM de *BRAF* V600 médiane était de 27%, valeur plus basse que la valeur médiane des CAM de *BRAF* V600E dans notre étude, mesurée par pyroséquençage (45%) ; ce chiffre faible peut s'expliquer soit par la technique de NGS qui permet d'avoir un seuil de détection très bas, et donc de considérer des prélèvements mutés même si la CAM est faible, soit par la faible cellularité tumorale de certains échantillons (seuil de cellularité dans cette étude > 30%, *versus* au moins > 70% dans notre étude). Puis, les seuils de CAM de *BRAF* utilisés pour déterminer une corrélation avec les paramètres de réponse au traitement et de survie étaient de 15%, 18%, 20% et 25% ; ces seuils, bien inférieurs au nôtre (> 60%), ne reflètent donc pas le statut homozygote ou hétérozygote des mélanomes.

Les travaux récents de McArthur *et al.* présentés au congrès de l'ESMO (*European Society for Medical Oncology*) en septembre 2015 (299) ont étudié la charge allélique de *BRAF* V600 (mesurée par NGS) avant traitement des mélanomes des patients inclus dans CoBRIM (comparaison de la thérapie combinée par vemurafenib et cobimetinib avec le vemurafenib et un traitement placebo), afin d'évaluer son impact sur la survie sans progression. On notera que les mutations de *BRAF* V600E dans l'étude CoBRIM représentaient 69,5% des cas (16), que les chiffres spécifiques de la CAM de *BRAF* V600E n'ont pas été précisés. La CAM de

BRAF V600 médiane était de 33%, les auteurs ont alors choisi ce seuil pour comparer la survie sans progression médiane des patients traités par vemurafenib et placebo ou par l'association vemurafenib et cobimetinib : quel que soit le traitement reçu, la survie sans progression médiane était la même pour les patients avec une CAM de *BRAF* V600 élevée (> 33%) ou faible (≤ 33%). Ce seuil de 33% mélange alors la majeure partie des mélanomes dits « hétérozygotes » (avec une CAM entre 30 et 60%) avec les mélanomes dits « homozygotes » (avec une CAM > 60%). Les résultats de cette étude n'indiquent donc pas si le sous-groupe de mélanome avec une CAM de *BRAF* V600 > 60% (mélanomes homozygotes) était associé à une meilleure survie sans progression médiane que le sous-groupe avec une CAM de BRAF V600 ≤ 60%, pour chacun des traitements (vemurafenib et placebo ou vemurafenib et cobimetinib).

Il est important de rappeler qu'un déséquilibre allélique de *BRAF* est également possible en faveur d'une charge allélique sauvage de BRAF plus importante ; la proportion de patients avec une CAM de BRAF V600E ≤ 30% est dans cette étude de 14,1% (n = 11/78). Lors de notre étude précédente (Hélias-Rodzewicz *et al,. BMC Cancer*, 2015), nous avions réalisé des marquages en immunohistochimie par l'anticorps spécifique de la protéine BRAF V600E, l'anticorps VE1, dont l'analyse avait révélé que toutes les cellules tumorales étaient marquées (marquage homogène), même dans les échantillons avec une CAM de *BRAF* V600E ≤ 30% (résultat non montré, et non spécifié dans l'article précédent). Ce résultat, cohérent avec les données de la littérature (334), prouve que les échantillons tumoraux n'ont pas de clones tumoraux non mutés *BRAF* V600E à l'origine d'une possible résistance primaire à l'inhibition de BRAF par activation paradoxale de la voie MAPK (331).

L'hypothèse selon laquelle nos résultats sur la sensibilité plus fréquente des lignées homozygotes par rapport aux lignées hétérozygotes seraient liés à une différence au sein des altérations génétiques des gènes impliqués dans les mécanismes de résistance en fonction du statut homozygote ou hétérozygote (analyse toujours en cours lors de l'écriture de ce manuscrit), pourrait laisser suggérer que l'ajout d'un inhibiteur de MEK à un inhibiteur de BRAF n'influencerait pas (ou peu) la réponse des mélanomes avec une CAM de *BRAF* V600E élevée. Toutefois, compte-tenu de la complexité des mécanismes de résistance possibles qui se développent même avec la double inhibition de BRAF et de MEK, on peut espérer que la réponse sera plus prolongée chez les patients avec un mélanome muté BRAF

V600E homozygote, mais cela n'exclut en rien la possibilité du développement de résistance avec le temps, même chez ces patients. A ce jour, le traitement de référence pour les mélanomes mutés *BRAF* V600 étant la thérapie ciblée combinée par inhibiteurs de BRAF et de MEK. Une étude clinique comparant le taux de réponse, la survie sans récidive et la survie globale, et notamment la proportion de patients avec une maladie contrôlée (réponse complète, partielle ou stable) après plus d'un an de traitement, en fonction de la CAM de *BRAF* V600 serait intéressante, de même qu'étude comparant les différents mécanismes de résistance des cas en progression dans les 2 groupes (CAM *BRAF* V600 > 60% et CAM *BRAF* V600 ≤ 60%).

En effet, une hypothèse physiopathologique serait que les cellules de mélanomes ayant un déséquilibre allélique en faveur d'une forte CAM de *BRAF* V600E auraient développé une addiction oncogénique, avec la nécessité pour survivre d'avoir une voie MAPK très fortement activée (Figure 11-B). Ainsi, l'inhibition de BRAF suffirait à elle seule pour empêcher les cellules de survivre, d'autant plus si, au sein de ces cellules, d'autres altérations génétiques (ou épigénétiques) sont présentes, les empêchant alors de développer des mécanismes de résistance adaptative au traitement.

De plus, il a été montré que la liaison du vemurafenib à la protéine BRAF V600E active, paradoxalement, la signalisation MAPK en aval par l'intermédiaire d'une dimérisation avec des protéines non mutées de la famille RAF et d'une activation allostérique de la protéine BRAF non mutée ainsi dimérisée (382). Cela suppose que dans une lignée cellulaire *BRAF*V600E homozygote, dépourvue de protéine BRAF non mutée, les possibilités de cette activation paradoxale sont limitées aux hétérodimères avec CRAF (et à moindre degré ARAF), ce qui pourrait expliquer en partie que les lignées homozygotes aient une dépendance accrue de la protéine BRAF mutée activée (addiction à la protéine BRAF mutée).

Des études au niveau transcriptomique sont nécessaires pour confirmer et compléter ces hypothèses. Il est tout d'abord nécessaire de montrer qu'il existe une corrélation entre le déséquilibre allélique observé avec un déséquilibre du niveau d'expression de la protéine BRAF V600E (mutée) et de la protéine BRAF sauvage. Dans notre précédent article (Hélias-Rodzewicz *et al., BMC Cancer*, 2015), nous avions montré que l'expression de BRAF V600E (évaluée par le degré d'intensité du marquage par l'anticorps spécifique VE1), était plus forte

dans les cas de mélanomes mutés BRAF V600E associé à une polysomie du chromosome 7 ou une amplification du locus du gène *BRAF* (17/73 ; 74%) en comparaison aux cas avec une uni- ou disomie du chromosome 7 (7/22 ; 32%) ($p < 0,005$). Dans le sous-groupe de mélanomes homozygotes, une plus forte expression de la protéine BRAF V600E était observée, mais il ne s'agissait que d'une tendance (résultat non significatif). Nous avons tenté d'évaluer cette corrélation par immunoempreinte permettant, tout comme la technique d'immunohistochimie, une analyse semi-quantitative de l'expression protéique, mais les résultats n'étaient pas concluants (résultats non montrés).

De plus, l'étude de corrélation entre les mécanismes de résistance et le statut homozygote ou hétérozygote devra également s'étendre aux mécanismes épigénétiques, largement impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de BRAF. Capaldo *et al.* ont montré que des lignées homozygotes pour *BRAF* V600E avaient des taux d'expression de MITF plus bas que les lignées hétérozygotes (377), et qu'une faible expression de MITF était associée, pour des doses faibles de vemurafenib, à une meilleure sensibilité au vemurafenib. De plus, MITF est connu pour être impliqué dans les mécanismes épigénétiques de résistance à l'inhibition de BRAF, et il a été montré qu'une surexpression ectopique de la protéine BRAF V600E empêchait l'expression de MITF (383). Ainsi, l'un des mécanismes possible de la meilleure sensibilité au vemurafenib des mélanomes homozygotes *BRAF* V600E pourrait être l'influence de la surexpression de la protéine BRAF V600E sur l'expression de MITF. Dans une étude récente sur les mécanismes de résistance aux thérapies combinées associant un inhibiteur de BRAF à un inhibiteur de MEK, Moriceau *et al.* ont montré que l'un des mécanismes de résistance secondaire à ces traitements était l'ultra-amplification de *BRAF* V600E, et qu'une CAM de *BRAF* V600E élevée était corrélée à la surexpression de la protéine BRAF V600E ; cela avait pour conséquence une augmentation du niveau d'expression de phospho-CRAF, le recrutement de MEK1 et MEK2, et l'activation de la voie MAPK, conférant ainsi une résistance aux thérapies combinées, ainsi qu'une addiction au traitement (265), entraînant une régression des tumeurs résistantes suite à l'arrêt de l'administration du traitement inhibiteur, comme cela avait déjà été décrit avec d'autres mécanismes de résistance (266). Dans l'étude de Moriceau *et al*., contrairement à la nôtre, l'augmentation de la CAM de *BRAF* V600E était observée dans le cadre de résistances acquises aux inhibiteurs de BRAF, et l'addiction était donc envers le traitement par inhibiteurs (double

combinaison). Dans notre étude, l'augmentation de la CAM de *BRAF* V600E est observée avant tout traitement par inhibiteur de BRAF, un phénomène similaire d'addiction mais cette fois envers le mécanisme oncogénique lui-même de l'hyper-activation de la voie MAPK *via* une CAM de *BRAF* V600E augmentée, est suspecté.

Par ailleurs, nous avons montré à partir de données sur des lignées cellulaires de mélanome provenant du CCLE et de données sur des échantillons de mélanome provenant du TCGA, que la CAM de *BRAF* V600 n'était pas corrélée au taux mutationnel global (nombre de mutations total par échantillon tumoral). Très récemment, au congrès de l'ASCO en juin 2016, Flaherty *et al*. ont montré qu'un taux mutationnel global élevé (défini par un taux supérieur au 75ème percentile) était associé à une meilleure survie globale (p = 0,01 en analyse multivariée) des patients traités par la combinaison dabrafenib et trametinib, dans le cadre de l'essai de phase III COMBI-d ; si l'on ajoutait comme critère le taux sérique de LDH, qui a été montré comme étant un biomarqueur prédictif de la réponse à ce traitement, 82% (n = 11) des patients traités par cette combinaison ayant un taux mutationnel global élevé et un taux sérique de LDH avant traitement inférieur à la limite supérieure de la normale étaient encore en vie à 3 ans. Cependant, aucune association significative n'a été mise en évidence pour la survie sans progression (384). Le taux mutationnel global, dont nous avons montré qu'il était indépendant de la CAM de *BRAF* V600, semble donc être, bien que l'effectif soit faible dans cette étude, un nouveau biomarqueur potentiel prédictif de la réponse à la thérapie combinée par inhibiteurs de BRAF et de MEK.

Conclusion

Cette étude est la première à avoir comparé la survie des patients atteints de mélanomes mutés *BRAF* V600E traités par vemurafenib ou dabrafenib en monothérapie selon le statut homozygote ou non de *BRAF* V600E.

Notre étude n'a pas montré d'association statistiquement significative de la survie sans progression et de la survie globale avec le statut homozygote de *BRAF* V600E. Une des explications pourrait être un manque de puissance de cette étude, calculé à plus de 20%, en

raison du manque d'effectif, notamment dans le groupe des patients homozygotes. Le caractère rétrospectif de cette étude peut également comporter des biais. Toutefois, l'observation des courbes de survie sans récidive et de survie globale, notamment durant les 12 premiers mois de traitement montrent une tendance pour laquelle nous pensons que l'hypothèse de l'influence du statut homozygote sur la réponse au traitement mérite d'être plus amplement étudiée. Nous espérons augmenter la puissance de cette étude en obtenant plus de prélèvements pour réaliser les analyses de pyroséquençage, voire d'associer nos données avec celles d'autres centres.

Si cette tendance est confirmée, il faudra bien entendu d'une part continuer à explorer les mécanismes de ce phénomène, et d'autre part évaluer l'intérêt de ce nouveau biomarqueur potentiel de réponse à l'heure des thérapies ciblées combinées.

2. La charge allélique mutée de *NRAS*

De même que pour l'oncogène *BRAF*, nous nous sommes intéressés au déséquilibre de la CAM de l'oncogène *NRAS* et à la valeur pronostique d'une CAM de *NRAS* élevée dans les mélanomes métastatiques porteurs d'une mutation activatrice de *NRAS* sur le codon Q61.

2.1 Article 2 : Increase in *NRAS* mutant allele percentage during metastatic melanoma progression, *Experimental Dermatology*, 2016

Tel que cela l'avait été rapporté dans une étude ayant montré la possibilité de l'acquisition d'une homozygotie de la mutation de *BRAF* V600E au cours de l'évolution métastatique de mélanomes mutés *BRAF* V600E (370), nous avons rapporté deux observations de mélanomes mutés *NRAS* dont la CAM de *NRAS* avait fortement augmenté durant la progression métastatique, renforçant l'hypothèse qu'une CAM élevée de *NRAS* puisse être associée au pronostic des patients atteints de mélanomes métastatiques mutés *NRAS*.

Résumé de l'article : Increase in *NRAS* mutant allele percentage during metastatic melanoma progression, *Experimental Dermatology*, 2016

Un mélanome cutané sur cinq a une mutation dominante entraînant un gain de fonction de l'oncogène *NRAS*. Nous rapportons les deux premiers cas de mélanome mutés *NRAS* avec une augmentation de la charge allélique de *NRAS* dans les métastases de mélanome, et nous montrons que le mécanisme chromosomique de cette homozygotie est une augmentation du nombre de chromosome 1 (polysomie). Nous avons observé une augmentation de la CAM de *NRAS* lors de la progression métastatique chez 2 patients atteints de mélanome porteur d'une mutation de *NRAS* sur le codon Q61 (p.Q61K dans le cas 1 et p.Q61R dans le cas 2).

Dans le cas 1, nous avons observé une augmentation de la CAM de *NRAS* de 18% dans le premier ganglion métastatique initialement, à 81%, 92% et 85% respectivement dans trois métastases ultérieures : ganglionnaire, cérébrale, et sous-cutanée, dont les exérèses chirurgicales ont été réalisées 1 mois, 6 mois et 17 mois respectivement après l'exérèse chirurgicale de la première métastase ganglionnaire. Dans le cas 2, nous avons observé une augmentation de la CAM de NRAS de 40% au sein du mélanome primitif, à 63% dans une métastase ganglionnaire régionale issue d'un curage ganglionnaire.

L'analyse par FISH a montré les mêmes résultats dans les deux cas : une polysomie fréquente du chromosome 1 dans les échantillons de métastases avec une CAM de *NRAS* > 60%, tandis que la plupart des cellules étaient disomiques dans les échantillons tumoraux sans déséquilibre allélique (mutations hétérozygotes).

Cette étude montre que la CAM de *NRAS* peut augmenter pendant la progression métastatique des mélanomes mutés *NRAS*, et que ce déséquilibre allélique peut être associé à une instabilité chromosomique. D'autres études sont nécessaires pour évaluer l'impact pronostique du statut homozygote de *NRAS* ou d'une polypoïdie du chromosome 1, porteur du gène *NRAS*, dans les mélanomes cutanés métastatiques.

Mots clés. Déséquilibre allélique, biomarqueur, mutation homozygote, mélanome muté *NRAS*, polysomie.

DOI: 10.1111/exd.13001
www.wileyonlinelibrary.com/journal/EXD

Increase in *NRAS* mutant allele percentage during metastatic melanoma progression

Elisa Funck-Brentano[1,2,*], Zofia Hélias-Rodzewicz[1,3,*], Christine Longvert[1,2], Karima Mokhtari[4], Philippe Saiag[1,2] and Jean-François Emile[1,3]

[1]Research Unit EA 4340 'Biomarkers in cancerology and in hemato-oncology', Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Université Paris-Saclay, Boulogne-Billancourt, France; [2]Department of Dermatology, AP-HP Ambroise Paré Hospital, Boulogne-Billancourt, France; [3]Department of Pathology, AP-HP Ambroise Paré Hospital, Boulogne-Billancourt, France; [4]Department of Neuropathology, AP-HP Pitié-Salpétrière Hospital, Paris, France

Correspondence: Dr Elisa Funck-Brentano, MD, Research Unit EA 4340 'Biomarkers in cancerology and hemato-oncology', Department of Dermatology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Ambroise Paré Hospital, 9 avenue Charles De Gaulle, 92104 Boulogne-Billancourt Cedex, France, Tel.: 33-(0)1-49-09-57-23, Fax: 33-(0)1-49-09-56-85, e-mail: elisa.funck-brentano@aphp.fr

**Equally contributed.*

Abstract: One-fifth of cutaneous melanomas have dominant gain-of-function mutations of the *NRAS* oncogene. We report the first two cases of increasing *NRAS* mutant allele frequency in melanoma metastases and show that the chromosomal mechanism of this homozygosity is an increased polysomy of chromosome 1. We observed an increase in *NRAS* mutant allele percentage (*NRAS*-MA%) in the metastatic melanoma progression from 2 patients with melanomas harbouring a *NRAS* mutation (p.Q61K in case 1 and p.Q61R in case 2). In case 1, we observed a *NRAS*-MA% increase from 18% within the first metastatic node to 81%, 92% and 85% respectively in the three subsequent metastases: lymph node, brain and subcutaneous metastases biopsied 1, 6 and 17 months, respectively, after the initial lymph node biopsy. In case 2, we observed an increase in *NRAS*-MA% from 40% within the primary melanoma to 63% within the metastatic lymph node. FISH analysis showed the same results in both cases: a frequent polysomy of chromosome 1 in metastasis samples with *NRAS* mutant allele percentage >60%, while most cells were disomic in the samples with well-balanced heterozygous mutations. The percentage of *NRAS* mutant allele may increase during metastatic progression and may be associated with chromosomal instability. Further studies are needed to evaluate the prognostic impact of the *NRAS* homozygous status and/or polyploidy in metastatic cutaneous melanomas.

Key words: allelic imbalance – biomarker – homozygous mutation – *NRAS* melanoma – polysomy

Accepted for publication 25 February 2016

Introduction

It is commonly accepted that activating mutations of a single allele of oncogenes, without the necessity of the loss of the wild-type allele, is sufficient for tumorigenesis (1), while inactivation of both alleles is mandatory for tumor suppressor genes. However, the detection exclusively of mutated oncogenes is common in tumors and cells lines and occurs, by copy number gain (CNG) through amplification of the gene, also known as polysomy (homozygous mutation), or by loss of wild-type allele (hemizygous mutation) (2).

NRAS is an oncogene located on chromosome 1p and is mutated in 18% of cutaneous melanomas (3). The frequency of homozygous/hemizygous mutation of *NRAS* (defined as >60% mutant allele frequency) in melanoma is unknown, as are the oncogenic mechanisms resulting in the increase in *NRAS* mutant allele percentage (*NRAS*-MA%). We have recently shown that homozygous mutations of *BRAF* are frequent in melanomas (4) and mainly related to polysomy. We report herein the first two cases of acquired homozygous *NRAS* (c.181C>A, p.Q61K and c.182A>G, p.Q61R) mutations in melanoma metastases and describe the chromosomal mechanism of this mutant allele gain by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

Observation 1

A 59-year-old man underwent the excision of an enlarged left supraclavicular lymph node, 5 years after the excision of a 0.82-mm-thick, non-ulcerated, non-mitotic superficial spreading melanoma of the left forearm, lacking lymphovascular invasion. Pathological analysis of the lymph node specimen confirmed the melanoma lymph node metastasis (with >80% of tumor cells); its molecular analysis by pyrosequencing and Sanger sequencing found a *NRAS* c.181C>A, p.Q61K mutation in 18% (duplicate: range [17-19%]) of *NRAS* alleles. Molecular analysis of the primary melanoma by pyrosequencing confirmed the presence of the *NRAS* Q61 mutation, but the low percentage of tumor cells (10%) did not allow testing for the percentage of mutant alleles. One month later, whereas the patient received no systemic treatment for his melanoma, a left supraclavicular and cervical node dissection found one additional metastatic lymph node (out of 8 nodes) with extracapsular extension. Molecular analysis of this node (with 90% of tumor cells) found the same *NRAS* p.Q61K mutation, but the *NRAS*-MA% had dramatically increased to 81% (duplicate: range [80–82%]) (Fig. 1). No *BRAF* mutation was found on the molecular analysis of these two samples.

Then, the patient subsequently developed distant metastases including one brain localization, and he was treated with fotemustine followed by ipilimumab. An intratumor haemorrhage required the excision of the brain metastasis 5 months after the lymph node dissection. Due to disease progression, the patient was then treated with dacarbazine. Nine months after the brain

© 2016 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

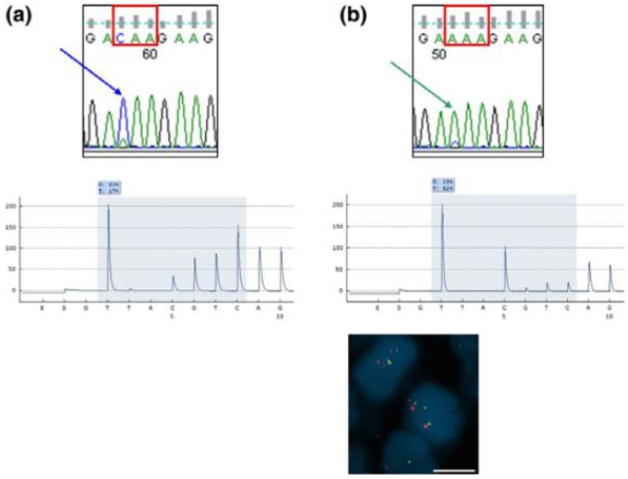


Figure 1. Case 1: *NRAS* c.181C> A, p. Q61K mutation by Sanger (top), and pyrosequencing (below) in the first metastatic lymph node (a) and in the metastatic lymph node from node dissection (b). For Sanger analysis, mutated codon 61 is shown in the red rectangle, and for the pyrosequencing, the mutated nucleotide is in the blue rectangle (G represents the percentage of wild-type alleles and T the percentage of mutant alleles). Representative FISH image (bottom) of the metastasis lymph node from node dissection (b) with probes specific for *NRAS* gene (red signals) and chromosome 4 (green signals). Bar, 10 μm.

Table 1. Percentage (%) of mutant alleles in each sample, results of pyrosequencing (performed in duplicate)

	Tested sample	% of tumor cells	% of mutant alleles (T) (%[range])
A	1st node metastasis	70	18 [17–19]
	2nd node metastasis	90	81 [80–82]
	Brain metastasis	95	92 [92–92]
	Subcutaneous metastasis	90	85 [85–85]

	Tested sample	% of tumor cells	% of mutant alleles (C) (%[range])
B	Primary melanoma	90	40 [39–41]
	1st node metastasis	90	63 [62–64]

metastasis excision, the patient underwent the excision of a painful subcutaneous metastasis. Molecular analysis of these two metastases (95% and 90% of tumor cells, respectively) found the same *NRAS* p.Q61K mutation, with both *NRAS*-MA% above 80% (Table 1A).

Formalin-fixed paraffin-embedded slides from the 3 metastasis samples were analysed by FISH, using two chromosome 1-specific probes. The first probe targeted the *NRAS* gene (RP11-245I3) (1p13.2), and the second probe was telomeric to the *NRAS* locus (RP11-269F19) (1p34.1). To evaluate cell ploidy, each sample was analysed with at least one of the following probes: RP11-159C11 (chromosome 12), RP11-93L18/RP11-893F2 (chromosome 17) and RP11-586A2 (chromosome 4). In homozygous samples (with *NRAS*-MA% >60%), FISH *NRAS* analysis showed two cell populations, harbouring 2 copies or 3–4 copies of chromosome 1, whereas most tumor cells were disomic for chromosome 1 in the first metastasis with a low *NRAS*-MA% (18%). Similar results were observed for probes targeting chromosomes 12, 17 and 4.

Observation 2

A 71-year-old man had a synchronous amputation of the right hallux to excise a primary acral lentiginous melanoma (4 mm

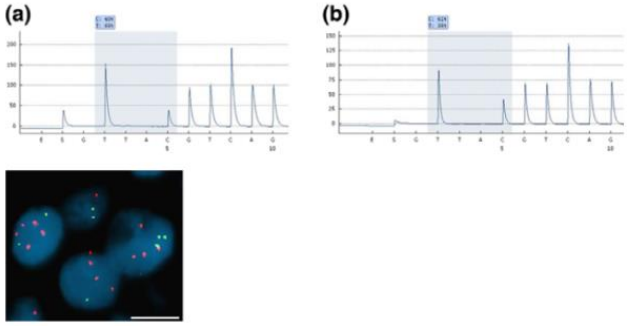


Figure 2. Case 2: *NRAS* c.182A>G, p.Q61R mutation by pyrosequencing (top) in the primary melanoma (a) and in the metastatic lymph node (b). For pyrosequencing analysis, the mutated nucleotide is in the blue rectangle (T represents the percentage of wild-type alleles and C the percentage presence of the mutation). Representative FISH image (bottom) of the primary melanoma (a) with probes specific for *NRAS* gene (red signals) and chromosome 4 (green signals). Bar, 10 μm.

thick, ulcerated, with 25 mitoses/mm^2, with regression, without lymphovascular invasion) and an inguinal lymph node dissection which found 1 metastatic lymph node (out of 5 nodes). Four months later, distant metastases occurred (node, lung and bone metastases). The patient was treated with dacarbazine in first line (1 cycle), then with a single infusion of ipilimumab (discontinued due to digestive toxicity). He died of disease progression 8 months after the surgical treatment.

Molecular analysis, by pyrosequencing (for *BRAF* and *NRAS*) and Sanger (for *KIT*), of the primary melanoma biopsy specimen (with 90% of tumor cells) found no *BRAF* or *KIT* mutations, but a *NRAS* c.182A>G, p.Q61R mutation in 40% (duplicate: range [39–41%]) of *NRAS* alleles, whereas molecular analysis of the metastatic lymph node biopsy specimen (90% tumor cells) identified the same mutation in 63% (duplicate: range [62–64%]) of *NRAS* alleles (Fig. 2; Table 1B).

In the lymph node metastatic sample (*NRAS*-MA% >60%), FISH *NRAS* analysis showed a polysomy of chromosome 1 (3–4 copies) in most tumor cells, whereas in the primary melanoma sample with a 'heterozygous' *NRAS*-MA% (40%), this cell population was less represented. Similar results were observed for probes targeting chromosome 4.

Discussion

We report here, to the best of our knowledge, the first two cases of homozygous *NRAS* mutations acquired during the evolution of metastatic melanomas. Homozygosity of *NRAS* was associated with an increased polysomy of chromosome 1.

In disomic cells, acquired homozygosity may occur after a loss of genetic material through the loss of the wild-type allele (hemizygous mutation) followed by a duplication of the mutant allele leading to copy-neutral loss of heterozygosity (LOH), with almost 100% of mutant allele. Other mechanisms of mutant allele increase are a gain of the mutant region by amplification or by chromosome gain. In the first case of this report, the first metastatic lymph node had a low *NRAS*-MA%, whereas subsequent metastases had more than 80% of *NRAS*-MA%. FISH analysis disclosed an increase in cell number with polysomy of chromosomes 1, 12 and 17 within the homozygous samples, while in the earlier sample with low NRAS-MA%, most tumor cells were disomic with fewer polysomic tumor cells. This is suggestive of tumor

© 2016 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

clone selection in the evolution of this metastatic melanoma. In the second observation, the primary melanoma had a *NRAS*-MA % between 30 and 60% (considered as heterozygous), whereas, similar to case 1, the metastatic lymph node had also more than 60% of *NRAS*-MA% (considered as homozygous). Although the date of excision of the primary melanoma and of the lymph node dissection was identical, *NRAS*-MA% increased during melanoma progression. Interestingly, results of *NRAS* FISH analysis of case 2 were similar to those of case 1, suggesting that increase in *NRAS*-MA% was associated in both cases with a selection of a polysomic cell population, with a gain of 3 or 4 copies of chromosome 1.

In our previous study on variations in BRAF mutant allele percentage (4), FISH analysis found more frequent polysomy of chromosome 7 in homozygous *BRAF* V600E mutant melanomas than in heterozygous BRAF V600E mutant melanomas (as defined by 30 to 60% of *BRAF* mutant alleles), suggesting, as in the present report, that high mutant allele percentage is often due to a CNG through polysomy of the chromosome harbouring the mutant allele.

Homozygous mutations of *NRAS* have been reported in 10% of cancer cells lines (2). The impact of a high *NRAS*-MA% in tumorigenesis is unknown, but we hypothesize that heterozygous *NRAS* mutations are an early event in tumorigenesis and aggressive tumor development requires other genetic lesions, as illustrated by the case of a patient with juvenile myelomonocytic leukaemia with an initial heterozygous *NRAS* mutation at codon 12 which became homozygous after blastic crisis (5). In this case, the mechanism of the acquired homozygosity was LOH resulting from duplication of the mutated allele through mitotic recombination, and not from deletion of the wild-type NRAS allele. In myeloid malignancies, copy-neutral LOH is a common chromosomal defect (6), and the risk of developing myelofibrosis increases with a high *MPL* or *JAK2* mutant allele burden (7). We could hypothesize that the NRAS wild-type protein has a tumor suppressive role; however, Xu *et al.* showed that *NRAS* G12D gene dosage, but not inactivation of wild-type *NRAS*, underlies the aggressive *in vivo* behaviour of *NRAS* G12D/G12D haematopoietic cells (8).

Interestingly, 2 cases of melanoma with homozygote mutations in codon 61 of *NRAS* (p.Q61K and p.Q61R, respectively) arising from congenital melanocytic nevi with a heterozygote *NRAS* mutation have been reported; array comparative genomic hybridization of one of these cases did not show a deletion encompassing *NRAS*, implying that the LOH was due to either an additional p.Q61K mutation in the normal allele or a very small deletion at this locus (9). A recent study has shown that amplification of mutated *NRAS* seems to represent a new genetic mechanism leading to melanoma in the context of neurocutaneous melanocytosis (10).

Moreover, in lung cancer, the increase in *KRAS* mutant allele percentage seems to be more frequently associated with CNGs than with copy-neutral LOH, with a worsened prognosis (2).

Copy number gain can result from either amplification of the gene or chromosome polysomy.

In our cases, the first homozygous metastasis was detected before any treatment (immunotherapy or chemotherapy). Thus, no treatment could have modified *NRAS*-MA%. Both patients died before they could be treated with a MEK inhibitor, a promising targeted therapy in *NRAS* mutant melanomas (11), and their increase in *NRAS*-MA% may potentially have been a biomarker predictive of response to targeted therapy.

Further studies are necessary to evaluate the prognostic impact of *NRAS*-MA% and polyploidy, especially with regard to the efficacy of targeted therapies. Finally, these observations suggest that the selection of a tumor clone with a high *NRAS*-MA% related to chromosomal instability could impact on melanoma progression, and highlight the importance of performing repeated molecular analyses in the follow-up of patients with metastasis.

Acknowledgements

EFB and ZHR designed the research study. EFB, ZHR, KM and JFE contributed to production and analysis of the histological and molecular data. EFB, CL and PS contributed to collection and analysis of clinical data. EFB, ZHR, CL, PS and JFE wrote the article. All the authors approved the article.

We thank Dr Domitille Thomas-Beaulieu for giving us clinical follow-up information on patient 2, Dr Astrid Blom for her English language corrections, and Catherine Le Gall, Dominique Péchaud, Nathalie Terrones, Rim Ben Jannet and Mariama Bakari for their help in performing the pyrosequencing. This work was supported partly by grants from the Association Vaincre le Mélanome, Ligue Contre le Cancer (Comité 92 WB2016-15), and Association pour la Recherche et l'Enseignement en Pathologie (AREP).

Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

References

1 Vogelstein B, Kinzler K W. Nat Med 2004: **10**: 789–799.
2 Soh J, Okumura N, Lockwood W W *et al.* PLoS ONE 2009: **4**: e7464.
3 Lee J H, Choi J W, Kim Y S. Br J Dermatol 2011: **164**: 776–784.
4 Helias-Rodzewicz Z, Funck-Brentano E, Baudoux L *et al.* BMC Cancer 2015: **15**: 497.
5 Matsuda K, Nakazawa Y, Sakashita K *et al.* Haematologica 2007: **92**: 1576–1578.
6 Dunbar A J, Gondek L P, O'Keefe C L *et al.* Cancer Res 2008: **68**: 10349–10357.
7 Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P *et al.* Blood 2013: **121**: 4388–4395.
8 Xu J, Haigis K M, Firestone A J *et al.* Cancer Discov 2013: **3**: 993–1001.
9 Kinsler V A, Thomas A C, Ishida M *et al.* J Invest Dermatol 2013: **133**: 2229–2236.
10 Salgado C M, Basu D, Nikiforova M *et al.* Melanoma Res 2015: **25**: 453–460.
11 Ascierto P A, Schadendorf D, Berking C *et al.* Lancet Oncol 2013: **14**: 249–256.

© 2016 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

2.2 Article 3 : Frequent allelic imbalance in *NRAS* mutant melanomas (manuscrit en préparation, Poster 9578 #183, ASCO 2016)

Nous avons souhaité tout d'abord estimer la fréquence des mélanomes ayant un déséquilibre des allèles mutés de l'oncogène *NRAS* à partir d'échantillons de mélanomes humains sans mutation *BRAF* V600, et rechercher les mécanismes impliqués afin de savoir s'ils différaient de ceux que nous avions mis en évidence dans notre précédent article sur les mélanomes mutés *BRAF* (Hélias-Rodzewicz *et al., BMC Cancer*, 2015). De plus, suite à l'observation et aux analyses effectuées sur les 2 cas rapportés de mélanomes mutés *NRAS* (Funck-Brentano *et al*., *Exp Dermatol*, 2016), nous avons réalisé une étude clinique rétrospective de données de suivi de mélanomes mutés *NRAS* en fonction de la CAM de *NRAS* (≤ ou > 60%) afin d'évaluer la valeur pronostique de ce biomarqueur.

Résumé : Frequent allelic imbalance in *NRAS* Q61 mutant melanomas (manuscrit en préparation)

Contexte. Nous avons récemment rapporté que 19% de mélanomes mutés *BRAF* V600E ont une CAM de *BRAF* V600E augmentée (> 60%) (Hélias-Rodzewicz *et al., BMC Cancer*, 2015). Ce déséquilibre allélique était le plus souvent lié à une polysomie du chromosome 7. Par ailleurs, les mélanomes mutés *NRAS* sont connus pour avoir des critères histopronostiques plus agressifs que les autres sous-types (lésions primitives plus épaisses, avec une activité mitotique élevée, et une invasion métastatique ganglionnaire plus fréquente) et ont une moins bonne survie globale médiane (194, 385). Nous avons étudié, pour la première fois à notre connaissance, la CAM de l'oncogène *NRAS*, ses variations et sa valeur pronostique, à partir d'échantillons humains de mélanomes cutanés non porteurs de mutation de *BRAF* V600.

Méthodes. Nous avons recherché la présence de mutations de *NRAS* sur le codon Q61 par pyroséquençage dans des échantillons FFPE provenant de mélanomes cutanés (primitifs ou métastases) non mutés *BRAF* V600, issus du Centre de Ressources Biologique d'Ambroise Paré, présélectionnés pour avoir une cellularité supérieure à 80%. L'étude des mécanismes

oncogénétiques a utilisé une analyse par FISH, réalisée avec des sondes spécifiques pour *NRAS* (RP11-245I3) et 1p34.1 (RP11-269F19), sur des *tissue microarrays* (TMA) ou sur des coupes entières d'échantillons tumoraux. La perte d'hétérozygotie, utilisant une technique de polymorphisme de longueur des fragments amplifiés, ou *AFLP* (*amplified fragment-length polymorphism*), a été évaluée à l'aide de 8 marqueurs microsatellites du chromosome 1, dont 3 situés près du gène *NRAS*, 3 sur le bras court (1p) et 2 sur le bras long (1q). Les données histologiques de mélanomes primitifs mutés *NRAS,* les caractéristiques cliniques et les données de survie des patients suivis dans le service de dermatologie de l'hôpital Ambroise Paré ont été analysées de façon rétrospective. Lorsque pour un même patient, plusieurs échantillons tumoraux étaient disponibles, le résultat de la CAM de *NRAS* Q61 le plus élevé était celui retenu pour cette analyse. Les courbes de survie sans progression, de survie sans métastases (ou contrôle loco-régional), et de survie globale ont été réalisées selon la méthode de Kaplan-Meier. Les comparaisons des moyennes (tests de Student) et des fréquences (tests du Chi^2) ont été réalisées.

Résultats. Une mutation de *NRAS* Q61 a été détectée dans 108/216 (50%) des échantillons présélectionnés non mutés *BRAF* V600, dont 65 (60,2%) mutations *NRAS* Q61R, 31 (28,7%) mutations *NRAS* Q61K, 7 (6,5%) mutations *NRAS* Q61L, 5 (4,6%) mutations *NRAS*.

La CAM de *NRAS* Q61 était très hétérogène, variant de 17% à 92%. Près de 2/3 des échantillons tumoraux (n = 66/108 ; 66,1%) avaient une CAM de *NRAS* Q61 considérée hétérozygote (entre 30 et 60%), 13 échantillons (12%) avaient une CAM de *NRAS* Q61 faible (≤ 30%) et 29 échantillons (26,9%) avaient une CAM de *NRAS* Q61 > 60%, définissant le déséquilibre allélique pour l'oncogène *NRAS* en faveur d'un excès d'allèles *NRAS* Q61 mutés (« *NRAS Q61 mutant allelic imbalance* »).

L'analyse par FISH, réalisée sur 107 échantillons, mais dont 12 prélèvements n'étaient pas interprétables, a montré sur le chromosome 1 : une disomie (ou avec de rares cellules polysomiques) dans 54,5% (n = 18/33) des échantillons non mutés *NRAS* Q61, et seulement dans 30,4% (n = 7/23) des échantillons avec une CAM de *NRAS* Q61 élevée (différence non significative), une polysomie dans 6,1% (n = 2/33), 15,2% (n = 5/33) et 26,1% (n = 6/23) des échantillons non mutés, hétérozygotes ou avec une CAM de *NRAS* Q61 élevée, respectivement ; une amplification de *NRAS* était plus rare, retrouvée dans 6,1% (n = 2/33)

des échantillons non mutés et 8,7% (n = 2/23) de ceux avec une CAM de *NRAS* Q61 élevée ; une délétion de NRAS était aussi un événement rare, observé dans 9,1% (n = 3/33) des cas non mutés, et dans 3% (n = 1/33) des cas hétérozygotes. Dans les 3 groupes, une hétérogénéité intra-tumorale du nombre de copies du chromosome 1, définie par la présence de cellules tumorales monosomiques ou polysomiques (ou les deux) associées aux cellules tumorales disomiques était observée : dans 24,2% (n = 8/33) des cas non mutés, dans 30,3% (n = 10/33) des cas hétérozygotes, et dans 34,8% (n = 8/23) des cas avec une CAM de *NRAS* Q61 élevée. Les résultats de FISH réalisée sur les échantillons avec une faible CAM de *NRAS* Q61 (≤ 30%) ont été exclus de l'analyse, en raison du faible nombre d'échantillons (n = 6).

L'analyse de microsatellites, réalisée sur 29 échantillons, a montré qu'une perte d'hétérozygotie n'était retrouvée dans aucun des cas de mélanomes mutés *NRAS* hétérozygotes (n = 6/6), tandis qu'une perte d'hétérozygotie était présente dans tous les cas de mélanomes mutés *NRAS* avec une CAM de *NRAS* élevée (n = 22/22 ; 1 cas était non analysable du fait d'un ADN de mauvaise qualité), et parmi ces cas, une perte totale d'un allèle était retrouvée dans 72,7% des cas (n = 16/22).

Parmi les 108 échantillons de mélanomes mutés *NRAS* Q61, les données cliniques étaient disponibles pour 74 cas de mélanomes primitifs mutés *NRAS*, provenant de 73 patients (dont 31 femmes, une patiente avait 2 mélanomes distincts) : 34 (45,9%) étaient de type SSM, 28 (37,8%) de type nodulaire, le Breslow médian était de 2,75 mm [0,40-10,00], 34 (45,6%) avaient une ulcération, et 43 (58,1%) un index mitotique élevé (> 1 mitose / mm^2). Les échantillons utilisés pour la quantification par pyroséquençage de la CAM de *NRAS* Q61 provenaient de mélanomes primitifs dans 16,2% (n = 12) des cas, et de métastases (ganglionnaires, cutanées, ou viscérales) dans 79,2% (n = 59), pour 3 cas les données n'étaient pas disponibles. Une CAM de *NRAS* Q61 élevée était retrouvée dans 35% des cas (n = 26) inclus dans cette analyse, et donc 65% (n = 48) des cas avaient une CAM de *NRAS* Q61 ≤ 60% (médiane 39,5% [23 - 60] ; dont 8 cas < 30%).

Aucun critère clinique et histopronostique au moment du diagnostic de mélanome primitif ne différenciait les patients selon les 2 groupes (CAM de *NRAS* Q61 > 60% *versus* ≤ 60%) (p > 0,005). Les données de survies, évaluées à partir de la date du mélanome primitif, (survie

sans progression, survie avec une maladie contrôlée sans métastase à distance, et survie globale) étaient similaires dans les 2 groupes.

Conclusion. Cette étude a montré qu'un déséquilibre des allèles mutés sur le codon Q61 de l'oncogène *NRAS* en faveur d'un excès d'allèles mutés par rapport à la quantité d'allèles sauvages était fréquent, retrouvé dans les 26,9% des échantillons de mélanomes mutés *NRAS.* Un phénomène d'amplification de *NRAS* était rare, de même que nous l'avions montré pour *BRAF*. Nous avons montré que les mélanomes mutés *NRAS* avaient une grande hétérogénéité intra-tumorale avec des populations de cellules n'ayant pas le même nombre de chromosomes 1, chromosome porteur du gène *NRAS*. Enfin, cette étude a révélé que le déséquilibre allélique des mélanomes avec une CAM de *NRAS* Q61 élevée était étroitement lié à une perte d'hétérozygotie. Toutefois, nous n'avons pas mis en évidence que la CAM de *NRAS* Q61 était un facteur pronostique des mélanomes mutés *NRAS* Q61. Des études sont nécessaires pour étudier la valeur pronostique de ce biomarqueur au stade métastatique, ainsi que sa valeur prédictive sur la réponse aux thérapies ciblées, dont les inhibiteurs de MEK qui ont montrés des résultats prometteurs (238), mais également de nombreux autres inhibiteurs dont les essais cliniques sont en cours (239).

Mots clés. Déséquilibre allélique, biomarqueur, mélanome muté *NRAS*, perte d'hétérozygotie.

Manuscrit en cours de préparation :

Title

Frequent mutant allelic imbalance in *NRAS* Q61 mutant cutaneous melanomas

Authors
Zofia Hélias-Rodzewicz[1,2], Elisa Funck-Brentano[1,3], Alain Beauchet[4], Nathalie Terrones[1], Ute Zimmermann[1,2], Cristi Marin[1,2], Catherine Le Gall[1,2], Philippe Saiag[1,3], Jean-François Emile[1,2]

Affiliations
[1] Research Unit EA4340, 'Biomarkers in cancerology and in hemato-oncology Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Université Paris-Saclay, Boulogne-Billancourt, France
[2]Department of Pathology, AP-HP Ambroise Paré Hospital, APHP, Boulogne-Billancourt, France
[3]Department of Dermatology, AP-HP, Ambroise Paré Hospital, Boulogne-Billancourt, France
[4] Department of Public Health, AP-HP, Ambroise Paré Hospital, Boulogne-Billancourt

Introduction

Cutaneous melanoma is a highly aggressive and treatment-resistant human cancer. The most frequent genetic alterations in cutaneous melanoma involve genes of the MAPK signaling pathway (100, 102, 386), mainly with activating hot-spot mutations in the V600 codon of *BRAF* and in Q61 codons (less frequently the G12 or G13 codon) of *NRAS*, in 35-50% and 15-25% of cutaneous melanoma, respectively (34, 74). Among *BRAF* mutations, the *BRAF* V600E mutation in exon 15 is predominant (85%) (103, 387), due to a substitution of a valine to a glutamic acid (c.1799 T>A, p.V600E). *BRAF* and *NRAS* mutations are most often mutually exclusive (66, 107, 388).

The discovery of these mutations was the driving force to the development of specific kinase inhibitors. The first targeted therapy showing an improvement of progression-free survival and overall survival in *BRAF* V600-mutated metastatic melanoma patients as compared to dacarbazine was the BRAF inhibitor vemurafenib (218), following by dabrafenib (232). However, most patients had disease progression by the development of acquired resistance, which occurred in a median of 6 to 8 months (218, 232), in most cases by a MAPK pathway reactivation (224, 331). To overcome or delay the development of acquired resistance, and

to improve tolerance, combined targeted therapy with a BRAF inhibitor and a MEK inhibitor have proven their superiority to BRAF inhibitor monotherapy (13, 15, 254).

To date, *NRAS*-mutant metastatic melanoma cannot be treated by targeted therapy, excepted in clinical trials. Recently, the results of NEMO open-label phase 3 study, with 402 patients with advanced unresectable and metastatic cutaneous *NRAS*-mutant melanoma who were previously untreated or had progressed on/after prior immunotherapy were randomized (2:1) to be treated with the MEK inhibitor binimetinib (n = 269) or with dacarbazine (n = 133), have been shown. Binimetinib significantly prolonged progression-free survival (median progression free-survival was 2.8 months *versus* 1.5 months for dacarbazine (HR: 0.62)) and improved overall response rate (15% for binimetinib *versus* 7% for dacarbazine (p = 0.015). Benefit with binimetinib was seen in treatment naïve patients and was better in those who received prior immunotherapy (median progression-free survival 5.5 months for binimetinib versus 1.6 for dacarbazine). No improved overall survival with binimetib was observed; nevertheless, this parameter is more and more difficult to evaluate because of available effective subsequent treatments. Tolerance profile was good (238). Although these results are promising, the use of next generation of MEK inhibitors will most likely be optimized when combined with other targeted therapies, as inhibitors of pan-RAF, EGFR/PI3K/AKT, and CDK4/6, which are currently being evaluated in clinical trials (239) Indeed, activating *NRAS* mutations involve, in addition to activation of the MAPK pathway, activation of the PI3K/AKT pathway. Despite aggressive development of RAS protein inhibitors (franesyl transferase inhibitors FTI), they have not fared well in clinical trials (389).

Targeting RAS active forms is difficult, but research progresses. Recently, a new molecule ARS853, an allele specific inhibitor was identified; it binds to the GDP-bound mutant KRAS G12C protein, preventing the GTP-bound conformation, with as effect to inhibit the mutant KRAS G12C activation, subject to the persistence of a GTPase activity, on MAPK and PI3K/AKT pathways, (243, 244). These studies highlight the possibility of using structural information for the design of new inhibitors of other activated mutant RAS forms and are very promising to provide new effective treatment options for patients with *NRAS* mutant melanoma.

Mutant *NRAS* melanoma are known to have more aggressive pathological features than other subtypes with thicker lesions, elevated mitotic activity, and higher rates of lymph node metastasis (77, 109, 385). *NRAS* mutation status is a predictor of poorer outcomes with lower median overall survival compared to non-*NRAS* mutant melanoma (194, 385). However, no data is available about variations of *NRAS* mutant allelic burden and its prognostic value in *NRAS* mutant melanomas.

In this study, we reported data of molecular analysis by pyrosequencing of *NRAS* mutant allelic burden in 108 *NRAS* Q61 mutant melanomas, from a series of 216 *BRAF* wild-type (WT) melanomas, to evaluate the frequency of mutant *NRAS* allelic imbalance, defined by a mutant allelic burden > 60%, in *NRAS* Q61 mutant melanomas.

The mechanisms of increased mutant-to-normal allele ratio were studied by FISH in 107 melanoma samples and by Amplification Fragment Length Polymorphism (AFLP) in 29 *NRAS* mutant melanoma samples. Finally, we examined the correlation between the presence or absence of a mutant allelic imbalance (between mutant allelic burdens > 60% and ≤ 60%) with pathological features of 74 *NRAS* Q61 mutant primary melanomas, and the prognostic value of the *NRAS* mutant allelic imbalance was evaluated with comparison of survival outcomes of the matching patients. The aims of this study were to provide new insight into the biology of *NRAS* mutant melanoma and to explore *NRAS* mutant allelic imbalance as a potential prognostic biomarker.

Materials and Methods

Patients and samples

Melanoma samples were obtained from the bank of biological resources of Ambroise Paré Hospital in Boulogne-Billancourt. All consecutive non-harboring *BRAF* V600 mutation melanoma samples, with a cellularity of > 80% of tumor cells, received for routine melanoma diagnosis in the period from March 2013 until May 2015 were included in this study. Additionally, all *BRAF* V600 WT melanoma samples (with a cellularity > 80% of tumor cells), for which a previous detection of a *NRAS* Q61 mutation by pyrosequencing was performed earlier this period were included.

Among these samples, cases from patients followed in the department of Dermatology of Ambroise Paré Hospital were included in the analysis of the prognostic value of the *NRAS* mutant allelic imbalance. Histopathological data about primary melanomas, clinical and survival data were collected. In cases of several samples performed by pyrosequencing for the same case of melanoma, the sample with the higher percentage of mutant *NRAS* allele percentage was considered to classify the case in the group with a high *NRAS* mutant allelic burden (> 60%) or in the other group (< 60%). Clinical data were collected retrospectively from the computer medical file for each patient (ORBIS® software), in June 2015.

The research was performed in compliance with the ethical principles of the Helsinki Declaration (1964) and with the French ethics laws. The information about sample exploitation for research purposes was given to patients and no refusal was received. Tumor samples collection was declared to the French Ministry of Research (DC 2009-933). MelanCohort study was approved by CPP IDF 8 Ethics committee (030209) and registered with Clinicaltrials.gov (NCT00839410).

Histological control with hematoxylin & eosin staining was performed on each sample and all diagnoses were confirmed by pathology review, and the percentage of tumor cells was reevaluated. We reported in our recent article showing the variations of *BRAF* mutant allele percentage in melanomas (390) that the interpathologist reproducibility of tumor cells evaluation was substantial for the 80% cut-off; thus we decided to apply the same cut-off in this study. Moreover, this cut-off has the advantage not to underestimate the real percentage of *NRAS* mutant allele by pyrosequencing because of the presence of non-tumor cells, not harboring the *NRAS* mutation, in tumor samples. Before DNA extraction, tissue samples were reviewed to confirm presence of melanoma and to select areas with highest density of tumors cells for macrodissection. Genomic DNA was extracted from paraffin-embedded fragments of melanoma as previously described (391). DNA concentration was controlled with a spectrophotometer (ND-100, Nanodrop®). For loss of heterozygosity (LOH) analysis, DNA from corresponding normal tissue section was extracted.

Detection of NRAS mutation

Pyrosequencing technique has been performed as already described (148). Profiles of different *NRAS* Q61 mutations were established and confirmed by Sanger method (Figure 1).

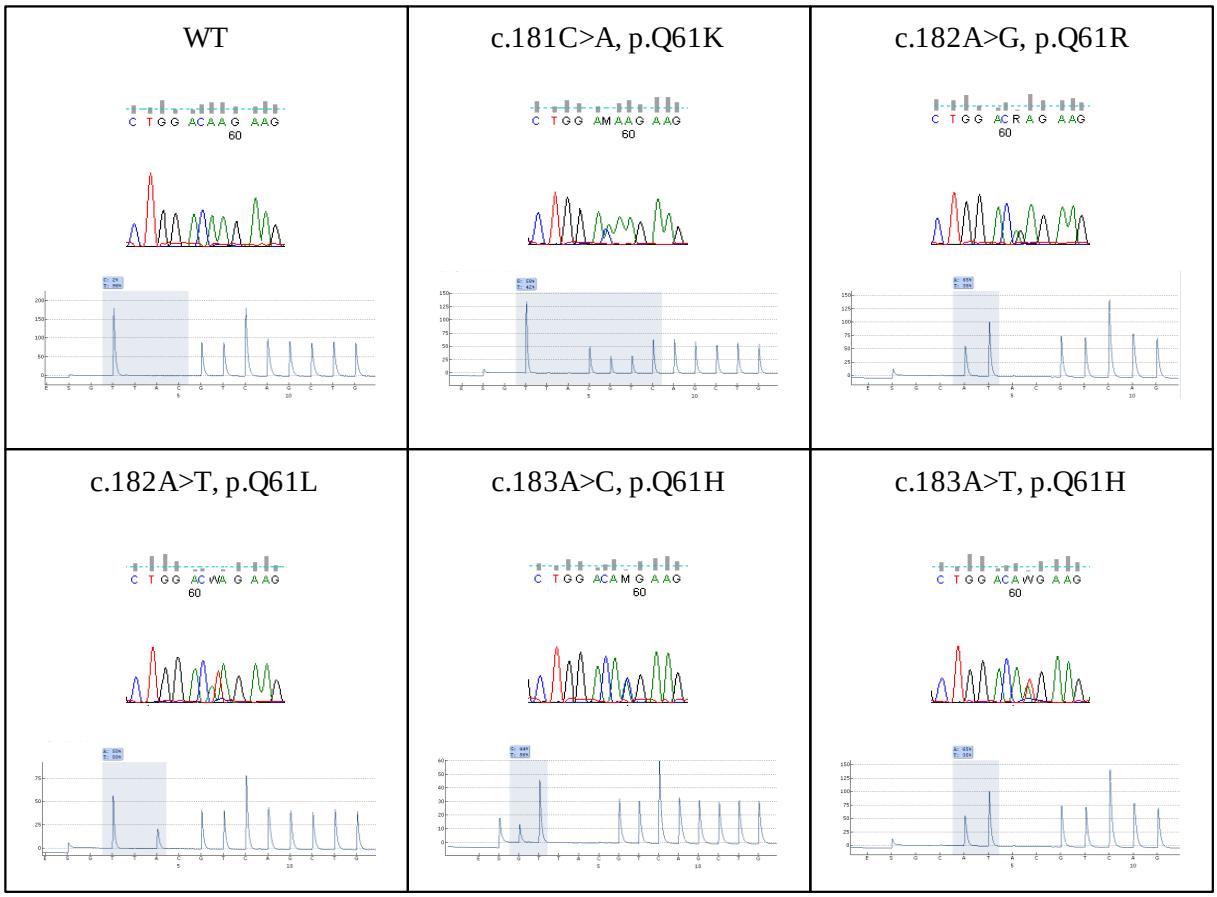


Figure 1. Profiles of different *NRAS* Q61 mutations by Sanger (electropherograms) and pyrosequencing (below).

Three different NRAS assays for *NRAS* were used, primers used for DNA amplification, pyrosequencing, and Sanger methods are summarized in Table 1.

NRAS ASSAY 1	
Primer F-Biotine	ACACCCCCAGGATTCTTACAGA
Primer R	GCCTGTCCTCATGTATTGGTC
Primer sequencing	CATGGCACTGTACTCTTC
Nucleotide indejtion order	GTTACGTCAGCTG
NRAS ASSAY 1 modified	
Nucleotide indejtion order mofified	GCATACGTCAGCT
NRAS ASSAY 2	
Primer F-Biotine	ACAAGTGGTTATAGATGGTGA
Primer R	ATGTATTGGTCTCTCATGGCA
Primer sequencing	CATGGCACTGTACTCTTC
Nucleotide indejtion order	GTTACTCAGTCAGCT

Table 1. Description of primers used in the 3 NRAS assays for DNA amplification, pyrosequencing, and Sanger methods.

Analysis of data from The Cancer Genome Atlas (TCGA)

Sequencing data from 85 *NRAS* Q61 mutant melanoma samples were extracted from cBioPortal plateform (392). The distribution of mutant allelic burden and wild-type allelic burden was evaluated and compared to the data of our series.

FISH analysis

FISH analysis was performed on 100 tissue microarray (TMA) samples and on 7 tissue sections from 107 melanoma samples. FISH technique was performed as already described in Hélias-Rodzewicz *et al.* (390). All samples were analyzed with RP11-245I3 and RP11-269F19 probes covering *NRAS* and a region of chromosome 1 telomeric to *NRAS* gene (chr1:45.142.760-45.303.288, (2009 GRCh37/hg19)). To evaluate the polyploidy level of tumor cells, tumor sections were analyzed with at least one of the following BAC probes: RP11-586A2 (chromosome 4), RP11-121G9 (chromosome 7) or RP11-159C11 (chromosome 12).

LOH analysis

Eight binucleotide microsatellite markers (rs3220698, rs3220987, rs3220389, rs3219653, rs3219703, rs3219612, rs3219599) were selected from the NCBI dbSNP short genetic

variations database. Six microsatellites were localized on the short arm of chromosome 1 (rs3219599, rs3219653, rs3219587, rs3220698, rs3219587, rs3220389); four of them were telomeric to *NRAS* gene and two were centromeric (Figure 4). Two microsatellites were localized on the long arm of chromosome 1. No highly heterozygous microsatellite was identified in *NRAS* gene; however, two microsatellites closed to *NRAS* gene were analyzed. PCR reactions were performed with fluorescent-labeled forward primers and the amplified PCR products were analyzed by capillary array electrophoresis on the ABI PRISM 3100 sequencer (Applied Biosystems) and GeneScan software (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA), using AFLP method. LOH was analyzed as described in Loss of Heterozygosity Analysis Getting Started Guide. Firstly, the ratio between a peak height of allele 1 and a peak height of allele 2 was calculated for tumor and normal DNA for each microsatellite marker. Secondly, allelic imbalance between allele ratio of healthy sample and allele ratio of diseased sample was calculated. A value of the aforementioned factor, less than 0.67 and more than 1.5, was classified as LOH. Presence of only one marker in a tumor sample with a simultaneous detection of two microsatellite makers in normal DNA was interpreted as a complete loss of one allele. For most analyzed markers, two independent experiments were employed to confirm the results presenting LOH. Marker was considered as non-informative if one allele was detected in normal DNA.

Survival curves

OS, defined as the period between the date of the primary melanoma diagnosis to the date of death (all causes) or last follow-up evaluation. Survival was censored at the last follow-up evaluation. DMFS was defined as the period between the date of the primary melanoma diagnosis to the date of onset of stage IV melanoma or death. The date of onset of stage IV melanoma was defined as the date of the clinical examination or imaging procedure that provided an unequivocal diagnosis of distant visceral metastasis. PFS was defined as the period between the date of the primary melanoma diagnosis (with or without lymph node sentinel biopsy procedure) to the date of the first regional (node or cutaneous) recurrence (stage IIIB minimum). Progression-free survival (PFS), distant metastasis-free survival (DMFS) and overall survival (OS) curves were estimated using the Kaplan-Meier method, and differences between PFS, DMFS, and OS curves were assessed using the log-rank test.

Statistical analysis

Student tests were performed for quantitative values, and Chi^2 tests for qualitative values. The results were considered significant when $p < 0.05$.

Results

NRAS mutation detection and mutant allelic burden quantification

Among non-harboring *BRAF* V600 mutation samples (n = 216), from 192 patients, 108 (50%) samples had a *NRAS* Q61 mutation, from 93 patients. Most patients (n = 81/93; 87.1%) had only one sample, and only 12 patients (12.9%) had several samples (2 samples for 10 patients, 3 samples for one, and 4 samples for one). *NRAS* mutant allelic burden was quantified by pyrosequencing of samples from primary melanoma in 19 samples (17.6%), and from metastasis (lymph node, cutaneous or visceral) in 89 samples (82.4%). Mutation in c.182A>G p.Q61R was found in 65 samples (60.2%), c.181C>A p.Q61K in 31 (28.7%), c.182A>T p.Q61L in 7 (6.5%), c.183A>T p.Q61H in 4 (3.7%) and c.183A>C p.Q61H in one (0.9%). However, the *NRAS* mutant allelic burden was highly heterogeneous, ranging from 17 to 92% (median: 46.5%). The majority of samples had 30 to 60% of mutant *NRAS* and was considered as heterozygous (n = 66/108, 66.1%). The remaining 42 mutant *NRAS* samples were considered as non-heterozygous for *NRAS* mutation: 13 cases (12 %) had a mutant *NRAS* burden ≤ 30% (but higher than WT samples, defined by a *NRAS* allelic burden ≤ 10%) and 29 (26.9 %) had a mutant *NRAS* burden > 60%, defining the mutant allelic imbalance (Figure 2).

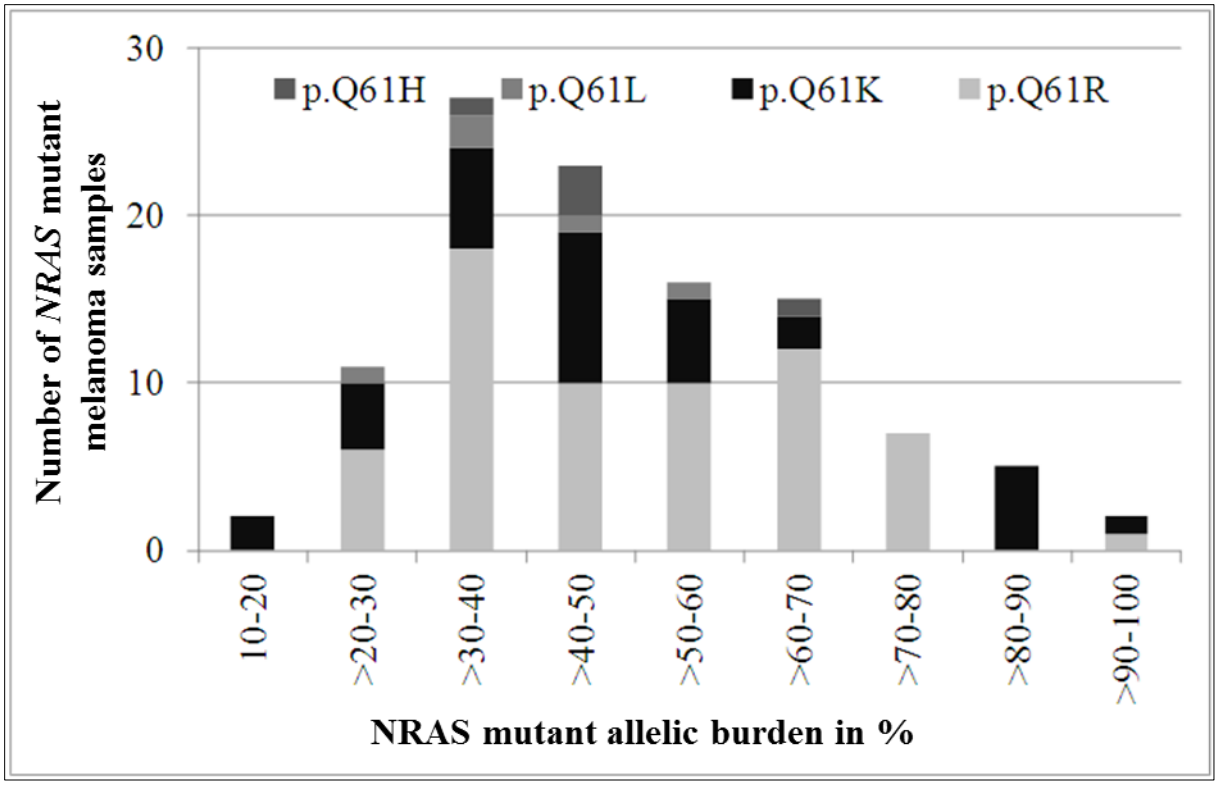


Figure 2. Variations in the *NRAS* Q61 mutant allelic burden, in percentage (%), in *NRAS* mutant melanoma samples.

Histogram representation of the NRAS Q61 mutant allelic burden in 108 NRAS mutant melanoma samples obtained by pyrosequencing. The number of each different types of NRAS mutation in the codon 61 is represented by color bars (various gray to black).

FISH analysis

In order to enlighten mechanisms leading to *NRAS* mutant allelic burden variations, we analyzed copy number of *NRAS* gene (RP11-245I3) and chromosome 1 (RP11-269F19). This analysis was reinforced by the assessment of copy number of one of the following chromosomes: 4 (RP11-586A2), 7 (RP11-121G9) or 12 (RP11-159C11). Among 107 samples analyzed, different types of *NRAS*/chromosome 1 alterations were observed: no alteration (disomy), disomy but rare cells with polysomy, polysomy and monosomy, which were respectively detected in 26 (24.3%), 20 (18.7%), 14 (13.1%) and 4 (3.7%) samples. *NRAS* locus was amplified in 4 (3.7%) samples. FISH results were unsatisfactory for 12 (11.2 %) samples. In 27 (25.2 %) samples, we observed high intratumor copy number variations of *NRAS*/chromosome 1. Chromosome number assessed by the analysis of other chromosomes (4, 7 and 12) was highly correlated with FISH signals observed for chromosome 1.

In order to better understand the chromosomal mechanisms leading to mutant allelic burden enrichment, we compared mutant allelic burdens and *NRAS*/chromosome 1 copy number changes in *NRAS* WT and *NRAS* Q61 mutant melanoma samples. Disomy of *NRAS*/chromosome 1 - or only few cells with polysomy - were detected in 54.5% (n = 18/33) of *NRAS* WT samples, in 51.5% (n = 17/33) of *NRAS* heterozygous, and in only 30.4% (n = 7/23) of high *NRAS* mutant allelic burden samples; however, the difference has not reached the statistical significance. Polysomy of *NRAS*/chromosome 1 was detected in 6.1% (n = 2/33), 15.2% (n = 5/33) and 26.1% (n = 6/23) of *NRAS* WT, heterozygous and high mutant allelic burden samples, respectively. Amplification of *NRAS* was detected in a small proportion of *NRAS* WT and high mutant allelic burden samples, in 6.1% (n = 2/33) and 8.7% (n = 2/23) of samples respectively. Deletion of *NRAS* was also a rare event and was observed in *NRAS* WT (9.1% n = 3/33) and heterozygous *NRAS* (3% n = 1/33) melanoma samples. In all three groups, a high intratumor copy number variation of *NRAS*/chromosome 1 was observed: WT, 24.2% (n = 8/33), *NRAS* heterozygous, 30.3% (n = 10/33), high *NRAS* mutant allelic burden samples, 34.8% (n = 8/23). FISH results from low *NRAS* mutant allelic burden group were excluded from the comparative analysis because of insufficient numbers of samples (only 6 samples) (Figure 3).

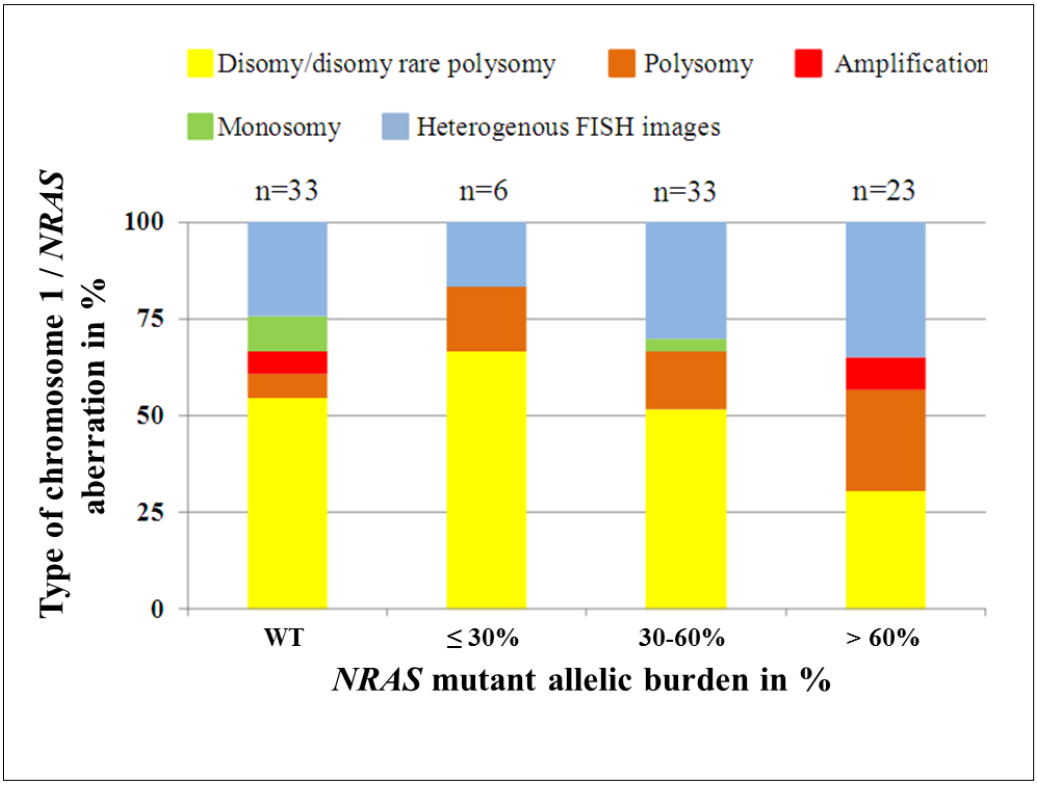


Figure 3. Frequencies in percentage (%) of chromosome 1 aberrations in *NRAS* mutant melanoma (n = 62) and *NRAS* wild-type (WT) (n = 33) melanoma groups.
Histogram representation of prevalence of chromosome 1 abnormalities evaluated by FISH in 107 melanoma samples depending on the NRAS mutant allelic burden, in percentage (%).

LOH analysis

Eight short tandem repeat (microsatellite) markers from dbSNP short genetic variation database were analyzed in 29 melanoma samples: 6 samples were *NRAS* heterozygous (38 to 47%) and 23 had a high *NRAS* mutant allelic burden (62 to 92%) (Figure 2). In all *NRAS* heterozygous samples, two *NRAS* alleles were detected, including only one case with a low LOH level (near the upper positive threshold of LOH). In the majority of samples (n = 16/22; 72.7%) with a high *NRAS* mutant allelic burden, microsatellite analysis revealed the presence of only one marker in the region surrounding *NRAS* gene. Only one sample was not analyzable because of poor DNA quality and of non-interpretable markers (Figure 4).

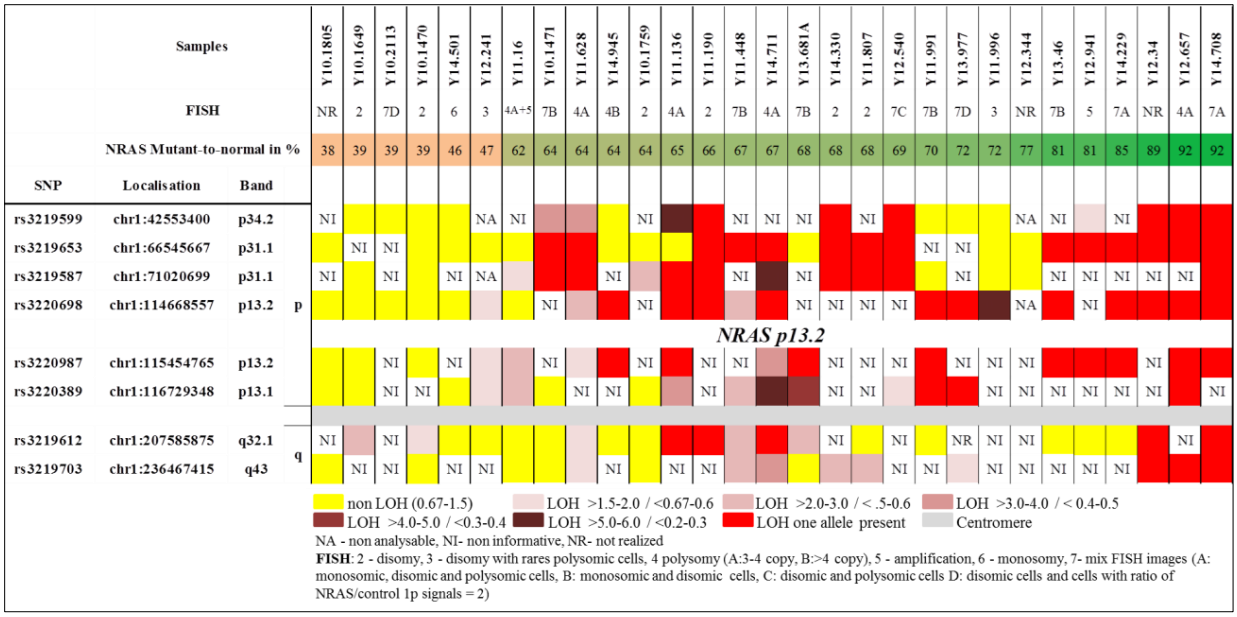


Figure 4. Microsatellite analysis of chromosome 1.
Chromosome 1 graphic representation, with results of the analysis of 8 binucleotide microsatellite markers (rs3220698, rs3220987, rs3220389, rs3219653, rs3219703, rs3219612, rs3219599) selected from the NCBI dbSNP short genetic variations database. Six microsatellites were localized on the short arm (p) of chromosome 1 (rs3219599, rs3219653, rs3219587, rs3220698, rs3219587, rs3220389); four of them were telomeric to NRAS gene and two were centromeric. Results of the LOH analysis are described in the legend. A total of 29 melanoma samples were analyzed: 6 with a heterozygous NRAS mutant allelic burden (38 to 47%) and 23 with a high mutant allelic burden (62 to 92%). Data of FISH analysis realized in each sample are mentioned.

Prognostic value analysis of the NRAS mutant allelic imbalance

Among all analyzed *NRAS* mutant melanoma samples (n = 108), clinical data of 74 patients (32 females), and histological data of their primary melanoma were available and analyzed.

The two main histological subtypes of these *NRAS* mutant primary melanomas were superficial spreading melanoma in 34 (45.9%) cases and nodular melanoma in 28 (37.8%) cases. Median Breslow was 2.75 mm [0.4-10], and 34 (45.6%) had an ulceration and 43 (58.1%) had a mitotic activity (> 1 mitosis / mm^2).

Among these 74 cases, we found 47 (63.5%) *NRAS* Q61R mutations, 19 (25.7%) *NRAS* Q61K, 5 (6.8%) *NRAS* Q61L and 3 (4%) *NRAS* Q61H. *NRAS* mutant allelic burden was quantified by pyrosequencing of samples from primary melanoma in 13 (17.6%) cases, from metastasis (lymph node, cutaneous or visceral) in 61 (82.4%) cases. A high *NRAS* mutant allelic burden (> 60%) was found in 35% (n = 26) of the cases included in this clinical analysis, and a *NRAS*

mutant allelic burden ≤ 60% was found in 65% of cases (n = 48), with a median CAM of 39.5% [23 - 60], including 7 cases with ≤ 30% (median CAM of 24% [23 - 30]). We compared clinical and pathological features of primary *NRAS* mutant melanomas, between these two groups (> 60% *versus* ≤ 60% of mutant allelic burden); these data are summarized in Table 2. No statistically significantly differences were observed between these two groups with baseline criteria ($p > 0.05$; Table 2).

Data of patient survival outcomes were retrospectively collected, with a median follow-up of 40 months [1-445]. PFS, DMFS and OS curves were similar in both groups (Figure 5).

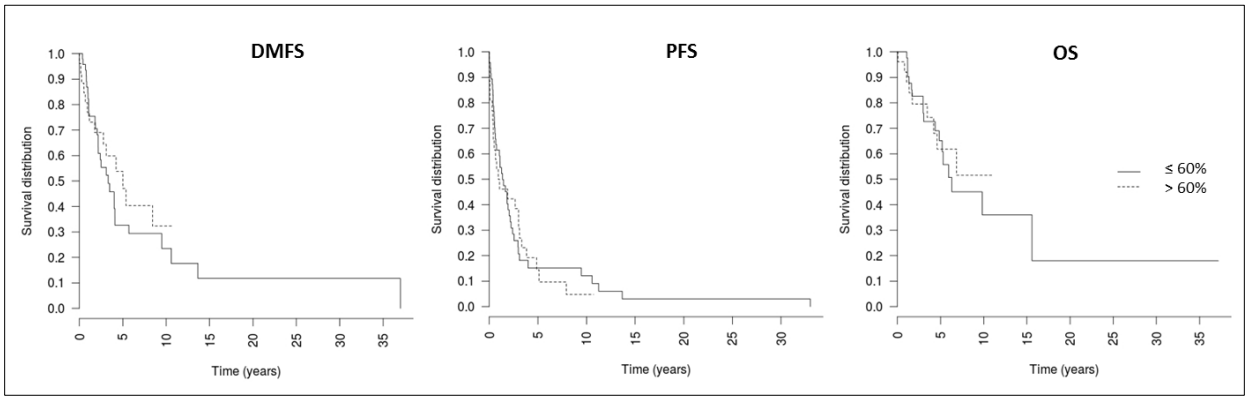


Figure 5. Kaplan-Meir survival curves of DMFS, PFS and OS of two distinct groups of *NRAS* mutant melanoma patients, according to the *NRAS* mutant allelic burden (> 60% or ≤ 60%).

	***NRAS* mutant allelic burden > 60% N = 26/74 (35.1%)**	***NRAS* mutant allelic burden ≤ 60% N = 48/74 (64.8%)**	***p*-value (statistic test)**
Origin of pyrosequencing sample			
From primary melanoma	4	9	0.97 (Chi^2 with Yates' correction)
From metastasis	22	39	
Age			
Mean, years (SD)	63.0 ± 16.9	65.1 ± 15.3	0.59 (Student)
Median, year [range]	60 [37-93]	66 [32-97]	
Gender			
Ratio H/F	14/12	29/19	0.58 (Chi^2)
Breslow index			
Mean, mm (SD)	2.96 ± 1.96	3.26 ± 2.21	0.64 (Student)
Median, mm [range]	2.90 [0.40-10.00]	2,50 [0.50-9.00]	
Ulceration	15	19	0.14 (Chi^2)
Mitotic activity	13	30	0.30 (Chi^2)
Initial AJCC stage			
I	**5**	**11**	**0.71** (Chi^2)
IA	4	2	
IB	1	9	
II	**12**	**25**	**0.63** (Chi^2)
IIA	4	10	
IIB	7	4	
IIC	1	11	
III	**8**	**9**	**0.24** (Chi^2)
IIIA	0	2	
IIIB	4	2	
IIIC	4	5	
IV	**1**	**0**	
NA	0	2	
Histologic subtype			
Nodular melanoma	10	18	0.9
SSM	11	23	0.64
Acral melanoma	1	0	
Lentigo maligna melanoma	0	1	
Mucosal melanoma	0	1	
On congenital nevus	0	1	
Inclassable	1	2	
NA	3	2	

Table 2. Comparison of clinical and histoprognostic features of *NRAS* mutant primary melanomas according to the *NRAS* mutant allelic burden (> 60% or ≤ 60%).
Data are number. SSM: Superficial spreading melanoma. NA: data not available

Discussion

In this study, we report, for the first time, in a large series from human cutaneous melanoma samples, non-harboring *BRAF* V600 mutations, variations of mutant allelic burden in *NRAS* Q61 mutant melanomas, by a quantitative pyrosequencing method. We have demonstrated, in a previous study, that pyrosequencing is a robust molecular technique for oncogene allelic quantification (390).

This study did not aim to estimate the frequency of mutant NRAS melanomas from non-mutated BRAF V600 melanomas. Indeed, additional samples known to be *NRAS* mutant into the series of non-mutated melanoma *BRAF* V600 melanoma samples overestimated this frequency of 50%. However, knowing that, in the literature, frequencies of *BRAF* and *NRAS* hot-spots mutations are 35 to 50% and 15-20% respectively, and that these mutations are most often mutually exclusive, the frequency of *NRAS* mutant melanomas from non-mutated *BRAF* melanomas could be calculated around 40%.

NRAS assays were developed to identify all hot-spot mutations in the codon 61 of *NRAS* gene. The specificity of these assays for different mutations was confirmed by Sanger sequencing. By this approach, we have demonstrated that the ratio between the percentage of *NRAS* mutant alleles to the percentage of *NRAS* wild-type alleles is highly heterogeneous in *NRAS* Q61 mutant melanoma samples analyzed and that a *NRAS* mutant allelic imbalance, defined by a high *NRAS* Q61 mutant allelic burden (> 60% of mutant allele), is frequent in *NRAS* Q61 mutant melanoma samples (26.9%). We observed that only two third of samples (66.1%) had a heterozygous *NRAS* Q61 mutant allele burden (defined by a percentage of mutant alleles between 30% and 60%), and 12% had a low *NRAS* Q61 mutant allele burden (< 30%). We confirmed our results with human cutaneous melanoma data obtained from TCGA and analyzed by the CBioPortal platform, only 50.6% (n = 43/85) of cases had a heterozygous status of *NRAS* mutation and low and high *NRAS* mutant allelic burden were observed in 15.3% and 34.1% of cases, respectively. Similarly to our herein study, we have previously shown that *BRAF* V600E mutant allelic burden is heterogeneous in *BRAF* V600E human cutaneous melanomas, with 19% of melanoma samples harboring a mutant allelic imbalance. These two studies highlight that the variations of mutant allelic burden are common events for oncogenes.

Few studies have investigated *NRAS* allelic burden in melanoma. Recently, we reported two cases (which are included in this study) with increased *NRAS* mutant allele percentage during metastatic melanoma progression; these observations highlight hypothesis of clone selection with high mutant allelic burden during the progression of the metastatic disease, and of the possibility of an additional addiction oncogenic effect. Interestingly, *in vitro* studies of other mutant RAS family members had demonstrated a high oncogenic potential of increased mutant allele burden. The oncogenic potential of $NRAS^{G12D/G12D}$ was highly increased as compared to heterozygous or hemizygous *NRAS* cells in *NRAS*-driven hematopoietic transformation (393). Additionally, progenitors of hematopoietic cells expressing the highest levels of $NRAS^{G12D}$ demonstrated cytokine-independent CFU-GM colony growth and exhibited an increased level of pAkt, pErk and pS6 proteins. Endogenous expression of $HRAS^{G12V}$ promotes papilloma and angiosarcoma development and these neoplasms initiation have been strongly associated with $HRAS^{G12V}$ allelic and gene copy number imbalances (394, 395). *NRAS* homozygous mutation and wild-type *NRAS* allele loss through mitotic recombination has been described in a patient with juvenile myelomonocytic leukemia with aggressive disease progression (396).

Mutation in one allele of an oncogene is sufficient for activation of its targets and the mutant-to-WT allelic burden ratio is expected to be around 50%. However, in tumors with high chromosome instability, chromosome number is rarely disomic and the percentage of mutant allele could widely exceed 50%. In this study, FISH analyses with two BAC probes covering *NRAS* region and another region of chromosome 1, telomeric to this gene, were performed to better understand the chromosome mechanisms leading to *NRAS* mutant allele increase in the proportion of *NRAS* mutant melanoma. Different types of *NRAS*/chromosome 1 status were observed; however, no significant differences were detected between groups. Moreover, amplification and deletion of *NRAS* gene were rarely observed. Genomic analysis of human cutaneous melanoma genomes were described in several studies. However, in most of them, only melanoma cell lines were studied. The analysis of 60 melanoma cell lines by Gast *et al.* (397) revealed targeted focal amplifications of *NRAS* genes (n = 7/60; 11.7%) and amplifications were detected in both *NRAS* mutant and *NRAS* WT melanomas. This frequency is higher that the frequency of *NRAS* amplification detected in our group. However, other reports were concordant with our observations. In

melanomas, *NRAS* amplification was found to be restricted to a few cases with *NRAS* mutations. Additionally, Stark *et al.* reported rare instances of focal amplification including *NRAS* gene in three cell lines with *NRAS* mutation; however, a poor correlation between copy number increase and concomitant mutation in this oncogene was described (398). Polysomy of chromosome 1 and intratumor *NRAS*/chromosome 1 heterozygosity were frequently found in our series. Correlation between mutant allelic burden and gene copy number gains has already been described for *KRAS* (399) and *BRAF* genes (390). To our knowledge, *NRAS*/chromosome 1 copy number variations have never been described in melanomas with regard to the *NRAS* mutant allelic burden.

As expected, LOH has been mostly restricted to the non-heterozygous *NRAS* mutant group. The high *NRAS* mutant allelic burden was strongly correlated with the presence of only one allele (72.7% of cases) or with the significant loss of the second allele. Indeed, the loss (or reduction) of the WT allele in *NRAS* mutant tumors increased the level of mutant *NRAS* alleles. Unlike haematological malignancies (400, 401), acquired copy-neutral LOH is not a predominant mechanism of mutant allelic imbalance in *NRAS* Q61 melanoma; this aberration was detected in only 23% of samples. Other mechanisms of high mutant allelic burden were amplification and gain of *NRAS* gene (14%), polysomy of chromosome 1 (23.8%) and in 38.1% of cases, tumor samples had an intratumor copy number variation of *NRAS*/chromosome 1. Since most melanomas have variations of chromosome numbers and chromosome segment copy numbers, *NRAS* mutant allelic increase could be a consequence of chromosome instability.

Since this study showed, for the first time, that *NRAS* mutant allelic imbalance is frequent in *NRAS* Q61 mutant melanoma, we thus investigated the prognostic value of this new potential biomarker. We showed that the high *NRAS* mutant allelic burden is not influenced by sex, age, histological melanoma subtypes, nor histoprognostic factors of primary *NRAS* Q61 mutant melanomas. Moreover, in this two *NRAS* mutant groups (with or without a high *NRAS* mutant burden), which have similar clinical and histoprognostic features, no differences in patient survival outcomes (with or without a high *NRAS* mutant burden) were observed. Thus, we can conclude from these analyzes that the *NRAS* mutant allelic imbalance does not seem to be a prognostic biomarker. However, there is a possible selection bias in this study, because for each case, the sample including into the analysis

were the one with the higher mutant allelic burden. There was nevertheless no difference of frequencies between primary and metastasis origin of theses samples in both groups (Table 3). This study had all bias of retrospective studies, and analyses were limited by small number of patients and should be improved with a larger group of patients. Furthermore, this biomarker has to be investigated as a biomarker of response to targeted therapy, currently used on clinical trials in *NRAS* Q61 mutant melanoma. We hypothesize that the high mutant allelic burden could have an oncogenic addiction effect, which could improve the sensitivity of targeted therapy in this subgroup of *NRAS* mutant melanoma, including more than 1 in 4 of *NRAS* mutant melanomas. Further studies are needed to evaluate the prognostic impact of oncogenes mutant allelic imbalance in the biology of cancer and to determinate whether the variation of mutant allelic burden could be a potential predictive biomarker of response to targeted therapy.

Discussion de la partie I

Ces études sur la CAM des oncogènes *BRAF* et *NRAS* ont permis de montrer qu'un déséquilibre allélique en faveur d'un excès d'allèles mutés n'est pas un événement rare puisque nous l'avons observé dans 19% des mélanomes mutés *BRAF* V600E et dans 26,9% des mélanomes *NRAS* Q61. De plus, il semblerait que ce déséquilibre soit la conséquence d'une instabilité chromosomique. Nous émettons l'hypothèse que le déséquilibre allélique oncogénique, que l'on a défini par une CAM > 60%, puisse être le signe d'une sélection de clones tumoraux, instables sur le plan chromosomique, marquant une étape dans la progression du mélanome métastatique et suggérant des programmes génomiques spécifiques dans le développement du mélanome, tel que cela l'a été proposé par Jönsson *et al.* suite à une étude d'hybridation génomique comparative (CGH) sur différentes lignées de mélanome (402).

Nous avons montré que les principaux mécanismes de cette instabilité chromosomique diffèrent pour *BRAF* et *NRAS*, un gain du nombre du copies du gène *BRAF* par polysomie du chromosome 7 étant plus fréquemment associée à une CAM de *BRAF* V600E élevée, et une perte d'hétérozygotie par perte de l'allèle sauvage de *NRAS*, situé sur le chromosome 1, plus souvent associée à une CAM de *NRAS* Q61 élevée. Nous supposons que ces mécanismes, aboutissant tous deux à une CAM des oncogènes augmentée, puissent influencer le pronostic des cancers (372). Il y a plus de 25 ans, une étude avait montré que des aberrations du chromosome 7 étaient significativement associées à une survie plus courte des mélanomes (403). D'autres gènes que *BRAF* sont présents sur le chromosome 7, tel que *EGFR*, dont plusieurs études ont montré que des altérations du nombre de copies de ce gène étaient associées à un moins bon pronostic des mélanomes, indépendamment de tout traitement (404, 405). La perte d'hétérozygotie avec perte de l'allèle sauvage est un mécanisme plus souvent décrit pour les gènes suppresseurs de tumeurs, notamment dans le mélanome *CDKN2A*, sur le chromosome 9, et *PTEN* sur le chromosome 10 (398). De plus, ce mécanisme de perte allélique, notamment sur le chromosome 1, a été rapporté comme pouvant être associé au pronostic de certains cancers, dans les gliomes (406), les neuroblastomes (407) ou encore dans les cancers du sein (408).

Nous supposons que le déséquilibre allélique que nous observons, dont nous avons montré pour *BRAF* qu'il était également retrouvé au niveau de l'ARN messager, serait à l'origine d'une hyper-activation des voies oncogéniques d'aval (la voie MAPK pour *BRAF* et à la fois la voie MAPK et la voie PI3K/AKT pour *NRAS*) ; ainsi, ces clones développeraient une addiction envers ce mécanisme oncogénique d'hyper-activation. Une telle addiction pourrait alors améliorer la sensibilité des thérapies ayant pour cibles des acteurs des voies activées ; en effet, en cas d'addiction oncogénique, les cellules tumorales ne peuvent survivre si le mécanisme oncogénique est inhibé. En outre, bien que les oncogènes favorisent les signaux de prolifération et de survie cellulaires, ils activent également des signaux d'apoptose ou d'arrêt du cycle cellulaire (concept connu sous le nom de « choc oncogénique ») (409, 410) ; cela peut être un mécanisme de régulation normale des voies de survie cellulaire et/ou en rapport avec le stress induit par des taux de croissance cellulaires élevés de la même façon qu'il a été montré que *BRAF* induisait une sénescence dans les nævus (411) ; quoiqu'il en soit, l'inhibition d'un oncogène pilote va inhiber à la fois les signaux de croissance et de survie cellulaire et les signaux pro-apoptotiques et d'arrêt du cycle cellulaire. Toutefois, dans des cellules ayant développé une addiction à l'oncogène (ou au mécanisme oncogénique comme nous le supposons ici), la perte brusque du signal de survie détruit les cellules avant la perte du signal apoptotique.

Une autre hypothèse serait que le déséquilibre allélique, notamment pour *BRAF* V600E, soit associé à un profil génétique qui ne développe pas de mécanisme de résistance. En effet, une étude récente ayant séquencé par NGS 10 mélanomes de patients traités par inhibiteurs de BRAF et/ou de MEK, a retrouvé que 2 patients sur 3 ayant eu une réponse complète prolongée (supérieure à 28 mois) n'avaient qu'une mutation de *BRAF* sans autre anomalie génétique, suggérant qu'un sous-groupe de patients peut ne pas développer de mécanismes de résistance et ainsi avoir des réponses prolongées au traitement (412).

Dans le mélanome, la CAM des oncogènes a peu été étudiée, alors qu'elle est mesurée en routine par les techniques de pyroséquençage, et qu'elle devrait figurer dans le compte-rendu de biologie moléculaire. De plus, elle peut être quantifiée de façon encore plus précise par les techniques de NGS, qui sont de plus en plus utilisées. Nos études ont apporté des premiers éléments, et bien que d'autres études soient encore nécessaires, elles ouvrent la voie à une thématique peu explorée, qui pourrait aboutir, si notre hypothèse est confirmée,

à ce que la CAM des oncogènes *BRAF* et *NRAS* devienne un biomarqueur de réponse aux thérapies ciblées, et ainsi participer à l'optimisation de la prise en charge thérapeutique des patients atteints de mélanomes cutanés métastatiques.

PARTIE 2 - LA CONCENTRATION PLASMATIQUE DU VEMURAFENIB : UN INDICATEUR DE PROGRESSION ?

1. **Article 4 : A LC/MS/MS micro-method for human plasma quantification of vemurafenib. Application to treated melanoma patients, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014**

Afin d'étudier la CPV comme marqueur pharmacologique, nous avons dans un premier temps mis au point la technique de dosage de la CPV, grâce à l'expertise du Pr Jean-Claude Alverez et de son équipe (Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP, 104 Boulevard R. Poincaré, 92380 Garches, Université Versailles Saint-Quentin), afin d'obtenir une technique rapide, simple, et sensible (peu de quantité de plasma par échantillon).

Résumé de l'article, A LC/MS/MS micro-method for human plasma quantification of vemurafenib. Application to treated melanoma patients, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014

Comme cela l'a été précédemment montré avec l'imatinib, la mesure de la CPV lors du suivi des patients, doit être importante pour mesurer l'efficacité du traitement chez les patients atteints de mélanome. Une micro-méthode basée sur la chromatographie liquide (LC) couplée à une triple détection par spectrométrie quadripolaire (MS/MS) en utilisant seulement 10 µL de plasma a été validée. Une précipitation simple des protéines avec de l'eau et de l'acétonitrile a été utilisée après l'ajout du vemurafenib-$^{13}C_6$ comme étalon interne. Les transitions d'ions utilisées pour vérifier les analyses étaient *m/z* 490.2 → *m/z* 255.2 et *m/z* 383.3 for vemurafenib et *m/z* 496.2 → *m/z* 261.2 et *m/z* 389.3 pour le vemurafenib-$^{13}C_6$. Les courbes d'étalonnage étaient linéaires entre 0,1 - 100 µg/mL, les limites de détection et de quantification étant de 0,01 µg/mL et de 0,1 µg/mL, respectivement. La précision intra- et inter-essai évaluée à 0,1, 0,3, 15, 45 et 80 µg/mL était inférieure à 13,3%, avec une justesse comprise entre 93,7 et 105,8%. Aucun effet lié à la matrice utilisée n'a été observé. A l'état d'équilibre, les résultats des dosages des CPV chez 26 patients recevant une dose de 960 mg X2 par jour (n = 60 échantillons), chez 13 patients recevant une dose de 740 mg X2 par jour (n = 3) et 1 patients recevant une dose de 1200 mg X2 par jour (n = 3) montraient une grande variabilité pharmacocinétique de ce composé. Les CPV résiduelles (juste avant une prise, ou C_{min}) et les CPV au pic (juste après une prise, ou C_{max}) étaient similaires, le moment du prélèvement de l'échantillon plasmatique par rapport à l'intervalle entre deux prises n'a donc pas d'influence sur la CPV.

Conclusion. Nous avons développé une méthode simple de chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) et ionisation par électrospray permettant une quantification sensible de la CPV, en utilisant un échantillon de plasma très faible. Nos données sur les patients traités ont montré une très grande variabilité de la pharmacocinétique du vemurafenib, suggérant l'intérêt de suivre les CPV afin de déterminer une relation possible entre la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de ce traitement.

Mots clés. Vemurafenib, plasma, LC–MS/MS, pharmacocinétique, mélanome.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 97 (2014) 29–32

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba

Short communication

A LC/MS/MS micro-method for human plasma quantification of vemurafenib. Application to treated melanoma patients

Jean-Claude Alvarez[a,*], Elisa Funck-Brentano[b], Emuri Abe[a], Isabelle Etting[a], Philippe Saiag[b], Adeline Knapp[a]

[a] Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP, 104 Boulevard R. Poincaré, 92380 Garches et Université Versailles Saint-Quentin, France

[b] Service de dermatologie, Centre Hospitalier Universitaire Ambroise Paré, AP-HP, 9 Avenue Charles de Gaulle, 92104 Boulogne-Billancourt et Université Versailles Saint-Quentin, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 March 2014
Received in revised form 7 April 2014
Accepted 10 April 2014
Available online 18 April 2014

Keywords:
Vemurafenib
Plasma
LC–MS/MS
Pharmacokinetic
Melanoma

ABSTRACT

As previously shown for imatinib, therapeutic drug monitoring (TDM) of vemurafenib should be important to measure efficacy of the treatment in melanoma patient. A micro-method based on liquid chromatography coupled to triple quadrupole spectrometry detection using only 10 μL of plasma was validated. A simple protein precipitation with water/acetonitrile was used after addition of vemurafenib-$^{13}C_6$ as internal standard. The ion transitions used to monitor analytes were m/z 490.2 → m/z 255.2 and m/z 383.3 for vemurafenib and m/z 496.2 → m/z 261.2 and m/z 389.3 for vemurafenib-$^{13}C_6$. Calibration curves were linear in the 0.1–100 μg/mL range, the limits of detection and quantification being 0.01 μg/mL and 0.1 μg/mL, respectively. The intra- and inter-assay precisions evaluated at 0.1, 0.3, 15, 45 and 80 μg/mL were lower than 13.3% and the accuracies were in the 93.7–105.8 range. No matrix effect was observed. At steady state, the results of TDM of vemurafenib in 26 patients treated by 960 mg twice daily (n = 60 samples), 13 patients with 740 mg twice daily (n = 13) and one with 1200 mg twice daily (n = 3) showed a great variability of the pharmacokinetics of this compound.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Malignant melanoma is the most aggressive type of skin cancer. Somatic mutations in the BRAF gene was shown to be present in 66% of melanoma cell lines [1]. Vemurafenib is the first selective and orally bioavailable inhibitor of the protein kinase BRAF encoded by the V600E mutated BRAF gene [2]. It represents now a new standard of care in patients suffering from such advanced melanoma [3,4]. TDM of similar compounds like imatinib has shown a great interest in chronic myeloid leukaemia treatment [5,6]. Few were known about pharmacokinetics of vemurafenib. In one study, at the recommended dose of 960 mg twice daily, the mean maximum concentration was 42.1 ± 15.7 μg/mL at steady state after 15 days of treatment [2]. The mean half-life was long, approximately 50 h (between 30 and 80 h). Another study [7] reported mean vemurafenib C_{min} = 40.6 ± 16.9 μg/mL in 19 patients treated with the recommended dose of 960 mg bid in 52 samples. TDM of vemurafenib could be very useful since it is a substrate but also an inducer of some cytochromes [8]. To our knowledge, only three methods have been described to determine vemurafenib in plasma. A high performance liquid chromatography (LC)–UV method was described for simultaneous quantification of vemurafenib and erlotinib in 200-μL sample [7]. A second method was a LC coupled to tandem mass spectrometry detection (LC/MS/MS), more sensitive and more helpful than the UV method, validated in 50-μL of human plasma but with an application in mouse plasma [9]. These two methods used sorafenib as internal standard, another inhibitor of several tyrosine protein kinases that could be associated in cancer patients treated with vemurafenib. More recently, the same team has developed a new LC/MS/MS method applicated to human plasma [10], using for the first time a labelled internal standard of vemurafenib, vemurafenib-$^{13}C_6$. In this method, vemurafenib was isolated from 50 μL-plasma samples by liquid–liquid extraction. We have developed here a LC/MS/MS micro-method validated in 10-μL of human sample after a simple precipitation using vemurafenib-$^{13}C_6$ as internal standard. This method was applied to the TDM of 26 patients treated with the recommended dose of 960 mg twice daily (n = 60 samples, 49 at C_{min} and 11 at C_{max}), 13 patients with the dose of 740 mg twice daily (n = 13) and one patient with the dose of 1200 mg twice daily (n = 3).

* Corresponding author at: Laboratoire de Pharmacologie – Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire Raymond Poincaré, AP-HP, 104 Boulevard R. Poincaré, 92380 Garches, France. Tel.: +33 1 47 10 79 38; fax: +33 1 47 10 79 23.
E-mail address: jean-claude.alvarez@rpc.aphp.fr (J.-C. Alvarez).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.014
0731-7085/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Materials and methods

Vemurafenib was obtained from Euromedex (Souffelweyersheim, France) and vemurafenib-$^{13}C_6$ from Alsachim (Illkirch, France). HPLC-grade methanol, acetonitrile, dimethylsulfoxid (DMSO) and formic acid were obtained from Sigma-Aldrich (Paris, France). Ultra-pure water (18 MΩ) was obtained by ultrafiltration using a Direct-Q UV3 apparatus (Millipore Corp., Molsheim, France).

Stock solutions of vemurafenib and internal standard (IS) (each 1 mg/mL) were prepared in DMSO. Working solutions of vemurafenib for calibration standards (CS) were prepared at four concentrations (100, 10, 1 and 0.1 μg/mL) by dilution in methanol of the stock solution. Working solution of vemurafenib for quality control (QC) was prepared from another 1 mg/mL stock solution. Working solution of IS (10 μg/mL) was obtained by dilution in methanol of stock solution. Calibration curves were prepared by spiking drug-free plasma (10-μL) with appropriate volumes of the previously mentioned working solutions in order to produce the CS equivalent to 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 75.0 and 100.0 μg/mL. QC samples were also prepared in drug-free plasma at concentrations of 0.1 (limit of quantification evaluation), 0.3, 15.0, 45.0 and 80.0 μg/mL. Drug-free human plasma samples were obtained from Etablissement Français du Sang, (Le Chesnay, France). All stock solutions, working solutions and QCs samples were stored at −20 °C.

To exactly 10 μL of plasma (CS, QC or patient samples) were added 10 μL of internal standard (10 μg/mL) and 1 mL of water–acetonitrile (H_2O/ACN, 1/3, v/v). After mixing and centrifugation 5 min at 10,000 rpm at room temperature, 10 μL of supernatant were injected into the liquid chromatography (LC) system connected to the mass spectrometer.

Chromatography was performed on Accela (ThermoFischer, Les Ulis, France) pump and separation was performed on a Hypersil Gold aQ (polar endcapped) column (ThermoFischer, 1.9 μm, 100 mm × 2.1 mm) maintained at 40 °C and protected by a corresponding drop-in guard pre-column (10 mm × 2.1 mm). Elution was in mode isocratic with a mobile phase composed by a mixture of 0.1% formic acid in water and methanol (30/70, v/v) pumped at 0.5 mL/min. The total run time for an analysis was 4 min. Analysis was performed on a LCQ TSQ™ Vantage triple–quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source set in positive mode. An ion-spray voltage of +3.5 kV was applied. The heated capillary temperature was set at 350 °C. Nitrogen was employed as sheath and auxiliary gas at a pressure of 40 and 20 arbitrary units, respectively. The argon gas collision-induced dissociation was used with a pressure of 1.5 mTorr. Data were collected in selected reaction monitoring (SRM) mode, with two m/z transitions for each compound. Vemurafenib was monitored at m/z 490.2 → m/z 383.3 (used for quantification) and m/z 255.2 at 26 and 41 collision energies, respectively, and vemurafenib-$^{13}C_6$ was monitored at m/z 496.2 → m/z 389.3 and m/z 261.2 at the same collision energies than vemurafenib.

Assay selectivity was defined by evidence of non-interference at retention times and ion channels identical to that of vemurafenib and its IS from ten batched drug-free blank samples. A blank sample was also analyzed immediately following the highest CS in each run to monitor the carry over of vemurafenib and its IS.

Calibration curves included a blank sample, a zero sample, and ten calibration standards over the range 0.1 μg/mL (lower limit of quantification (LLOQ)) to 100 μg/mL (upper limit of quantification (ULOQ)). Six calibration curves obtained over a period of six days were taken into account for linearity. Quantification was achieved by plotting the peak area ratios of vemurafenib to the internal standard versus concentration followed by linear regression analysis, which was the best fitting model as determined by bias analysis. Concentration of vemurafenib in the unknown samples was calculated from their peak area ratios and the calibration curve. The LLOD is the lowest concentration of the compound that can be detected with a signal-to-noise ratio greater than 3:1 for the two transitions, and the LLOQ was defined as the lowest concentration for which an accuracy between 80% and 120% and a precision with a coefficient of variation (CV) of ±20% or less that was obtained over six measurements of a QC samples.

The precision and accuracy of the method was determined by analysis of QC samples at five concentrations. This was carried out over 3 days. Each day, a calibration curve and 6 determinations of each QC level were analyzed. The values obtained were analyzed using analysis of variance (ANOVA), which separated the intra-day, and inter-day standard deviations and consequently the corresponding coefficient of variation (CV). The intra-day CV took into account the variability of the 6 replicates each day for 3 days and inter-day CV the variability of the days of analysis. The accuracy was determined by comparing the mean calculated concentration with the spiked target concentration of the QC samples. Accuracy within the range 85–115% of the nominal values and a precision with a CV of ±15% was required, except for the LLOQ for which a range of 80–120% and a CV of ±20% were accepted for accuracy and precision, respectively.

Two plasma QC samples (0.3 and 80 μg/mL) were analyzed in triplicate after three freeze and thaw cycles by complete thawing at room temperature and freezing at −20 °C for 12–24 h. Stability of processed samples was assessed by re-injection of the two plasma QC levels ($n = 5$) after conservation 24 h in the autosampler (at 4 °C) and comparison with the previously obtained values.

2.1. Application to treated melanoma patient

Twenty-six patients, 11 men and 15 women, suffering from melanoma harbouring BRAF V600E mutation treated by vemurafenib were routinely sampled. Patients received either 740 mg or 960 mg of vemurafenib on a twice-daily schedule. One patient had adjusted dose of 1200 mg bid. Blood samples were collected into-4 mL lithium heparinised vacutainer® tubes at steady state, that means after at least 15 days of treatment, either just before the next administration (trough plasma concentration or C_{min}) or between 2 and 6 h after the administration (peak plasma concentration or C_{max}). After centrifugation at 3500 rpm for 10 min at room temperature, plasma was transferred to propylene tubes and stored at −20 °C until analysis, that was achieved in the next week.

3. Results and discussion

In one of the three published method [7], the authors used UV-detection. However, since vemurafenib is administered in patients suffering from cancer, these patients often receive many co-medications, leading to possible interfering compounds when using chromatography coupled to UV-detection for measurement of their plasma concentration. As shown in Fig. 1A, no interference from constituents of drug-free human plasma at the retention times and the ion channels of vemurafenib and IS were observed. Chromatograms of vemurafenib and internal standard transitions, obtained from 10 μL of drug-free plasma spiked with 0.1 μg/mL of vemurafenib and 10 μg/mL of IS were shown in Fig. 1B. The retention times of both compounds were 2.2 min. Mean carry over was lower than 0.1% for vemurafenib and IS.

Quantification was achieved by linear regression analysis, which was the best fitting model as determined by bias analysis. The 10-point calibration curves exhibited good linearity in the concentration range 0.1–100 μg/mL with $1/x$ weighting factor with a correlation coefficient ranging from 0.9992 to 0.9998. Inter-day CV ranged from 1.2% to 10.0% and bias ranged from 0.22% to 3.7%

for the back-calculated concentrations of the ten calibration standards. The LLOQ was 0.1 μg/mL, demonstrating an intra-day CV of 3.3% and inter-day CV of 9.5% and accuracy between 99% and 107%. The LLOD was evaluated at 0.01 μg/mL. The ULOQ was 100 μg/mL. Three replicates of half-diluted QC samples above the ULOQ level were tested and back-calculated concentrations of diluted QC samples were acceptable, with bias and precision being less than 15% of the nominal concentrations.

In the two published methods of the JH Beijnen's team [9,10], the authors investigated as the first option a simple pre-treatment with protein precipitation [9] since it is less time-consuming, using

Table 1
Intra-day and inter-day precisions and accuracies of vemurafenib at four levels of concentrations (0.3, 15, 45 and 80 μg/mL) in plasma.

Concentration of vemurafenib added (ng/mL)		Precision (%CV)		Accuracy (%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
CQ	0.3	2.7	3.2	94.4–96.7	95.8
	15	2.8	6.0	101.4–106.5	103.8
	45	3.9	6.3	101.0–105.8	102.8
	80	3.2	13.3	93.7–104.5	99.1

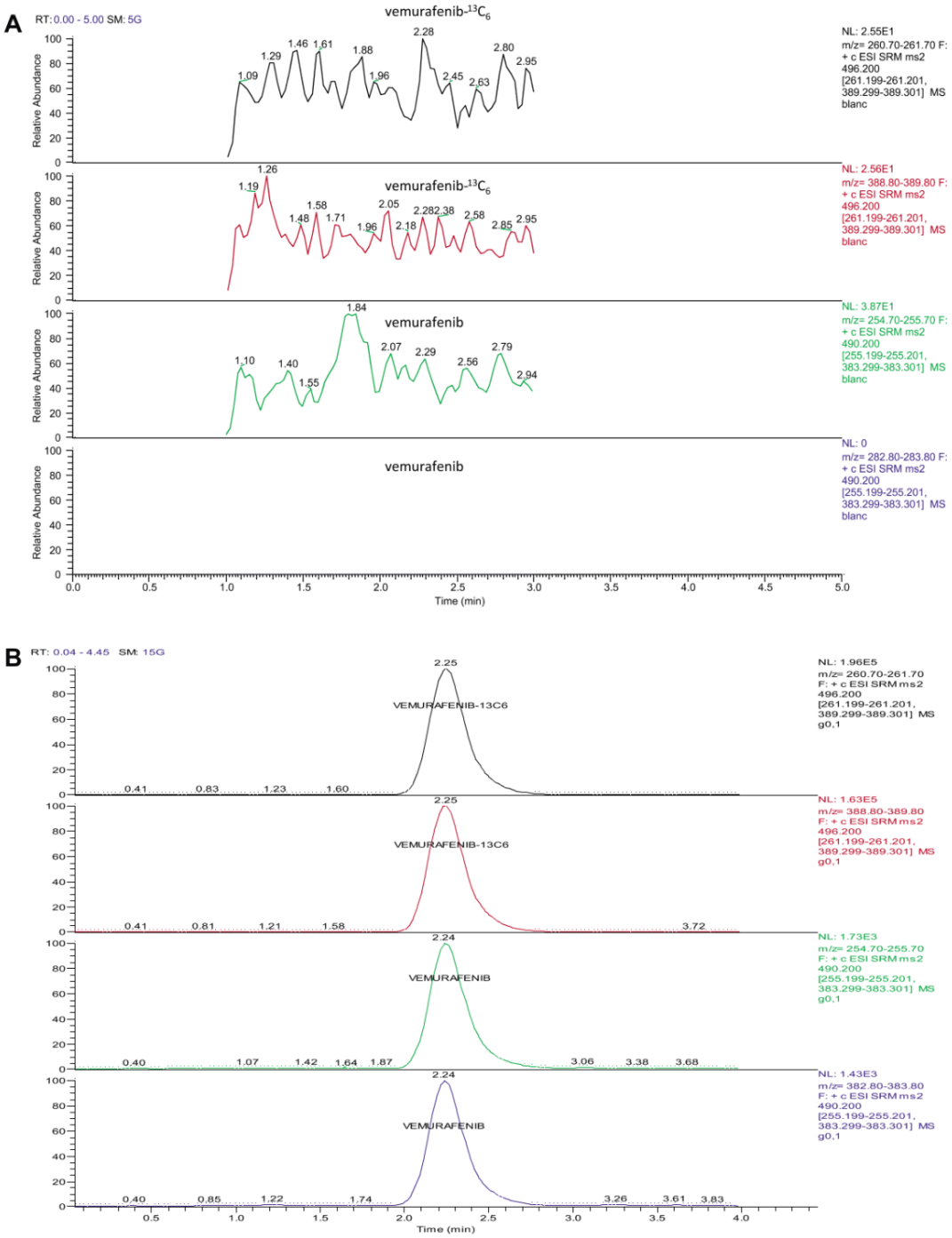


Fig. 1. Chromatogram of (A) drug-free human plasma, (B) spiked with vemurafenib (0.1 μg/mL) and vemurafenib-$^{13}C_6$ (10 μg/mL) and (C) obtained at steady state in a treated patient with plasma concentration of vemurafenib being 46 μg/mL. From the top of the bottom: chromatograms of the two transitions of vemurafenib-$^{13}C_6$ and the two transitions of vemurafenib.

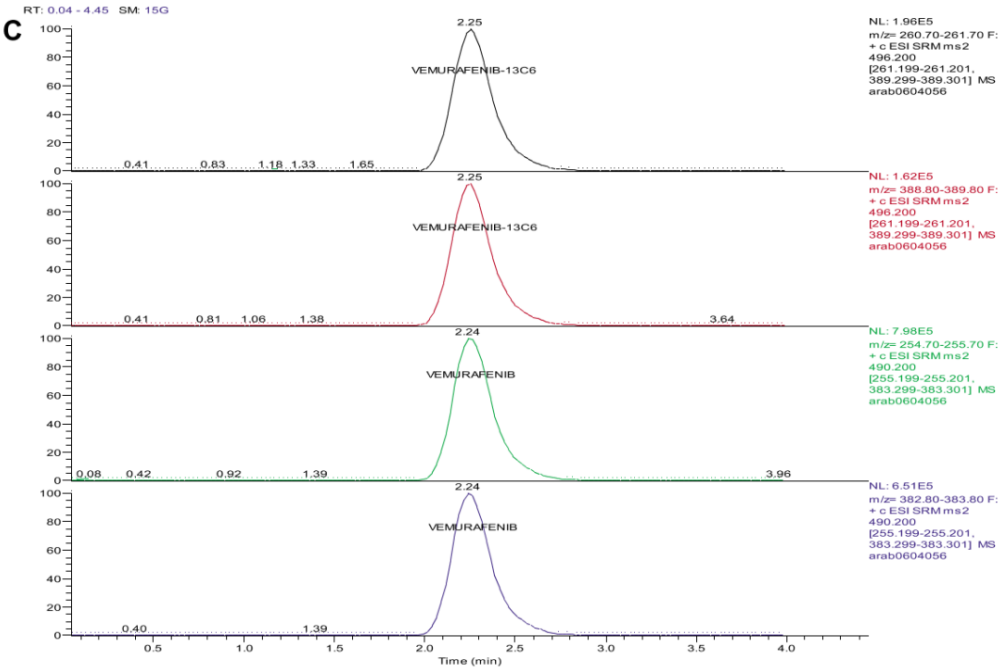


Fig. 1. (*Continued*).

50 μL of sample. However, using a simple precipitation, a quadratic calibration model was needed to fit their calibration data. So, they secondarily developed a sample preparation with a specific extraction using TBME as solvent [10], which allow the authors to use a linear regression model. In our method, using a simple precipitation, we could use a linear regression analysis probably because we used a very low sample volume of 10 μL. This low volume allow the sensitivity of our method to be constant all over the tested concentration range (0.1–100 μg/mL), which is higher than the calibration range used in the second published method of the JH Beijnen's team (1–100 μg/mL) [10].

Data of the 72 QC samples analyzed are presented Table 1, showing acceptable precisions and accuracies. The recovery was 96.9 ± 1% and 105 ± 4.8% for vemurafenib at low and high concentration, respectively, and its IS was 94.7 ± 1.2%. No matrix effect was observed in plasma samples. Vemurafenib and its internal standard were stable in all the tested process, in accordance with previously published data [9,10].

Vemurafenib was correctly detected in patient samples as shown in Fig. 1C. Mean age of the 26 treated patients was 59.3 ± 15.8 years (33–86 years). At steady state, trough plasma concentration (C_{min}, sampling at 13.1 ± 1.7 h after last administration) of patients treated with the recommended dose of 960 mg twice daily (n = 49 samples) showed an important variability with mean plasma concentration being 54.6 ± 23.3 μg/mL (CV 42%). When sampling was carried out 4.5 ± 2.3 h after administration (n = 11), mean plasma C_{max} was not different, 52.8 ± 19.6 μg/mL (CV 37%). Thirteen patients with a dose of 740 mg twice daily presented similar mean plasma C_{min} (56.7 ± 23.9 μg/mL). One patient presented low mean plasma C_{min} with the recommended dose (29.2 ± 5.2 μg/mL, n = 3 during 4 months) and a mean plasma C_{min} of 45.8 ± 16.5 μg/mL (n = 3 during 3 months) after the dose of 1200 mg twice daily. These results showed the great variability of the pharmacokinetics of this compound and the interest in pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship studies.

4. Conclusion

We have developed here a LC–MS/MS method with a fast simple pre-treatment procedure consisting of a simple precipitation that allows sensitive quantification of vemurafenib in plasma using a very low sample. Our data in treated patients has shown a very high variability of the pharmacokinetics of vemurafenib, suggesting the interest of TDM in order to determine a possible pharmacokinetics/pharmacodynamics relationship.

References

[1] H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephensen, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, Mutations of the BRAF gene in human cancer, Nature 417 (2002) 949–954.
[2] K.T. Flaherty, I. Puzanov, K.B. Kim, A. Ribas, G.A. McArthur, J.A. Sosman, P.J. O'Dwyer, R.J. Lee, J.F. Grippo, K. Nolop, P.B. Chapman, Inhibition of mutated activated BRAF in metastatic melanoma, N. Engl. J. Med. 363 (2010) 809–819.
[3] P.B. Chapman, A. Hauschild, C. Robert, J.B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, R. Dummer, C. Garbe, A. Testori, M. Maio, D. Hogg, P. Lorigan, C. Lebbe, T. Jouary, D. Schadendorf, A. Ribas, S.J. O'Day, J.A. Sosman, J.M. Kirkwood, A.M. Eggermont, B. Dreno, K. Nolop, J. Li, B. Nelson, J. Hou, R.J. Lee, K.T. Flaherty, G.A. McArthur, Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation, N. Engl. J. Med. 364 (2011) 2507–2516.
[4] R. Fischer, J. Larkin, Vemurafenib: a new treatment for BRAF-V600 mutated advanced melanoma, Cancer Manage. Res. 4 (2012) 243–252.
[5] S. Picard, K. Titier, G. Etienne, E. Teilhet, D. Ducint, M.A. Bernard, R. Lassalle, G. Marit, J. Reiffers, B. Begaud, N. Moore, M. Molimard, F.X. Mahon, Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia, Blood 109 (2007) 3496–3499.
[6] J.E. Cortes, M.J. Egorin, F. Guilhot, M. Molimard, F.X. Mahon, Pharmacokinetic/pharmacodynamic correlation and blood-level testing in imatinib therapy for chronic myeloid leukemia, Leukemia 23 (2009) 1537.
[7] Y. Zheng, A. Thomas-Schoemann, L. Sakji, P. Boudou-Rouquette, N. Dupin, L. Mortier, M. Vidal, F. Goldwasser, B. Blanchet, An HPLC–UV method for the simultaneous quantification of vemurafenib and erlotinib in plasma from cancer patients, J. Chromatogr. B 928 (2013) 93–97.
[8] M.C. Ravnan, M.S. Matalka, Vemurafenib in patients with BRAF V600E mutation-positive advanced melanoma, Clin. Ther. 7 (2012) 1474–1486.
[9] R.W. Sparidans, S. Durmus, A.H. Schinkel, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for the mutated BRAF inhibitor vemurafenib in human and mouse plasma, J. Chromatogr. B 889 (2012) 144–147.
[10] C.M. Nijenhuis, H. Rosing, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, Development and validation of a high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay quantifying vemurafenib in human plasma, J. Pharm. Biomed. Anal. 88 (2014) 630–635.

2. Article 5 : Plasma vemurafenib concentrations in advanced *BRAF* V600^{mut} melanoma patients: impact on tumour response and tolerance, *Annales of Oncology*, 2015

La technique de mesure de la CVP validée et réalisable en pratique clinique, nous a permis, avec l'accord du Comité de Protection des Personnes (CPP, Ile de France XI), de réaliser des dosages prospectifs répétés des patients traités par vemurafenib en monothérapie pour des mélanomes métastatiques de stade avancé (IIIC non résécable ou stade IV) porteurs d'une mutation *BRAF* V600, dans le service de dermatologie de l'hôpital Ambroise Paré.

Nous avons alors observé que certains patients avec des concentrations basses avaient une maladie qui progressait.

Ainsi, dans le but de confirmer notre hypothèse selon laquelle la CPV puisse être un potentiel marqueur prédictif de la réponse au vemurafenib, nous avons réalisé une étude monocentrique, dans laquelle nous avons corrélé les CPV, dont les dosages ont été recueillis de façon prospective, avec les données de réponse anti-tumorale, évaluée selon les critères RECIST 1.1, et les données d'effets indésirables, dont la classification en grade suivait le CTCAE 4 (Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4) ; ces données cliniques étaient colligées rétrospectivement, en aveugle des résultats des dosages.

Résumé de l'article Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAF V600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance*, Annales of Oncology*, 2015

Contexte. Le vemurafenib améliore la survie des patients atteints d'un mélanome muté *BRAF* V600, mais la tolérance est souvent mauvaise, et une résistance survient fréquemment, sans que l'on n'ait de facteur prédictif. Notre but était de rechercher pour la première fois une relation entre la CPV et l'efficacité d'une part et la tolérance d'autre part.

Méthodes. Les échantillons de plasma provenant de patients atteints de mélanomes métastatiques mutés *BRAF* V600 traités par vemurafenib en monothérapie ont été collectés prospectivement lors de chaque évaluation de la réponse anti-tumorale (RECIST 1.1) ou lors

de la survenue d'un effet indésirable (CTCAE 4.0). La CPV était mesurée par une technique de chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem. Nous rapportons ici des CPV à l'état d'équilibre (≥ 14 jours après l'introduction du vemurafenib ou une modification de dose). Les échantillons collectés après une première progression était exclus de l'analyse sur la réponse. Tous les échantillons ont été analysés dans l'analyse sur la tolérance. Nous avons gardé l'échantillon réalisé au moment le plus proche de la survenue de chaque effet indésirable ou celui avec la plus haute CPV en l'absence d'effet indésirable. Les comparaisons des moyennes (tests de Student et de Wilcoxon) et des fréquences (tests du Chi^2) ont été réalisées. Une analyse multivariée a identifié les facteurs prédictifs de progression.

Résultats. Nous avons inclus 105 échantillons plasmatiques provenant de 23 patients (10 hommes et 13 femmes). La dose initiale de vemurafenib était de 960 mg X2 par jour, réduite de 25% (8 patients) ou de 50% (2 patients) pour une mauvaise tolérance chez 10 patients (44%). Une grande variabilité inter-individuelle de la CPV était observée (13,0 – 109,8 µg/mL, médiane 54,0). La CPV moyenne au moment de la première progression (38,8 ± 19,7 µg/mL) était plus basse que la CPV moyenne retrouvée lorsque la réponse était stable, partielle ou complète (56,4 ± 21.0 µg/mL, p = 0,013, 21 patients). L'analyse multivariée révélait qu'avoir une faible CPV (p = 0,01) ou des métastases cérébrales (p = 0,01) étaient 2 facteurs associés de façon significative et indépendante à une progression tumorale. Aucune association statistiquement significative n'était retrouvée entre une CPV élevée et la survenue d'effets indésirables.

Conclusion. La CPV à l'état d'équilibre est hautement variable et une CPV faible était associée à une progression tumorale, suggérant une nouvelle voie de résistance au vemurafenib.

Mots clés. Vemurafenib, pharmacocinétique, mélanome métastatique, progression du mélanome, réponse tumorale, tolérance.

Annals of Oncology 26: 1470–1475, 2015
doi:10.1093/annonc/mdv189
Published online 21 April 2015

Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600^{mut} melanoma patients: impact on tumour response and tolerance†

E. Funck-Brentano[1,2], J. C. Alvarez[3,4], C. Longvert[1,2], E. Abe[3,4], A. Beauchet[4,5], C. Funck-Brentano[6,7,8] & P. Saiag[1,2*]

[1]*Department of Dermatology, AP-HP, Ambroise Paré Hospital, Boulogne-Billancourt;* [2]*University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Research Unit EA 4340 'Biomarkers in Cancerology and in Hemato-oncology', Boulogne-Billancourt;* [3]*Department of Toxicology, AP-HP, Raymond Poincaré Hospital, Boulogne-Billancourt;* [4]*University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Boulogne-Billancourt;* [5]*Department of Public Health, AP-HP, Ambroise Paré Hospital, Boulogne-Billancourt;* [6]*INSERM, CIC-1421 and UMR ICAN 1166, Paris;* [7]*Department of Pharmacology and CIC-1421, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris;* [8]*Department of Pharmacology and UMR ICAN 1166, Faculty of Medicine, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, France*

Received 9 October 2014; revised 9 April 2015; accepted 13 April 2015

Background: Vemurafenib improves survival in advanced *BRAFV600^{mut}* melanoma patients, but tolerance is often poor and resistance frequently occurs, without predictive factor. Our aim was to investigate for the first time a relationship between plasma vemurafenib concentration (PVC) and efficacy or tolerance.

Methods: Plasma samples from unresectable metastatic *BRAFV600^{mut}* melanoma patients treated with vemurafenib monotherapy were prospectively collected at each tumour response evaluation (RECIST 1.1) or when adverse event occurred (CTCAE 4.0). PVC was measured with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Herein, we report on PVC at steady state (≥14 days after vemurafenib introduction or dose modification). Samples collected after first

*Correspondence to: Prof. Philippe Saiag, Department of Dermatology and Research Unit EA 4340 'Biomarkers in Cancerology and Hemato-oncology', Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Ambroise Paré Hospital, 9 avenue Charles De Gaulle, 92104 Boulogne-Billancourt Cedex, France. Tel: +33-1-49-09-56-73; Fax: +33-1-49-09-56-85; E-mail: philippe.saiag@uvsq.fr

†Statement on prior presentation: This work was presented at ASCO 2014, Poster Hightlights session.

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society for Medical Oncology.
All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

melanoma progression were excluded from the response analysis. All samples were analysed in the tolerance analysis. We kept the closest collected sample from the onset of each adverse effect or the one with the highest PVC in the absence of this adverse effect. Comparisons of means (Student's *t*-tests and Wilcoxon rank sum tests) and of frequencies (χ^2 tests) were carried out. A logistic regression analysis identified predictors of progression.

Results: We included 105 plasma samples in 23 patients (10M/13F). Initial vemurafenib dose was 960 mg b.i.d., reduced by 25% (8 patients) or 50% (2 patients) for intolerance in 10 patients (44%). PVC displayed high inter-individual variability (13.0–109.8 μg/ml, median 54.0). Mean PVC was lower at time of first progression (38.8 ± 19.7 μg/ml) than mean PVC found when tumour was stable or in partial or complete response (56.4 ± 21.0 μg/ml, $P = 0.013$, 21 patients). Logistic regression revealed that having a low PVC ($P = 0.01$) or brain metastasis ($P = 0.01$) were both significantly and independently associated with tumour progression. High PVC was not statistically significantly associated with the occurrence of adverse effects.

Conclusion: PVC at steady state is highly variable and low PVC was associated with tumour progression, suggesting a new path to melanoma resistance to vemurafenib.

Key words: vemurafenib, pharmacokinetics, metastatic melanoma, melanoma progression, tumour response, tolerance

introduction

The incidence of cutaneous melanoma is rising in Caucasians. Vemurafenib, a recently approved BRAF-targeted therapy belonging to the rising class of kinase inhibitors, has been shown to improve disease-free and overall survivals in inoperable American Joint Committee on Cancer (AJCC) stage III–IV patients with melanoma harbouring a $BRAF^{V600}$ mutation [1]. However, tumour escape frequently occurs and significant adverse effects have been observed with vemurafenib, such as arthralgia, skin rash, photosensitivity, alopecia, fatigue, nausea, diarrhoea, and cutaneous squamous cell carcinoma. No correlation has been shown between the occurrence of these adverse events and better or longer efficacy of vemurafenib on tumour control, as it has been reported for skin toxicity with EGFR inhibitors in some cancers [2]. There are to date no known predictive factors of either anti-tumour response or occurrence of adverse events in vemurafenib-treated melanoma patients.

According to the summary of product characteristics [3], the median elimination half-life of vemurafenib is 51.6 h, with the 5th and 95th percentile of individual half-life estimates ranging from 29.8 to119.5 h. This suggests high inter-patient variability, which might also influence drug efficacy and tolerance. Only one study, carried out during the early development of vemurafenib when the exact formulation was not finalized, studied steady-state concentration needed for efficacy in melanoma [4]. Our aim was to investigate for the first time in the 'real life' a potential relationship between plasma vemurafenib concentration (PVC) at steady state and tumour control or occurrence of adverse events.

methods

Data were prospectively collected in our specialized skin cancer department between April 2012 (date of vemurafenib early access programme and early commercialization in France) and December 2013 in unresectable stage IIIC or IV $BRAF^{V600}$ mutated melanoma patients treated with vemurafenib monotherapy and not otherwise included in any clinical trial. $BRAF^{V600}$ mutational status was assessed as previously reported [5]. These patients were followed and monitored in the department according to our standard procedures. They had a consultation with one member of our team 1 and 2 months after beginning vemurafenib treatment, and then every 2 months until progression. Additional visits could be required in case of adverse event. During these consultations, patients were instructed repeatedly to adhere strictly to the manufacturer instruction brochure, which requires ingesting vemurafenib tablets during a meal. Just before or after these visits, blood was collected for standard blood tests (blood cell count, renal, and liver function tests). Efficacy was assayed every 2 months using thoracic and abdominopelvic computed tomographic (CT) scans, cerebral CT scan or magnetic resonance imaging, carried out by experienced radiologists. All images were collectively re-analysed on weekly basis during a joint meeting with the radiologists and tumour response classified according to RECIST version 1.1 [6] as complete response, partial response, stability, or progression in comparison with images obtained just before beginning vemurafenib therapy. Vemurafenib treatment could be continued when a patient on treatment experienced a progression of one or few lesions that could be treated with a local treatment such as radiotherapy or surgery.

This tumour evaluation was carried out without knowing PVCs and stored prospectively in a database. Adverse events were also routinely graded according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.0, without knowing PVCs.

After informing patients and obtaining oral consent, we prospectively collected an additional blood sample of 10 ml in patients during their regular follow-up or for unscheduled visits provided that blood had to be collected for usual blood tests. Blood was centrifuged, plasma frozen, and kept at −20°C until assayed. The following information was collected prospectively when blood was drawn: dose of vemurafenib, time of vemurafenib ingestion, and time of blood collection, declared compliance to therapy, and drug co-prescriptions. PVC was assessed without knowing tumour response or tolerance status using a validated liquid chromatography–tandem mass spectrometry method with electrospray ionization (precision: 13%, accuracy: >93%) and vemurafenib-D_6 as internal standard [7].

For this study, we searched in our database the records of vemurafenib-treated patients who had at least one PVC measured at steady state. Steady state was defined as no introduction nor modification of vemurafenib dose within 14 days before blood collection. To study the relationship between PVC and tumour response, we searched in our database, for each assay of PVC, the result of tumour response assessment carried out around blood collection date. Only assays carried out until first progression were analysed to study the relation between PVC and tumour response. To study the relationship between PVC and tolerance, we analysed the result of vemurafenib assay carried out closest to the onset of each adverse effect. In the absence of each adverse effect, we kept for this analysis, for each patient, the highest PVC measured.

Quantitative data were expressed as mean ± standard deviation (SD), median and range; qualitative data as frequency and percent. Comparisons of quantitative data were carried out using the Student's *t*-test and the

Wilcoxon rank sum test as appropriate. Comparison of frequencies was carried out using the χ^2 test. A linear regression analysis was used to determine the trend of PVC s over time. A logistic regression analysis was conducted to identify the predictive factors of progression. A P value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was carried out using SAS software version 9.3 (SAS Institute, Inc., Cary, NC). PVCs were not normalized for the administered dose.

This study was approved by the local ethics committee (CPP Ile de France XI), and considered to be standard of care and, according to the French Law, did not required a written informed consent. However, consent was obtained orally from all patients. Study was conducted according to the principle of the declaration of Helsinki [8].

results

We analysed 105 plasma samples (range 1–8 per patient) from 23 vemurafenib-treated patients (10 M/13 F) with metastatic, $BRAF^{V600}$ mutated, unresectable melanoma of either AJCC stage IIIC ($N = 3$) or IV ($N = 20$). Among AJCC stage IV patients, 12 (60%) had brain metastases, and 2 had been treated with stereotaxic cerebral radiotherapy during vemurafenib treatment.

Vemurafenib was used as first-line therapy in 17 patients (74%), second-line in 2 patients (9%) and third-line or more in 4 patients (17%). Among the 12 patients with brain metastasis, 8 received vemurafenib as first-line therapy (67%). Previous treatments were immunotherapy with ipilimumab ($N = 5$) or vaccination protocol ($N = 1$), or chemotherapy as dacarbazine ($N = 3$), fotemustine ($N = 2$), and cisplatine ($N = 1$).

Initial vemurafenib dose was 960 mg b.i.d. for all patients, reduced by 25% ($N = 8$) or 50% ($N = 2$) for grade CTCAE ≥2 adverse effects in 10 patients (44%). Dose was increased by 25% in one patient with a very slowly progressive melanoma and excellent tolerance of vemurafenib. Adverse effects that led to dose reduction were widespread maculopapular skin rash ($N = 5$), diarrhoea ($N = 1$), fatigue ($N = 2$), acute renal failure ($N = 1$), and uveitis ($N = 1$). All patients declared high compliance to treatment.

Figure 1 displays PVCs for each patient according to the dose ingested at time of blood sampling. We observed a high inter-individual variability of PVC (13.0–109.8 μg/ml, median 54.0). When considering only samples taken while patients were taking full-dose vemurafenib, variability was still high, with a median concentration of 55.0 μg/ml and a range of 13.0–109.8 μg/ml (data not shown). We did not observe significant decrease of PVCs with time ($r = -0.20$, $P = 0.09$). We did not find any impact of body mass index on PVCs (data not shown). Patients were instructed to take vemurafenib according to manufacturer instruction. Only one patient declared to take repeatedly vemurafenib at distance of meals: mean PVC of this patient was 56.2 ± 5.0 μg/ml.

Among the 105 plasma samples, 32 were drawn after first progression; thus, a total of 73 plasma samples, taken from 21 patients (range 1–7 per patient), were available to study the relation between PVC and tumour response. Mean delay between tumour response evaluation and blood collection date was 10.4 days. Clinical characteristics of the 21 patients included in this response-concentration analysis are summarized in Table 1 and Figure 2. Twelve patients had first tumour progression during study, after a mean 35 weeks on vemurafenib (Figure 2). Mean PVC was lower in patients at time of first progression

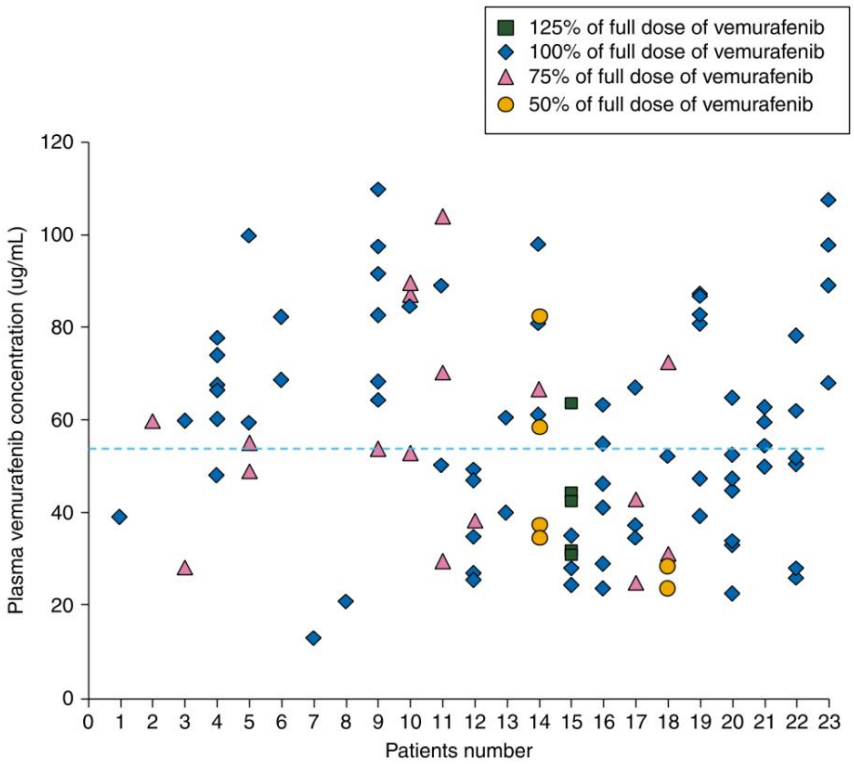


Figure 1. Plasma vemurafenib concentrations in each patient (one point is one sample, dotted line is median 54 μg/ml).

(38.8 ± 19.7 μg/ml; number of samples $N = 12$, from 12 patients) compared with mean PVC measured when tumour was considered stable ($N = 3$, from 3 patients), or in partial ($N = 36$, from 14 patients) or complete ($N = 22$, from 5 patients) response (56.4 ± 21.0 μg/ml; $N = 61$ from 18 patients; $P = 0.013$; Figure 3). Progression was also significantly more frequently observed at evaluations of patients who exhibited brain metastasis before beginning vemurafenib than for patients without prior brain metastasis ($P = 0.02$). Logistic regression revealed that having a low vemurafenib concentration [$P = 0.01$, odds ratio (OR) = 1.053 (1.010–1.100) for each 1 μg/ml decrease] or brain metastasis ($P = 0.01$, OR = 7.1 (1.5–32.8)] were both significantly associated with tumour progression.

Table 1. Clinical characteristics of 21 patients in whom blood samples were drawn before first melanoma progression on vemurafenib

Mean age (years ± SD)	51 ± 17
Sex (F/M)	11/10
Body mass index	23.2 ± 3.5
AJCC staging	
IIIc	3 (14%)
IV	18 (86%)
M1a	1 (5%)
M1b	0
M1c	17 (81%)
Line of treatment	
First line	16 (76%)
Second line	2 (10%)
Third line or more	3 (14%)
Subcutaneous metastasis	12 (60%)
Node metastasis	18 (86%)
Visceral metastasis	16 (76%)
Cerebral metastasis	11 (52%)
N patients with vemurafenib dose reduction for adverse effects	7 (33%)
−25%	6 (28%)
−25% then −50%	1 (5%)

Data are numbers (%).

These results were not influenced by the number of plasma samples taken into consideration in each patient. When considering only the first plasma sample harvested, mean PVC in the 12 patients at time of first progression (38.8 ± 19.7 μg/ml) was still significantly lower than in the patients with complete or partial response or who were considered as stable (59.8 ± 20.0 μg/ml; $P = 0.009$). In another sensitivity analysis, we defined steady state as no introduction nor modification of vemurafenib dose within 28 days before blood collection. Using this definition, only 6 samples (of 73) would have been removed from the efficacy analysis, which did not change our results (data not shown).

To study the relationship between PVC and tolerance, we included all 105 samples. No significant difference was observed between mean PVC and the occurrence of each adverse effect, such as alopecia (N = number of patients with, $N = 16$; $P = 0.61$), palmoplantar keratoderma ($N = 13$; $P = 0.48$), maculopapular rash ($N = 5$; $P = 0.11$), panniculitis ($N = 5$; $P = 0.97$), squamous cell carcinoma ($N = 5$; $P = 0.36$), arthromyalgia ($N = 10$; $P = 0.95$,), diarrhoea ($N = 11$; $P = 0.12$), uveitis ($N = 1$), increase >30% of creatinine level ($N = 5$; $P = 0.1$), transaminitis ($N = 3$; $P = 0.11$). We observed only a trend towards an increase of the mean PVC for two adverse effects: maculopapular rash and creatinine-level increase >30%.

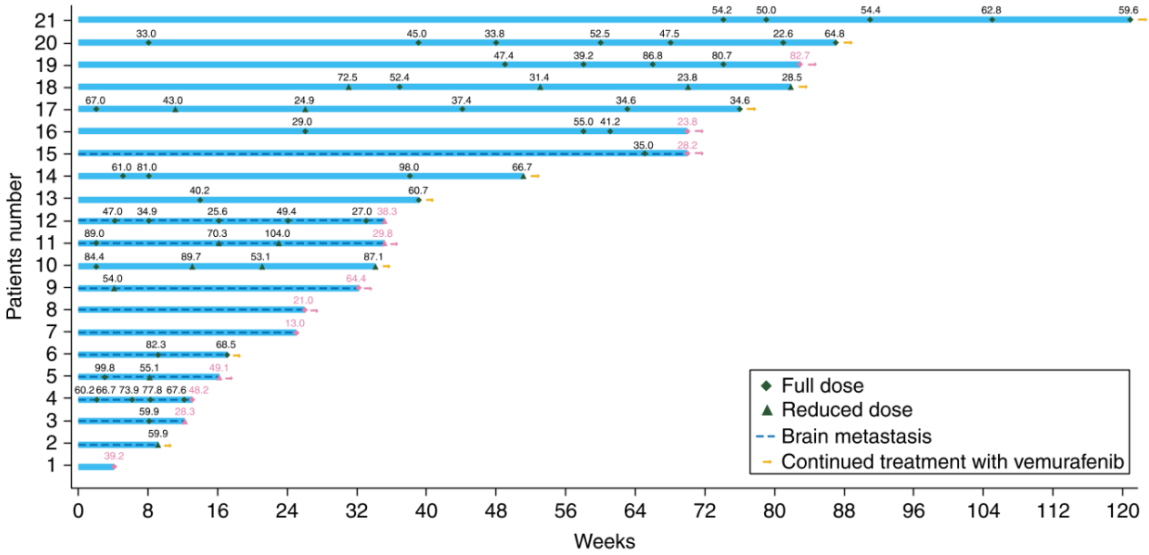


Figure 2. Swimmer plot presenting plasma vemurafenib concentrations in μg/ml. Each bar represent one patient, from the beginning of vemurafenib (0) to end of treatment in weeks or end of study. Each numerical value represents the result, its position on the bar represent the date of plasma drawn, the shape of the point the dosage received, and the colour the result of tumoral evaluation carried out in simultaneously (light grey (pink online), progression, black (green online) partial or complete response, or stabilization).

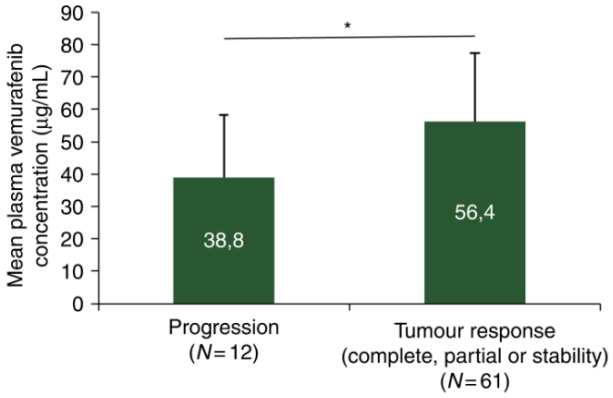


Figure 3. Mean plasma vemurafenib concentration in patients with disease progression (number of samples $N = 12$ in 12 patients) and in patients with partial or complete response ($N = 61$ in 18 patients) (using RECIST 1.1 criteria: stability, partial, or complete response). Bar = SD.

discussion

This study showed high variability of steady-state vemurafenib plasma concentrations in patients with advanced melanoma treated with vemurafenib. Multivariate analysis showed that, at the time of evaluation of tumour response, progression was significantly associated with two parameters: lower plasma steady-state vemurafenib concentration and presence of cerebral metastasis before vemurafenib treatment. The poorer prognosis of brain metastasis, even in the $BRAF^{inh}$ era [9], has already been shown. To our knowledge, our study is the first one showing that tumour progression is associated with lower vemurafenib plasma concentration.

One limitation of our study is the small number of patients included. However, we were able to conduct a multivariate analysis that took into account major prognostic criteria for metastatic melanoma in the $BRAF^{inh}$ era. Moreover, we prospectively collected clinical information, using standardized criteria for tumour response evaluation and reporting of adverse events, and the analyses were conducted completely blinded to the results of PVCs.

The advantages of the vemurafenib mass spectrometry-assay we used should also be emphasized: (i) its high specificity, with no interference with endogenous products, vemurafenib metabolites, or with co-administered medications or their metabolites; (ii) its higher sensitivity when compared with other published techniques which use UV detection; (iii) a 10 times lower detection threshold. Long-term stability in plasma of vemurafenib was tested for 18 months, showing no degradation of vemurafenib. Since samples were frozen for <12 months in this study, duration of storage could not have impacted our results.

The high inter-patient variabilitiy of vemurafenib concentration found herein despite the fact that we meticulously collected blood samples at steady state may be explained by some parameters, which were not examined in our study. Intake of vemurafenib on an empty stomach may lead to significantly lower steady-state exposure than intake of vemurafenib with or a short time after a meal [3, 10]. No influence of meal on vemurafenib exposure was demonstrated in our series, but we did not record for each drug intake, the time of corresponding meal.

Mean PVC is lower upon melanoma progression. Our result suggests nevertheless a relationship between PVC and efficacy as has been showed in another study [11], and presumably a new resistance mechanism to vemurafenib that is independent of intra-tumour resistance mechanisms.

This study, in a limited number of patients, did not show that higher PVCs were significantly associated with a greater risk of experiencing some adverse effects. The poor tolerance of vemurafenib, with 44% of patients requiring vemurafenib dose reduction in the BRIM-3 study because of adverse effects, is well known [12]. Surprisingly, we found that, when patients took reduced doses of vemurafenib, the mean PVCs were only slightly lower than when they were taking full doses (data not shown). This observation, which may be due to a better adherence to treatment in the absence of adverse effects, suggests that dose reduction of vemurafenib in intolerant patients could yield slightly lower PVCs that could still be within the 'therapeutic range'.

As many kinase inhibitors, vemurafenib undergoes hepatic metabolism, but its hepatocellular uptake remains poorly investigated [3]. After oral administration, vemurafenib is metabolized into several metabolites (essentially through CYP3A4) but it mainly circulates in plasma (95%) as the parent compound. During administration of 960 mg b.i.d. vemurafenib median C_{max} at steady state is 56.7 ± 21.8 µg/ml, a figure consistent with our results.

In vitro studies have demonstrated that vemurafenib is an inhibitor of the efflux transporters P-glycoprotein (P-gp/ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). Biliary transporters could play a determinant role in vemurafenib elimination. Conjugation metabolites [glucuronidation and glycosylation controlled in part by UDP glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1)] were also identified in humans. These transporters and phase II enzymes most probably contribute to vemurafenib inter-patient pharmacokinetic variability.

The high inter-patient variability of vemurafenib exposure could be explained by different genetic polymorphisms of P-gp and/or BCRP [13] and or UGT1A1 [13, 14]. It can be hypothesized that patients who accumulate vemurafenib have at least one mutation on genes coding for these transporters or enzyme. Indeed, these mutations are very common in the general population, ABCB1, non-functional mutations being observed in 25% of individuals and UGT1A1 mutations, responsible for Gilbert's syndrome in 3%–7% of the population.

Our results suggest that vemurafenib concentration monitoring could be a new and relatively simple method to follow metastatic melanoma patients, as it has been shown for imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia [15]. In melanoma, a study published in 2012 using sorafenib, a multi-kinase inhibitor, suggested a correlation between sorafenib exposure and efficacy [16]. Burger et al. have shown that chronic imatinib exposure decreased intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (P-gp/MDR1) drug transporters [17]. Overexpression of these efflux pumps could also be a mechanism of resistance to vemurafenib by limiting drug distribution at different tumour sites. An *in vitro* study has shown that brain distribution of vemurafenib is strongly restricted at the blood–brain barrier because of active efflux by both P-gp/ABCB1 and BCRP/ABCG2 [18]. Elacidrar, a specific inhibitor of P-gp/ABCB1 and BCRP/ABCG2, increases vemurafenib brain

penetration, in mouse models [19]. The presence of efflux transporters into the blood–brain barrier could explain the higher difficulty to obtain long-term anti-tumour response in melanoma brain metastasis [20]. Furthermore, tumour cells themselves could express these transporters. A study has shown, *in vitro* and *in vivo* in a xenograft model that melanoma therapy with dacarbazine, temozolomide, or vemurafenib might participate to the chemoresistance acquisition by selecting tumour cell sub-populations expressing ABCB5, which shares 73% of sequence homology with *ABCB1*/P-gp [21]. Overexpression of these transporters might be a potential mechanism of acquired resistance to vemurafenib in $BRAF^{V600E}$ mutant cancer cells [22]. These transporters could become potential therapeutic targets in melanoma.

These transporters could also be implicated in the safety of vemurafenib, as they are implicated in the safety of gefitinib in non-small-cell lung cancer patients [23].

UGT1A1 could also be implicated in the safety profile of vemurafenib, as it is strongly associated with severe irinotecan toxicity in colorectal patients [24]. Further studies are needed to examine the association between ABCB1, ABCG2, and UGT1A1 polymorphisms and clinical outcomes (efficacy and safety) of melanoma patients treated with vemurafenib.

Our preliminary findings should be confirmed in a prospective study in a larger set of patients, with repeated collection of samples, at steady state, at each tumour assessment and at each occurrence of new adverse effect. Should our findings be confirmed, another study exploring dose adjustments according to PVCs in order to increase vemurafenib anti-tumour efficacy and improve tolerance, is warranted. The role of genetic polymorphisms of crucial metabolism enzymes and transporters of vemurafenib on the occurrence of vemurafenib-induced adverse events should also be investigated.

disclosure

The authors have declared no conflicts of interest.

references

1. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. N Engl J Med 2012; 366: 707–714.
2. Liu HB, Wu Y, Lv TF et al. Skin rash could predict the response to EGFR tyrosine kinase inhibitor and the prognosis for patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. PLoS One 2013; 8: e55128.
3. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002409/WC500124317.pdf. (8 May 2014, date last accessed).
4. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. N Engl J Med 2010; 363: 809–819.
5. Emile JF, Tisserand J, Bergougnoux L et al. Improvement of the quality of BRAF testing in melanomas with nationwide external quality assessment, for the BRAF EQA group. BMC Cancer 2013; 13: 472.
6. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer 2009; 45: 228–247.
7. Alvarez JC, Funck-Brentano E, Abe E et al. A LC/MS/MS micro-method for human plasma quantification of vemurafenib. Application to treated melanoma patients. J Pharm Biomed Anal 2014; 97c: 29–32.
8. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA 2013; 310: 2191–2194.
9. Long GV, Trefzer U, Davies MA et al. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol 2012; 13: 1087–1095.
10. Ribas A, Zhang W, Chang I et al. The effects of a high-fat meal on single-dose vemurafenib pharmacokinetics. J Clin Pharmacol 2014; 54: 368–374.
11. Kramkimel N, Sakji L, Thomas-Schoemann A et al. Severe skin rash during vemurafenib treatment: a predictive factor of early positive response in metastatic melanoma? J Clin Oncol 2014 (ASCO Annual Meeting Abstracts 2014); 32 [15_suppl (May 20 Suppl 2014)]: 9092.
12. Chapman PB, Hauschild A, Robert C et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. N Engl J Med 2011; 364: 2507–2516.
13. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ et al. Membrane transporters in drug development. Nat Rev Drug Discov 2010; 9: 215–236.
14. Guillemette C, Levesque E, Rouleau M. Pharmacogenomics of human uridine diphospho-glucuronosyltransferases and clinical implications. Clin Pharmacol Ther 2014; 96: 324–339.
15. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. Blood 2008; 111: 4022–4028.
16. Pecuchet N, Lebbe C, Mir O et al. Sorafenib in advanced melanoma: a critical role for pharmacokinetics? Br J Cancer 2012; 107: 455–461.
17. Burger H, van Tol H, Brok M et al. Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. Cancer Biol Ther 2005; 4: 747–752.
18. Mittapalli RK, Vaidhyanathan S, Sane R, Elmquist WF. Impact of P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) on the brain distribution of a novel BRAF inhibitor: vemurafenib (PLX4032). J Pharmacol Exp Ther 2012; 342: 33–40.
19. Durmus S, Sparidans RW, Wagenaar E et al. Oral availability and brain penetration of the B-RAFV600E inhibitor vemurafenib can be enhanced by the P-GLYCOprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) inhibitor elacridar. Mol Pharm 2012; 9: 3236–3245.
20. Dummer R, Goldinger SM, Turtschi CP et al. Vemurafenib in patients with BRAF (V600) mutation-positive melanoma with symptomatic brain metastases: final results of an open-label pilot study. Eur J Cancer 2014; 50: 611–621.
21. Chartrain M, Riond J, Stennevin A et al. Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. PLoS One 2012; 7: e36762.
22. Wu CP, Sim HM, Huang YH et al. Overexpression of ATP-binding cassette transporter ABCG2 as a potential mechanism of acquired resistance to vemurafenib in BRAF(V600E) mutant cancer cells. Biochem Pharmacol 2013; 85: 325–334.
23. Lemos C, Giovannetti E, Zucali PA et al. Impact of ABCG2 polymorphisms on the clinical outcome and toxicity of gefitinib in non-small-cell lung cancer patients. Pharmacogenomics 2011; 12: 159–170.
24. Shulman K, Cohen I, Barnett-Griness O et al. Clinical implications of UGT1A1*28 genotype testing in colorectal cancer patients. Cancer 2011; 117: 3156–3162.

3. Article 6 : Reply to the letter to the editor 'Plasma vemurafenib concentrations in advanced *BRAF* V600^{mut} melanoma patients: impact on tumor response and tolerance' by Funck-Brentano et al., *Annales of Oncology*, 2015

En réponse à l'article précédent (Funck-Brentano *et al.*, *Ann Oncol*, 2015), Goldwirt *et al.* ont publié une lettre à l'éditeur (Annexe).

Dans cette lettre, les auteurs rapportent une étude similaire à la nôtre, prospective, monocentrique (Service de Dermatologie de l'hôpital Saint Louis, Paris), portant sur 48 patients (28 hommes, 20 femmes) avec un mélanome métastatique muté *BRAF* V600 traités par vemurafenib en monothérapie.

La méthode de mesure de la CPV utilisait une méthode de chromatographie liquide couplée à une détection à l'aide d'UV. Les échantillons plasmatiques (n = 148) étaient collectés à l'état d'équilibre chaque mois. Les patients étaient suivis chaque mois pour l'évaluation de la tolérance, et l'évaluation de la réponse avait lieu tous les 2 mois par un scanner du corps entier selon les critères RECIST 1.1.

Leur étude a confirmé plusieurs de nos résultats. Tout comme nous, ils ont retrouvé une grande variabilité interindividuelle, indépendamment de la dose (5,3 - 135,2 µg/mL, médiane 66,8), et les auteurs rapportaient que la CPV « médiane » des patients en progression tendait à être plus basse (51 $\pm$ 22 µg/mL) que celle des patients avec une réponse complète, partielle ou stable (67 $\pm$ 24 µg/mL ; p = 0,060). De plus, ils ont établi par des courbes de ROC une valeur seuil prédictive de progression : les patients avec une CPV médiane supérieure à 42 µg/mL avaient un risque significativement plus faible de progression que les patients avec une CPV médiane inférieure à 42 µg/mL durant la première année de traitement (p = 0,005), suggérant qu'une CPV faible pouvait favoriser l'émergence de résistance.

Ces résultats étaient cohérents avec ceux d'une étude publiée antérieurement par une troisième équipe parisienne de l'hôpital Cochin (413). Cependant, ces résultats n'étaient plus significatifs au-delà d'un an de traitement (p = 0,071), suggérant que des mécanismes de résistance adaptative avec le temps surviennent dans la majorité des cas, et ce, indépendamment de mécanismes pharmacocinétiques.

De même que dans notre étude, ils n'ont pas mis en évidence de relation entre la CPV et la survenue d'effets indésirables.

Bien que cette étude, comportant un plus grand nombre de patients, confirmât nos résultats, des remarques devaient être précisées.

Nous leur avons alors répondu.

Résumé de lettre de réponse à la lettre 'Reply to the letter to the editor 'Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumor response and tolerance' by Funck-Brentano *et al*.', *Annales of Oncology*, 2016

Nous avons tout d'abord remercié Goldwirt *et al.* pour leur étude indépendante qui a permis de confirmer nos résultats sur la différence, bien qu'elle ne soit pas significative avec leurs données, entre la CPV des patients atteints de mélanomes métastatiques mutés *BRAF* V600 qui sont en progression tumorale de celle des patients qui répondent au vemurafenib, ainsi que la grande variabilité inter-individuelle de la CPV chez ces patients.

Puis, nous leur avons fait quelques critiques sur la détermination de cette valeur seuil de 42 µg/mL prédictive de progression dans la première année de traitement. Tout d'abord, sur l'absence de paramètres reportés des analyses des courbes de ROC, sur leur courbe de survie sans progression à 12 mois qui, bien qu'il manque le nombre de patients dans chaque groupe sous l'axe des abscisses pour chaque temps, est prometteuse mais la prédiction semble relativement mauvaise. En effet, une analyse graphique de leur courbe de survie sans progression suggère que seuls 10 des 48 patients (21%) avait une CPV < 42 µg/mL. En outre, en faisant l'hypothèse d'une distribution normale de la CPV (puisqu'ils ont rapporté un écart-type de 24 µg/mL pour leur valeur de CPV de 67 µg/mL dans le groupe en réponse complète, partielle ou stable), environ 20% de ces bons répondeurs avaient une CPV inférieure à 42 µg/mL. De même, avec une CPV médiane (à moins que ce ne soit une moyenne ?) de 51 µg/mL, plus de 50% des patients en progression avaient une CPV au-dessus du seuil de 42 µg/mL.

En utilisant nos propres données, nous avons tracé la courbe cumulative du pourcentage de patients avec ou sans progression tumorale en fonction de la CPV.

Comme avec les données de Goldwirt *et al*., environ 30% de nos patients avec une réponse avaient une CPV en dessous de 42 µg/mL, et environ 30% de ceux avec une progression avaient une CPV au-dessus de ce seuil.

La valeur seuil de 42 µg/mL proposé par Goldwirt *et al.* est équivalente à la limite inférieure d'une plage de concentration thérapeutique qui serait valable dans un temps limité. Il faut être prudent sur une telle méthode de détermination d'une valeur seuil pour une réponse thérapeutique. Idéalement, une concentration de médicament thérapeutique doit prédire la réponse chez 95% des patients (414). Plus important, une valeur seuil déterminée par une analyse de courbe ROC comme celle de Goldwirt *et al.* représente seulement la première étape dans la détermination de sa valeur prédictive d'une réponse thérapeutique. Une étude prospective randomisée comparant les patients dont la dose du médicament est ajustée pour obtenir une concentration cible avec des patients pour lesquels la dose n'est pas ajustée est nécessaire pour valider une valeur seuil. Et cela ne confirme pas toujours la valeur thérapeutique du seuil (415, 416).

Etant donné que, à la fois pour les patients de Goldwirt *et al.* et les nôtres, la CPV ne prédisait pas de la survenue d'événements indésirables sous vemurafenib, ces résultats soutiennent l'idée qu'en l'absence d'une réponse thérapeutique rapide après le début du traitement, la dose de vemurafenib puisse être ajustée à une concentration cible dépassant 42 µg/mL, par exemple 60 ou 70 µg/mL, si la tolérance reste acceptable. Cela doit cependant être confirmé par un essai prospectif randomisé.

Annals of Oncology Advance Access published December 29, 2015

letter to the editor

Annals of Oncology 00: 1–2, 2015

Reply to the letter to the editor 'Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600^{mut} melanoma patients: impact on tumor response and tolerance' by Funck-Brentano et al.

We thank Goldwirt et al. [1] for their independent confirmation of our results [2] on the difference, although it did not quite reach statistical significance in their dataset, between plasma vemurafenib concentrations (PVC) among patients with unresectable metastatic BRAFV600^{mut} melanoma who experienced tumor progression and those who responded to vemurafenib. They also confirm the large interindividual variability of PVC in these patients.

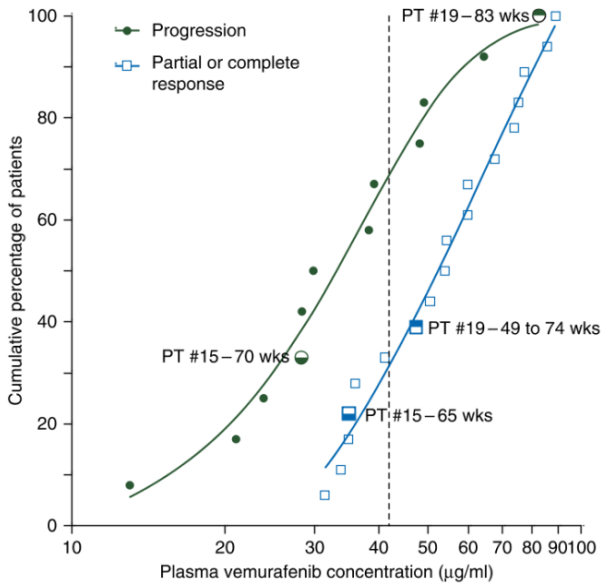


Figure 1. Cumulative percentage of patients with and without tumor progression as a function of plasma vemurafenib concentration. The dashed vertical line is placed at a plasma vemurafenib concentration of 42 µg/ml. Concentrations in patients with a partial or complete response are the median of all values collected before progression. Patients #15 and #19 who had concentrations measured after more than 1 year of treatment and initially responded to vemurafenib before they experienced tumor progression are highlighted.

Goldwirt et al. suggest a PVC cutoff value predicting disease progression. Based on a receiver operating characteristics (ROC) curve analysis, whose parameters are not reported, patients with median PVC >42 µg/ml had a significantly lower risk of disease progression than patients with median PVC <42 µg/ml during the first year after vemurafenib initiation. Their curve of progression-free survival at 12 months, although sample size in each group is not shown under the abscissa at various time points, is promising but it should be emphasized that the prediction appears to be relatively poor. Indeed, a graphical analysis of their survival curves suggests that only 10 of their 48 patients [21%; 95% confidence interval 11.5% to 34.5%] had PVC <42 µg/ml. Also, assuming a normal distribution of PVC (since they reported a 24-µg/ml standard deviation to their PVC of 67 µg/ml in complete, partial or stable responders), ~20% of these good responders had PVC below 42 µg/ml. Likewise, with a median (or is it mean?) PVC of 51 µg/ml, >50% of patients experiencing disease progression had PVC above the 42 µg/ml threshold. Using our own data, we plotted the cumulative curve of percentage of patients with and without tumor progression as a function of PVC (Figure 1). In line with the data of Goldwirt et al., ~30% of our patients with tumor response had PVC below 42 µg/ml and ~30% with disease progression had PVC above this cutoff.

The cutoff of 42 µg/ml proposed by Goldwirt et al. is equivalent to the lower boundary of a therapeutic concentration range which would be valid for a limited amount of time. One should be cautious about such a method of cutoff determination for a therapeutic response. Ideally, a therapeutic drug concentration should predict the response in 95% of patients [3]. More importantly, a cutoff determined by an ROC curve analysis such as that of Goldwirt et al. is only the first step in determining its predictive value for a therapeutic response. A prospective randomized trial comparing patients whose drug dose is adjusted to the target concentration with those in whom it is not is required to validate the cutoff. And this does not always confirm the therapeutic value of the cutoff [4, 5].

Since, both in the patients of Goldwirt et al. and ours, PVC did not predict adverse events with verumafenib, these results support the view that, in the absence of a rapid therapeutic response after treatment initiation, vemurafenib dose should be adjusted to a target concentration exceeding 42 µg/ml, e.g. 60 or 70 µg/ml, if tolerance remains acceptable. This needs, however, to be confirmed by a prospective randomized trial.

E. Funck-Brentano[1], J. C. Alvarez[2], C. Longvert[1], E. Abe[2], A. Beauchet[3], P. Saiag[1] & C. Funck-Brentano[4,5,6*]

[1]Department of Dermatology and Research Unit EA 4340 'Biomarkers in Cancerology and in Hemato-oncology', AP-HP Ambroise

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society for Medical Oncology.
All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

Paré Hospital and University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Boulogne-Billancourt;
[2]Department of Toxicology, AP-HP Raymond Poincaré Hospital and University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Garches;
[3]Department of Public Health, AP-HP Ambroise Paré Hospital and University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Boulogne-Billancourt;
[4]Department of Pharmacology and CIC-1421, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris;
[5]INSERM, CIC-1421 and UMR ICAN 1166, Paris;
[6]Faculty of Medicine, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, France
(*E-mail: christian.funck-brentano@upmc.fr)

disclosure

The authors have declared no conflicts of interest

references

1. Goldwirt L, Chami I, Feugeas J-P et al. Reply to: 'Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600^{mut} melanoma patients: impact on tumour response and tolerance'. Ann Oncol 2015 November 16 [epub ahead of print], doi: 10.1093/annonc/mdv538.
2. Funck-Brentano E, Alvarez JC, Longvert C et al. Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600^{mut} melanoma patients: impact on tumour response and tolerance. Ann Oncol 2015; 26: 1470–1475.
3. Aronson JK, Hardman M. ABC of monitoring drug therapy. Measuring plasma drug concentrations. BMJ 1992; 305: 1078–1080.
4. Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z, Hulot JS et al. Low blood concentration of hydroxychloroquine is a marker for and predictor of disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2006; 54: 3284–3290.
5. Costedoat-Chalumeau N, Galicier L, Aumaitre O et al. Hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus: results of a French multicentre controlled trial (PLUS Study). Ann Rheum Dis 2013; 72: 1786–1792.

doi: 10.1093/annonc/mdv549

Discussion de la partie II

Nous avons montré que la CPV, bien qu'ayant une forte variabilité interindividuelle, pouvait être un marqueur prédictif de progression tumorale des patients atteints d'un mélanome métastatique traités par vemurafenib en monothérapie. Ces résultats ont été confirmés par l'équipe de Goldwirt *et al*.

Ces auteurs ont proposé une valeur seuil de 42 µg/mL au-delà de laquelle le risque de progression augmente. L'équipe de Kramkimel *et al.* avait également retrouvé un seuil similaire (40,4 µg/mL) par la comparaison de la courbe de survie sans progression du premier quartile (1/4 des patients, n = 10, ayant une CPV au 15ème jour de traitement par vemurafenib inférieure à 40,4 µg/mL ; 1,5 mois [0,5 – 5,5]) avec celle des 3 autres quartiles (3/4 des patients, n = 29, ayant une CPV au 15ème jour supérieure à 40,4 µg/mL ; 4,5 mois [2 – indéterminé], p = 0,029). Toutefois, une corrélation ne traduit pas toujours un lien de causalité ; les méthodes qui ont permis de déterminer ce seuil sont critiquables, et notre analyse graphique montre que ce seuil est probablement trop bas.

Les causes pouvant être à l'origine de la grande variabilité des CPV sont nombreuses. Une telle variabilité pourrait être due à une mauvaise observance des patients (non observée dans notre étude), à des polymorphismes des enzymes (UDP glucuronosyltransférase 1A1) ou des transporteurs d'efflux P-gp (P-glycoprotéine/ABCB1) ou BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*/ABCG2) connus pour être impliqués dans le métabolisme ou le transport du vemurafenib. Ces polymorphismes sont fréquents dans la population générale. Une action directe du médicament sur les régulateurs transcriptionnels et sur le niveau d'expression de ces transporteurs d'efflux pouvant induire, tel que cela a été rapporté avec l'imatinib (417), une diminution de la disponibilité du vemurafenib avec le temps, diminuant alors l'absorption digestive du médicament est également concevable. Une des hypothèses serait que la CPV basse reflète une surexpression des transporteurs d'efflux des entérocytes, mais également d'autres systèmes d'élimination de l'organisme, diminuant ainsi la biodisponibilité du vemurafenib dans les différents sites métastatiques, ainsi que dans les cellules tumorales elles-mêmes (418), à l'origine d'un mécanisme potentiel de résistance au vemurafenib (419). Ces transporteurs pourraient alors devenir des cibles thérapeutiques potentielles dans le mélanome.

Contrairement à l'étude de Goldwirt *et al*. et à la nôtre, qui toutes deux ne retrouvaient pas d'association significative entre la CPV et la survenue d'effet indésirable, Kramkimel *et al.* ont retrouvé que la CPV moyenne au moment de la survenue d'un rash cutané de grade ≥ 2 était significativement plus élevée que celle des patients n'ayant pas cet effet indésirable ((61,7 ± 25,0 *versus* 36,3 ± 17,9 mg/L, $p < 0.0001$). En revanche, pour l'ensemble des autres effets indésirables, aucune association significative avec la CPV n'a été retrouvée. Par une courbe ROC, ils avaient estimé une valeur seuil, prédictive de la survenue d'un rash cutané de grade ≥ 2, à 52,3 µg/mL, mais nous avons évoqué précédemment les limites de cette méthode d'analyse pour déterminer une valeur seuil. Dans notre étude, seule une tendance était observée entre une CPV moyenne plus élevée chez les patients présentant un rash cutané par rapport à ceux qui n'avait pas cet effet indésirable (p = 0,11). Toutefois, la méthode utilisée n'était pas la même, nous avions comparé la moyenne des CPV mesurées au moment le plus proche de la survenue du rash avec la CPV la plus haute mesurée chez un patient n'ayant pas développé cet effet indésirable.

Nous observions également une tendance entre une CPV moyenne plus élevée chez les patients présentant une augmentation de la créatinine de plus de 30% par rapport à ceux qui n'avaient pas cet effet indésirable (p = 0,1). Une étude monocentrique réalisée chez 70 patients traités par vemurafenib pour un mélanome métastatique a montré qu'une grande majorité (97%) des patients avait une augmentation de la créatinine (de 22,8% en moyenne), et que celle-ci était réversible à l'arrêt du traitement. Cette étude révélait que l'augmentation de la créatinine sous vemurafenib était en rapport avec une inhibition de la sécrétion tubulaire de la créatinine et avec une légère altération de la fonction rénale (420). Une autre étude publiée très récemment, indépendante, d'un autre centre, réalisée chez 74 patients atteints d'un mélanome métastatique traités par vemurafenib en monothérapie, retrouvait une insuffisance rénale aiguë (définie dans cette étude par une augmentation X 1,5 du taux de créatinine de base) chez 59,5% des patients, prédominant chez les hommes (75%), et dont les 2/3 survenaient dans les 3 premiers mois de traitement ; le taux de réversibilité était de 80%, 3 mois après l'arrêt du traitement. Ces données confirment la fréquence élevée de cet effet indésirable, le plus souvent réversible, qui doit être surveillé mais qui ne nécessite pas le plus souvent de modification de dose ou d'arrêt du traitement (421).

Des études sont nécessaires pour confirmer ces résultats, déterminer une valeur seuil en deçà de laquelle la concentration plasmatique de vemurafenib serait prédictive de progression, et les mécanismes impliqués, notamment pharmacogénétiques, dans l'optique d'un possible ajustement de dose, en l'absence *a priori* d'augmentation du risque d'effets indésirables avec l'exposition au vemurafenib, avec pour but ultime l'optimisation de la réponse au traitement. Une étude des mécanismes expliquant la variabilité interindividuelle des CPV devra chercher à déterminer le rôle des polymorphismes de l'enzyme de glucoroconjugaison UDP glucuronosyltransférase 1A1, et des transporteurs P-gp et BCRP, ainsi qu'à analyser une relation entre la concentration plasmatique du vemurafenib glucoroconjugué avant et après glucoronidase avec la réponse anti-tumorale et la tolérance.

Cependant, l'ère de la monothérapie dans le traitement du mélanome métastatique muté *BRAF* V600 est résolument terminée, le traitement de référence aujourd'hui étant la combinaison par inhibiteurs de BRAF et de MEK ; ces études devront alors évaluer l'impact de la CPV sur la réponse au traitement combiné par vemurafenib et cobimetinib.

De plus, cela soulève la question de l'intérêt et de la faisabilité du suivi thérapeutique pharmacologique des autres thérapies ciblées que le vemurafenib.

Le dabrafenib a un métabolisme différent de celui du vemurafenib, mais l'excrétion biliaire est également importante. Le dabrafenib est métabolisé *via* les isozymes CYP2C8 et CYP3A en hydroxy-dabrafenib, qui est ensuite métabolisé par les isozymes CYP3A en carboxy-dabrafenib, qui est ensuite convertit en desmethyl-dabrafenib *via* un mécanisme de décarboxylation dépendant du pH (422). Les isozymes CYP3A sont impliquées dans le métabolisme du desmethyl-dabrafenib. L'hydroxy- et le desmethyl-dabrafenib circulant à des concentrations élevées, contribuent probablement à l'effet thérapeutique (métabolites actifs). L'excrétion fécale du dabrafenib et de ses métabolites est prédominante (71%) et, puisque l'absorption est élevée (95%), cela témoigne d'une excrétion biliaire importante qui pourrait se faire sous le contrôle de transporteurs, impliquant P-gp et BCRP. En effet, tout comme le vemurafenib, *in vitro*, le dabrafenib est un substrat de P-gp et de BCRP; le dabrafenib et son métabolite le desmethyl-dabrafenib sont des inhibiteurs de BCRP mais il n'est pas observé d'inhibition de P-gp par le dabrafenib ni par ses 3 principaux métabolites. Les enzymes de glucoroconjugaison sembleraient également être impliquées. Le bol

alimentaire diminue la biodisponibilité du dabrafenib et il est recommandé que les prises soient espacées des repas afin d'améliorer son absorption (423). La demi-vie du dabrafenib, de même que celle de son métabolite actif l'hydroxy-dabrafenib est courte, de 8 et 10 heures respectivement, alors que la demi-vie du desmethyl-dabrafenib est plus longue (21-22 heures). Toutefois, Ouellet *et al.* ont montré *via* une modélisation de la clairance du dabrafenib, que le métabolisme du dabrafenib fait intervenir un mécanisme d'autoinduction, ainsi, la demi-vie d'induction du dabrafenib est de 67 heures, et l'état d'équilibre des concentrations plasmatiques de dabrafenib n'est donc atteint qu'après 14 jours suivant l'administration (422).

De plus, la variabilité interindividuelle du dabrafenib et de l'hydroxy-dabrafenib est plus grande que celle du desmethyl-dabrafenib ; les concentrations plasmatiques de dabrafenib et d'hydroxy-dabrafenib sont corrélées de façon linéaire, ce qui n'est pas le cas pour les concentrations plasmatiques des autres métabolites (422). Par ailleurs, des concentrations plus basses de desmethyl-dabrafenib ont été observées en cas de poids élevé ou d'âge avancé. En revanche, alors que la prise concomitante de médicaments inhibiteurs du CYP3A augmenterait significativement les concentrations plasmatiques de dabrafenib et d'hydroxy-dabrafenib, cela n'affecterait en rien celle du desmethyl-dabrafenib (422). Ainsi, la variabilité interindividuelle observée du dabrafenib serait plutôt due à des interactions médicamenteuses ou à des prises au cours de repas gras qu'à des polymorphismes génétiques. En conclusion, le dosage du dabrafenib et de ses 2 métabolites actifs, réalisé à l'état d'équilibre au 14ème jour, en raison de l'auto-induction du dabrafenib, semble pertinent. L'interprétation de ces résultats devra prendre en compte les interactions médicamenteuses, la prise au cours de repas gras, le poids et l'âge.

D'après les données fournies par le laboratoire du dabrafenib et du trametinib, aucune relation n'a été retrouvée entre le taux de réponse et l'exposition au dabrafenib et de ces métabolites en monothérapie ou en traitement combiné avec le trametinib (424). La demi-vie du trametinib est de 127 heures, soit 5,3 jours. Il est principalement métabolisé par déacétylation seule, par mono-oxygénation, ou en association avec les voies de glucuronidation. L'oxydation par le CYP3A4 est considérée comme un une voie métabolique mineure (425).

Notre équipe réalise en routine des dosages des concentrations plasmatiques de dabrafenib, chez les patients traités par dabrafenib en monothérapie, et de dabrafenib et de trametinib chez les patients recevant le traitement combiné dabrafenib + trametinib ; l'analyse des données de ces concentrations sur la réponse thérapeutique et la tolérance n'a pas encore été réalisée.

Perspectives

Si notre hypothèse selon laquelle il existe bien des mécanismes influençant la concentration plasmatique des inhibiteurs de BRAF, voire de leurs métabolites actifs, et qu'une concentration basse des principes actifs est prédictive d'une progression tumorale, nous pourrions envisager un essai thérapeutique d'adaptation posologique en vue d'optimiser la concentration plasmatique des inhibiteurs de BRAF afin de déterminer si cela influence la réponse anti-tumorale, dans le cadre d'une thérapie combinée par inhibiteur de BRAF et de MEK (thérapie ciblée de référence). On pourrait également développer des tests génétiques prédictifs de concentrations plasmatiques élevées ou basses et donc éventuellement prédictifs de réponse (et/ou de mauvaise tolérance) aux inhibiteurs de BRAF.

Enfin, d'autres études seraient nécessaires pour identifier les mécanismes d'échappement liés au métabolisme de ces médicaments, indépendants de la tumeur et de l'apparition de néo-mutations intra-tumorales (inconstamment retrouvées). Ces mécanismes pouvant être responsables d'une résistance primaire ou secondaire (développement de mécanismes modifiant l'élimination ou le métabolisme des inhibiteurs de BRAF?).

DISCUSSION GENERALE / PERSPECTIVES

Depuis 2010, le traitement des patients atteints de mélanome métastatique a été bouleversé, passant de quasiment aucun traitement efficace à l'utilisation de thérapies ciblées et d'immunothérapies dont il a été prouvé qu'elles améliorent la survie de ces patients. De plus, l'arsenal thérapeutique ne cesse d'augmenter. En effet, alors qu'une nouvelle molécule arrivait environ chaque année depuis 2010, avec en chef de file l'ipililumab, puis le vemurafenib (2012), puis le dabrafenib (2013), puis le nivolumab (2014), l'année 2015 a été marquée par l'arrivée des thérapies ciblées combinées (dabrafenib + trametinib et vemurafenib + cobimetinib), et par l'arrivée du pembrolizumab, puis l'année 2016 par l'association de deux immunothérapies (ipilimumab + nivolumab). Et cela risque de s'accélérer de plus en plus ; une troisième combinaison d'inhibiteurs de BRAF et de MEK (encorafenib + binimetinib) est en cours d'essai et des essais évaluant l'association de thérapies ciblées combinées à des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires et/ou l'intérêt de traitements séquentiels sont en cours. De plus, de nombreux essais précliniques et cliniques précoces testent de nouvelles molécules inhibitrices ciblées.

C'est pourquoi, alors qu'il y a encore peu de temps, les possibilités de traitement du mélanome métastatique étaient peu diversifiées, nous allons de plus en plus devoir faire face à une véritable « stratégie » thérapeutique, avec pour but ultime plutôt qu'une médecine dite « personnalisée » (idéale), une médecine « optimisée », qui, selon la définition de l'Union Européenne, assure « le bon traitement pour le bon patient, à la bonne dose au bon moment » (426). On passe alors d'une approche classique, avec l'utilisation aveugle de médicaments couteux, inefficaces voire potentiellement dangereux chez certains patients, à une approche optimisée, qui nécessite alors d'identifier des sous-groupes de patients pour lesquels un traitement plutôt qu'un autre sera à privilégier (Figure 20).

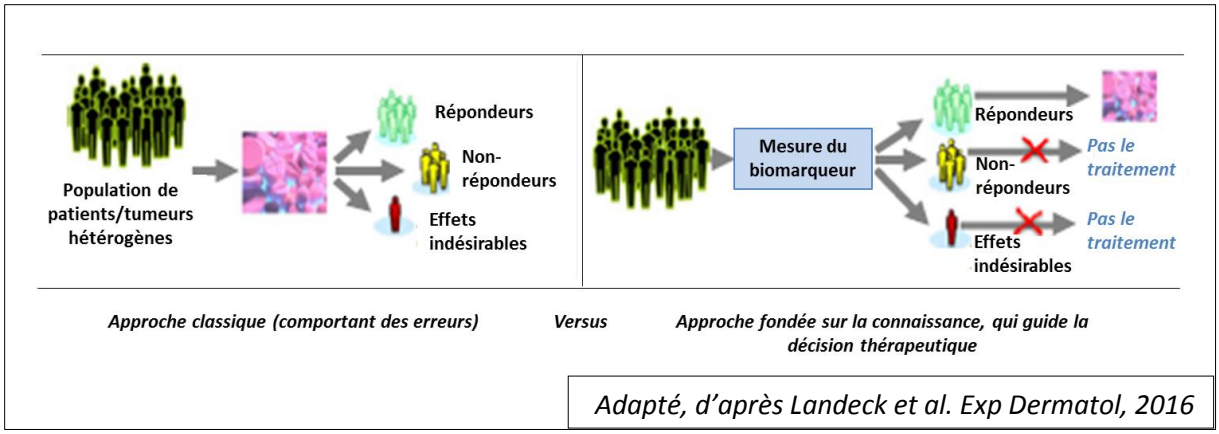


Figure 20. Concept général de la médecine « optimisée ».
Pour les thérapies ciblées, la variabilité biologique peut entraîner des résultats bénéfiques pour un sous-groupe de patients seulement. Avec l'approche classique, tous les patients reçoivent un médicament; en cas de biomarqueur pertinent, seul un sous-groupe de patients reçoit le médicament. Ainsi, les non-répondeurs potentiels, ou les patients présentant un risque élevé de développer un effet indésirable ne reçoivent pas le médicament.

Pour cela, il est donc indispensable d'identifier des marqueurs prédictifs de réponse au traitement.

Une caractéristique essentielle d'un biomarqueur est que sa mesure soit objective. Nous avons, à la fois pour la quantification de la CAM des oncogènes *BRAF* et *NRAS*, et pour la mesure de la CPV, mis au point des techniques robustes, reproductibles, fiables et justes.

De plus, un biomarqueur de réponse, pour être évalué à sa juste valeur, nécessite que la réponse elle-même soit bien évaluée, ou plutôt bien définie, ce qui implique que la définition de la progression métastatique sous traitement soit adaptée aux pratiques cliniques ou en tout cas ne soit pas toujours synonyme d'arrêt du traitement. En effet, une étude a montré l'intérêt de la poursuite du vemurafenib chez certains patients dont les métastases qui progressent sont accessibles à un traitement local (chirurgie ou radiothérapie) (219). Une autre étude a montré que les patients ayant poursuivi le traitement par vemurafenib malgré une progression avaient une meilleure survie globale que les patients qui avaient arrêté le traitement (379). Récemment, Zabor *et al.*, par l'analyse de données des patients inclus dans les études BRIM 2 et BRIM 3 (essais de phase II et de phase III ayant comparé le traitement par vemurafenib à la dacarbazine chez les patients avec un mélanome métastatique avancé muté *BRAF* V600), ont étudié différentes

définitions de la progression tumorale, et ont conclu que la durée de survie sans progression, lorsque la progression est définie par une augmentation de plus de 50% de la somme des diamètres de tumeurs ou par l'apparition de nouvelles lésions, était plus fortement corrélée à la survie globale que l'obtention d'une réponse précoce (quel que soit le degré de diminution de la masse tumorale) durant les 12 premières semaines de traitement (427). Cette étude soulève la question de la définition de la réponse à un traitement, et de la progression tumorale sous traitement. Ainsi, étudier les facteurs prédictifs de réponse à un traitement nécessite probablement de revoir la définition de la progression tumorale sous traitement selon les critères RECIST 1.1, qui correspond à une augmentation de plus 20% de la somme des diamètres de tumeurs ou à l'apparition de nouvelles lésions.

Les critères cliniques primaires d'évaluation du bénéfice d'un traitement anticancéreux sont l'amélioration de la survie globale, de la qualité de vie, et des symptômes liés à la tumeur (428). Tous les autres critères, tels que la survie sans progression, la diminution de la taille de la tumeur témoin de la proportion de la réponse, ou le suivi de biomarqueurs, sont considérés comme de potentiels critères de substitution qui peuvent ou non être corrélés avec les critères primaires (429). La proportion de la réponse, telle que définie par les critères RECIST (376), est couramment utilisée comme critère de substitution à la survie globale dans les essais cliniques. Cependant, la réponse de la tumeur évaluée par les critères RECIST n'est pas toujours un critère fiable (430, 431), d'une part en raison de l'utilisation d'examens d'imagerie de plus en plus performants, et d'autre part en raison de mécanismes d'action spécifiques de certains traitements, telles que les pseudo-progressions observées sous immunothérapies.

Le vemurafenib a été le premier traitement pour le mélanome qui a montré à la fois une forte proportion de réponse objective (251) et une amélioration significative de la survie globale dans un essai randomisé de phase III (218). Par conséquent, cet essai a fourni la première occasion (et probablement la dernière, en raison de la multitude de thérapies efficaces maintenant disponibles en cas de progression) pour évaluer la corrélation des critères de substitution tels que la réponse anti-tumorale et la survie sans progression avec la survie globale dans le mélanome. Dans leur étude reprenant les données des essais BRIM 2 et BRIM 3, Zabor *et al.* ont montré que le critère de survie sans progression était fortement

corrélé à la survie globale (427), ce qui avait déjà été montré dans une méta-analyse précédente portant sur 12 essais cliniques dans le mélanome (432). Contrairement à la survie globale, la survie sans progression à l'avantage de ne pas prendre en compte la survie induite par les traitements après la progression. Ascierto *et* Long ont récemment proposé que plutôt de s'intéresser à la survie sans progression médiane, qui peut sous-estimer la valeur d'un traitement chez les patients répondeurs, de s'intéresser aux taux de survie sans progression à des moments préétablis (à 1 an, 2 ans, 3 ans) (433).

Par ailleurs, la cinétique de progression tumorale est un potentiel marqueur de réponse et les profils de cinétique de progression doivent être identifiés car ils peuvent influencer aujourd'hui la stratégie thérapeutique. Il est souhaitable que ces profils soient intégrés dans les essais thérapeutiques afin de stratifier les patients, toujours dans le but d'une optimisation de la prise en charge thérapeutique (434). Ces profils de cinétique de progression peuvent être évalués avant le traitement, durant le traitement voire après le traitement pour aider à choisir le traitement suivant. En effet, une étude a rapporté qu'après l'arrêt du vemurafenib, plusieurs cinétiques de progression tumorale étaient observées, avec un tiers qui avait un taux de croissance tumorale stable, un tiers qui avait un taux de croissance accéléré et un tiers qui avait un taux de croissance ralenti (435). Cette dernière observation soulignait l'intérêt d'étudier, dans des essais cliniques, des thérapies ciblées intermittentes.

Outre les cinétiques de progression, une étude a montré que les différents profils de progression, selon que le patient a progressé sur des lésions déjà existantes, ou sur de nouvelles lésions, ou les deux, ou encore avec la survenue de métastases cérébrales, influencent la survie des patients après l'arrêt du traitement par inhibiteurs de BRAF et de MEK (436). Il a été montré, que sous vemurafenib en monothérapie, un taux initial sérique de LDH élevé, l'absence de normalisation du taux de LDH sous vemurafenib, un ECOG ≥ 2, et un délai entre le mélanome primitif et la maladie métastatique inférieur à 5 ans étaient des facteurs de mauvais pronostic après progression tumorale sous traitement (435).

En effet, il est important de déterminer chez quels patients une progression peut-elle être tolérée ou non. Par exemple, une concentration plasmatique faible de vemurafenib, chez un patient qui progresse, pourrait-être un argument pour de ne pas poursuivre ce traitement,

et de lui proposer une alternative thérapeutique. Toutefois, il est évident que seuls des essais cliniques ne pourront valider cette hypothèse.

Deux types de biomarqueurs de réponse au traitement peuvent être considérés, ceux que l'on considère au début de la maladie métastatique (biomarqueurs statiques), avant le début du traitement, et ceux que l'on évalue au cours du temps sous traitement (biomarqueurs dynamiques). Le statut mutationnel de *BRAF*, par exemple, est un biomarqueur statique, que l'on considère en début de traitement et qui ne va pas changer. De plus, même s'il peut varier au cours du temps, le taux sérique de LDH avant traitement, dont il a clairement été montré qu'il était un biomarqueur de la réponse aux thérapies ciblées combinées par inhibiteurs de BRAF et de MEK, à la fois pour la combinaison par dabrafenib + trametinib (384) et celle par vemurafenib + cobimetinib (437), peut être considéré comme un paramètre statique. Toutefois, le suivi de ce biomarqueur sous traitement (en tant que biomarqueur dynamique cette fois), peut se faire, mais il n'a pas été démontré qu'une augmentation du taux sérique de LDH était prédictive d'une progression, et ce biomarqueur a comme principal inconvénient sa faible spécificité.

De façon identique, la CAM des oncogènes *BRAF* et *NRAS*, peut soit être considérée comme un paramètre statique, en début de maladie métastatique, avant tout traitement, soit comme un paramètre dynamique, qui va évoluer sous la pression des traitements inhibiteurs. Notre étude clinique sur la CAM de *BRAF* de patients traités par inhibiteurs de BRAF a considéré la CAM des échantillons réalisés avant la mise sous traitement (biomarqueur statique). Cependant, nous avons montré que la CAM de *NRAS* pouvait augmenter durant la progression métastatique, de façon indépendante au traitement reçu. Cela avait également été rapporté pour *BRAF*, ce qui suggère que la CAM des oncogènes *BRAF* et *NRAS*, puisse aussi être évaluée durant le suivi des patients, avant traitement puis sous traitement. Les nouvelles techniques de détection d'ADN tumoral circulant et de cellules tumorales circulantes, qui ont l'avantage de refléter l'hétérogénéité tumorale intra-individuelle et d'être non invasives, pourraient tout à fait être utilisées pour la mesure de la CAM des oncogènes sous traitement. De plus, notre étude clinique sur la valeur pronostique de la CAM de *NRAS*, qui n'a pas montré d'impact sur la survie, ne prenait pas en compte le moment de la réalisation de la mesure de la CAM, puisque seule la valeur la plus élevée de CAM de *NRAS* était retenue, quel que soit type de prélèvement (primitif, métastase, avant

ou après traitement), ce qui peut comporter un biais, mais qui aurait *a priori* été en faveur d'une augmentation de la CAM pour les échantillons métastatiques ; or la fréquence des prélèvements provenant de mélanomes primitifs et de métastases étaient la même dans les deux groupes (p = 0,97).

D'autres études cliniques sont nécessaires, avec de plus larges effectifs, et des critères précis sur la nature du prélèvement (primitif, métastase) qui doit être utilisé pour explorer d'une part la valeur pronostique de la CAM, à la fois de *BRAF* et de *NRAS*, indépendamment de tout traitement, et d'autre part la valeur prédictive de la réponse aux thérapies ciblées, étant aujourd'hui la thérapie combinée par inhibiteurs de BRAF et de MEK pour les mélanomes mutés *BRAF* V600 et, demain peut-être les inhibiteurs de MEK pour les mélanomes mutés *NRAS* Q61.

Une approche également intéressante serait d'utiliser un modèle de xénogreffes de tumeurs dérivées de patients sur des souris immunodéprimées (type NOG), tel qu'il a été décrit par une équipe suédoise (438), au sein de laquelle il est prévu que je poursuive mes travaux de recherche. L'analyse de biologie moléculaire des tumeurs de patients, avant la xénogreffe et avant traitement, pourra se faire par NGS, ce qui permettra de déterminer de façon très précise la CAM de *BRAF* V600 ou de *NRAS* Q61, mais également de rechercher des mutations sur les gènes de résistances primaires aux inhibiteurs de la voie MAPK. Puis, les souris xénogreffées pourront recevoir le traitement par inhibiteurs de BRAF et/ou de MEK, et la réponse tumorale pourra être évaluée par la mesure de la taille des tumeurs et par des marqueurs sanguins (protéine S100B, MIA). Une corrélation entre les réponses tumorales et la CAM, et notamment le statut homozygote, pourra être recherchée. Les tumeurs sous traitement pourront être analysées par NGS pour suivre la valeur de la CAM. Pour celles qui progressent, les mécanismes de résistance, ainsi que les mécanismes épigénétiques, pourront être recherchés. Les tumeurs mutées *BRAF* qui sont stables ou qui régressent pourront être analysées en fonction de leur statut homozygote de *BRAF* ou non, par immunohistochimie pour évaluer l'inhibition de la voie MAPK (absence ou diminution du marquage de phospho-ERK), et par la technique de PLA (*proximity ligation assays*) décrite récemment par Boussemart *et al.* (225), pour évaluer le niveau d'hétérodimères CRAF-BRAF sauvage. Un telle étude permettra ainsi de confirmer notre hypothèse que l'homozygotie de BRAF serait associée à une diminution de la protéine BRAF sauvage, diminuant ainsi le

niveau des hétérodimères CRAF-BRAF, à l'origine d'une absence d'activation paradoxale de la voie MAPK, et apportant ainsi une explication possible de la meilleure sensibilité des tumeurs homozygotes au traitement.

De même que nous avons été parmi les premières équipes à nous intéresser à la CAM des oncogènes dans le mélanome, nous avons été les premiers à rapporter nos résultats concernant un nouveau potentiel marqueur de réponse, pharmacologique cette fois, la CPV. Les résultats des différentes études exposées sur la potentielle valeur prédictive de la CPV sur la progression tumorale apportent un point de vue nouveau du concept de marqueur de réponse aux thérapies ciblées, qui ne dépend pas seulement de la tumeur elle-même et notamment de la biologie de la tumeur, mais également de l'interaction entre l'individu (son métabolisme) et le médicament. Il s'agit ici d'un biomarqueur dynamique, dont le suivi thérapeutique pharmacologique, non invasif, est facilement réalisable en pratique clinique. Toutefois, de nombreuses pistes de recherche sont encore à explorer dans ce domaine, concernant les mécanismes pharmacogénétiques impliqués, mais aussi la détermination d'une valeur de concentration seuil, sur laquelle nous avons insisté, et également concernant l'impact du suivi des concentrations des autres inhibiteurs, et de leurs métabolites.

Enfin, la validation d'un marqueur prédictif de réponse au traitement implique de vérifier si cette réponse est indépendante d'autres paramètres connus pour être prédictifs de la réponse. A ce jour, les paramètres connus pour être associés à une meilleure survie sans récidive et une meilleure survie globale chez les patients traités par inhibiteurs de BRAF et de MEK (dabrafenib + trametinib et vemurafenib + cobimetinib) sont, en début de traitement, un taux sérique normal de LDH, le nombre de site métastatique inférieur à 3, et un ECOG à 0 (436, 437). L'absence de métastase cérébrale intervient également. Ces paramètres sont également des facteurs de bon pronostic du mélanome métastatique indépendamment de tout traitement. Toutefois, même chez les patients ne présentant pas ces critères, un bénéfice du traitement a été démontré.

Les études ultérieures qui analyseront la valeur prédictive de la CAM des oncogènes *BRAF* et *NRAS*, ou des concentrations plasmatiques des inhibiteurs de la voie MAPK devront être constituées de séries prospectives de patients homogènes, qui devront intégrer ces

paramètres afin de réaliser une analyse multivariée, en aveugle, de la manière la plus objective possible, dans le but de déterminer si les nouveaux biomarqueurs prédictifs que nous proposons sont indépendants ou non des biomarqueurs déjà connus. Une même série de patients pourra être utilisée pour l'analyse de la CAM des oncogènes, et pour l'analyse des concentrations plasmatiques ; ces deux paramètres pourront alors ensuite être analysés en analyse univariée, puis éventuellement en analyse multivariée, même si nous suspectons théoriquement *a priori* que ces deux paramètres sont totalement indépendants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schuz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW, et al. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk? Int J Cancer. 2013;132(2):385-400.
2. Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. J Invest Dermatol. 2016;136(6):1161-71.
3. Czarnecki D. The relentless rise in the incidence of melanoma in susceptible Australians. J Invest Dermatol. 2016.
4. Baade PD, Youlden DR, Youl P, Kimlin M, Sinclair C, Aitken J. Assessment of the effect of migration on melanoma incidence trends in Australia between 1982 and 2010 among people under 30. Acta Derm Venereol. 2015;95(1):118-20.
5. Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. The relentless rise in the incidence of melanoma in susceptible Australians - Response. J Invest Dermatol. 2016.
6. Swerlick RA, Chen S. The melanoma epidemic. Is increased surveillance the solution or the problem? Arch Dermatol. 1996;132(8):881-4.
7. Welch HG, Woloshin S, Schwartz LM. Skin biopsy rates and incidence of melanoma: population based ecological study. Bmj. 2005;331(7515):481.
8. Bataille V, de Vries E. Melanoma--Part 1: epidemiology, risk factors, and prevention. Bmj. 2008;337:a2249.
9. Les Cancers en France. Edition 2014 - Institut National Du Cancer. 2014.
10. Hanly P, Soerjomataram I, Sharp L. Measuring the societal burden of cancer: the cost of lost productivity due to premature cancer-related mortality in Europe. Int J Cancer. 2015;136(4):E136-45.
11. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol. 2009;27(36):6199-206.
12. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, et al. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. N Engl J Med. 2014;370(7):599-609.
13. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. N Engl J Med. 2015;372(1):30-9.
14. McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. Lancet Oncol. 2014;15(3):323-32.
15. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. Lancet. 2015;386(9992):444-51.
16. Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, Atkinson V, Liszkay G, Maio M, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. N Engl J Med. 2014;371(20):1867-76.
17. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. N Engl J Med. 2015;372(4):320-30.
18. Ribas A, Puzanov I, Dummer R, Schadendorf D, Hamid O, Robert C, et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. Lancet Oncol. 2015;16(8):908-18.
19. Maio M, Grob JJ, Aamdal S, Bondarenko I, Robert C, Thomas L, et al. Five-year survival rates for treatment-naive patients with advanced melanoma who received ipilimumab plus dacarbazine in a phase III trial. J Clin Oncol. 2015;33(10):1191-6.

20. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. Eur J Cancer. 2005;41(14):2040-59.
21. Vink AA, Roza L. Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers. J Photochem Photobiol B. 2001;65(2-3):101-4.
22. Crombie IK. Variation of melanoma incidence with latitude in North America and Europe. Br J Cancer. 1979;40(5):774-81.
23. Green AC, Williams GM, Logan V, Strutton GM. Reduced melanoma after regular sunscreen use: randomized trial follow-up. J Clin Oncol. 2011;29(3):257-63.
24. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. Eur J Cancer. 2005;41(1):45-60.
25. Wu S, Cho E, Li WQ, Weinstock MA, Han J, Qureshi AA. History of Severe Sunburn and Risk of Skin Cancer Among Women and Men in 2 Prospective Cohort Studies. Am J Epidemiol. 2016;183(9):824-33.
26. Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, De Gruijl FR, Bouwes Bavinck JN. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. J Invest Dermatol. 2003;120(6):1087-93.
27. Boniol M, Autier P, Boyle P, Gandini S. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. Bmj. 2012;345:e4757.
28. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. Int J Cancer. 2007;120(5):1116-22.
29. Elwood JM, Gallagher RP. Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun exposure. Int J Cancer. 1998;78(3):276-80.
30. Lachiewicz AM, Berwick M, Wiggins CL, Thomas NE. Epidemiologic support for melanoma heterogeneity using the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. J Invest Dermatol. 128. United States2008. p. 243-5.
31. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. Nat Rev Cancer. 2016;16(6):345-58.
32. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. Cell. 150. United States: 2012 Elsevier Inc; 2012. p. 251-63.
33. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. Nature. 2013;499(7457):214-8.
34. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. Cell. 2015;161(7):1681-96.
35. Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. Science. 2014;346(6212):945-9.
36. Florell SR, Boucher KM, Garibotti G, Astle J, Kerber R, Mineau G, et al. Population-based analysis of prognostic factors and survival in familial melanoma. J Clin Oncol. 2005;23(28):7168-77.
37. Anderson DE, Badzioch MD. Hereditary cutaneous malignant melanoma: a 20-year family update. Anticancer Res. 1991;11(1):433-7.
38. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, Demenais F, Bishop DT, et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. J Med Genet. 2007;44(2):99-106.
39. Puig S, Malvehy J, Badenas C, Ruiz A, Jimenez D, Cuellar F, et al. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. J Clin Oncol. 2005;23(13):3043-51.
40. Levi F, Randimbison L, Te VC, La Vecchia C. High constant incidence rates of second cutaneous melanomas. Int J Cancer. 2005;117(5):877-9.
41. Ferrone CR, Ben Porat L, Panageas KS, Berwick M, Halpern AC, Patel A, et al. Clinicopathological features of and risk factors for multiple primary melanomas. Jama. 2005;294(13):1647-54.
42. Avril MF, Bahadoran P, Cabaret O, Caron O, de la Fouchardiere A, Demenais F, et al. [Recommendations for genetic testing and management of individuals genetically at-risk of cutaneous melanoma]. Ann Dermatol Venereol. 2015;142(1):26-36.

43. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. Nat Genet. 1994;8(1):15-21.
44. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Gillanders EM, Hayward NK, Avril MF, et al. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. Cancer Res. 2006;66(20):9818-28.
45. Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Bressac-de Paillerets B, et al. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. J Natl Cancer Inst. 2002;94(12):894-903.
46. Maubec E, Chaudru V, Mohamdi H, Blondel C, Margaritte-Jeannin P, Forget S, et al. Familial melanoma: clinical factors associated with germline CDKN2A mutations according to the number of patients affected by melanoma in a family. J Am Acad Dermatol. 2012;67(6):1257-64.
47. Auroy S, Avril MF, Chompret A, Pham D, Goldstein AM, Bianchi-Scarra G, et al. Sporadic multiple primary melanoma cases: CDKN2A germline mutations with a founder effect. Genes Chromosomes Cancer. 2001;32(3):195-202.
48. Harland M, Cust AE, Badenas C, Chang YM, Holland EA, Aguilera P, et al. Prevalence and predictors of germline CDKN2A mutations for melanoma cases from Australia, Spain and the United Kingdom. Hered Cancer Clin Pract. 2014;12(1):20.
49. Potrony M, Puig-Butille JA, Aguilera P, Badenas C, Carrera C, Malvehy J, et al. Increased prevalence of lung, breast, and pancreatic cancers in addition to melanoma risk in families bearing the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A mutation: implications for genetic counseling. J Am Acad Dermatol. 2014;71(5):888-95.
50. Borg A, Sandberg T, Nilsson K, Johannsson O, Klinker M, Masback A, et al. High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. J Natl Cancer Inst. 2000;92(15):1260-6.
51. Helgadottir H, Hoiom V, Jonsson G, Tuominen R, Ingvar C, Borg A, et al. High risk of tobacco-related cancers in CDKN2A mutation-positive melanoma families. J Med Genet. 2014;51(8):545-52.
52. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. Nat Genet. 1996;12(1):97-9.
53. Puntervoll HE, Yang XR, Vetti HH, Bachmann IM, Avril MF, Benfodda M, et al. Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. J Med Genet. 2013;50(4):264-70.
54. Carbone M, Yang H, Pass HI, Krausz T, Testa JR, Gaudino G. BAP1 and cancer. Nat Rev Cancer. 2013;13(3):153-9.
55. Popova T, Hebert L, Jacquemin V, Gad S, Caux-Moncoutier V, Dubois-d'Enghien C, et al. Germline BAP1 mutations predispose to renal cell carcinomas. Am J Hum Genet. 2013;92(6):974-80.
56. Andrici J, Goeppert B, Sioson L, Clarkson A, Renner M, Stenzinger A, et al. Loss of BAP1 Expression Occurs Frequently in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. Medicine (Baltimore). 2016;95(2):e2491.
57. McDonnell KJ, Gallanis GT, Heller KA, Melas M, Idos GE, Culver JO, et al. A novel BAP1 mutation is associated with melanocytic neoplasms and thyroid cancer. Cancer Genet. 2016;209(3):75-81.
58. de la Fouchardiere A, Cabaret O, Savin L, Combemale P, Schvartz H, Penet C, et al. Germline BAP1 mutations predispose also to multiple basal cell carcinomas. Clin Genet. 2015;88(3):273-7.
59. Read J, Wadt KA, Hayward NK. Melanoma genetics. J Med Genet. 2016;53(1):1-14.
60. Potrony M, Badenas C, Aguilera P, Puig-Butille JA, Carrera C, Malvehy J, et al. Update in genetic susceptibility in melanoma. Ann Transl Med. 2015;3(15):210.
61. Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, Strub T, de Lichy M, Bille K, et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. Nature. 2011;480(7375):94-8.
62. Ghiorzo P, Pastorino L, Queirolo P, Bruno W, Tibiletti MG, Nasti S, et al. Prevalence of the E318K MITF germline mutation in Italian melanoma patients: associations with histological subtypes and family cancer history. Pigment Cell Melanoma Res. 2013;26(2):259-62.

63. Hu HH, Kannengiesser C, Lesage S, Andre J, Mourah S, Michel L, et al. PARKIN Inactivation Links Parkinson's Disease to Melanoma. J Natl Cancer Inst. 2016;108(3).
64. Bradford PT, Goldstein AM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle J, et al. Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterises the role of DNA repair. J Med Genet. 2011;48(3):168-76.
65. Wang Y, Digiovanna JJ, Stern JB, Hornyak TJ, Raffeld M, Khan SG, et al. Evidence of ultraviolet type mutations in xeroderma pigmentosum melanomas. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(15):6279-84.
66. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. Nat Genet. 2003;33(1):19-20.
67. Shitara D, Nascimento MM, Puig S, Yamada S, Enokihara MM, Michalany N, et al. Nevus-associated melanomas: clinicopathologic features. Am J Clin Pathol. 2014;142(4):485-91.
68. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. Eur J Cancer. 2005;41(1):28-44.
69. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. Arch Dermatol. 1988;124(6):869-71.
70. Rees JL. Genetics of hair and skin color. Annu Rev Genet. 2003;37:67-90.
71. Bafounta ML, Beauchet A, Aegerter P, Saiag P. Is dermoscopy (epiluminescence microscopy) useful for the diagnosis of melanoma? Results of a meta-analysis using techniques adapted to the evaluation of diagnostic tests. Arch Dermatol. 2001;137(10):1343-50.
72. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. Lancet Oncol. 2002;3(3):159-65.
73. Johr RH. Dermoscopy: alternative melanocytic algorithms-the ABCD rule of dermatoscopy, Menzies scoring method, and 7-point checklist. Clin Dermatol. 2002;20(3):240-7.
74. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. Genes Dev. 2012;26(11):1131-55.
75. McArthur GA, Ribas A. Targeting oncogenic drivers and the immune system in melanoma. J Clin Oncol. 2013;31(4):499-506.
76. Kim SY, Kim SN, Hahn HJ, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Metaanalysis of BRAF mutations and clinicopathologic characteristics in primary melanoma. J Am Acad Dermatol. 2015;72(6):1036-46.e2.
77. Devitt B, Liu W, Salemi R, Wolfe R, Kelly J, Tzen CY, et al. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2011;24(4):666-72.
78. Krauthammer M, Kong Y, Bacchiocchi A, Evans P, Pornputtapong N, Wu C, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. Nat Genet. 2015;47(9):996-1002.
79. Maertens O, Johnson B, Hollstein P, Frederick DT, Cooper ZA, Messiaen L, et al. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. Cancer Discov. 2013;3(3):338-49.
80. Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, Ramirez R, Won H, Liu C, et al. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. Cancer Res. 2014;74(8):2340-50.
81. Ranzani M, Alifrangis C, Perna D, Dutton-Regester K, Pritchard A, Wong K, et al. BRAF/NRAS wild-type melanoma, NF1 status and sensitivity to trametinib. Pigment Cell Melanoma Res. 2015;28(1):117-9.
82. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. J Clin Oncol. 2006;24(26):4340-6.
83. Hodi FS, Friedlander P, Corless CL, Heinrich MC, Mac Rae S, Kruse A, et al. Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. J Clin Oncol. 2008;26(12):2046-51.
84. Satzger I, Kuttler U, Volker B, Schenck F, Kapp A, Gutzmer R. Anal mucosal melanoma with KIT-activating mutation and response to imatinib therapy--case report and review of the literature. Dermatology. 2010;220(1):77-81.

85. Lutzky J, Bauer J, Bastian BC. Dose-dependent, complete response to imatinib of a metastatic mucosal melanoma with a K642E KIT mutation. Pigment Cell Melanoma Res. 21. England2008. p. 492-3.
86. Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. Jama. 2011;305(22):2327-34.
87. Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X, Zhu Y, et al. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. J Clin Oncol. 2011;29(21):2904-9.
88. Hodi FS, Corless CL, Giobbie-Hurder A, Fletcher JA, Zhu M, Marino-Enriquez A, et al. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. J Clin Oncol. 2013;31(26):3182-90.
89. Woodman SE, Trent JC, Stemke-Hale K, Lazar AJ, Pricl S, Pavan GM, et al. Activity of dasatinib against L576P KIT mutant melanoma: molecular, cellular, and clinical correlates. Mol Cancer Ther. 2009;8(8):2079-85.
90. Carvajal RD, Lawrence DP, Weber JS, Gajewski TF, Gonzalez R, Lutzky J, et al. Phase II Study of Nilotinib in Melanoma Harboring KIT Alterations Following Progression to Prior KIT Inhibition. Clin Cancer Res. 2015;21(10):2289-96.
91. Buchbinder EI, Sosman JA, Lawrence DP, McDermott DF, Ramaiya NH, Van den Abbeele AD, et al. Phase 2 study of sunitinib in patients with metastatic mucosal or acral melanoma. Cancer. 2015;121(22):4007-15.
92. Minor DR, Kashani-Sabet M, Garrido M, O'Day SJ, Hamid O, Bastian BC. Sunitinib therapy for melanoma patients with KIT mutations. Clin Cancer Res. 2012;18(5):1457-63.
93. Quintas-Cardama A, Lazar AJ, Woodman SE, Kim K, Ross M, Hwu P. Complete response of stage IV anal mucosal melanoma expressing KIT Val560Asp to the multikinase inhibitor sorafenib. Nat Clin Pract Oncol. 2008;5(12):737-40.
94. Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, Deribe YL, Lawrence MS, Protopopov A, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. Nature. 2012;485(7399):502-6.
95. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. Nat Genet. 2012;44(9):1006-14.
96. Mar VJ, Wong SQ, Logan A, Nguyen T, Cebon J, Kelly JW, et al. Clinical and pathological associations of the activating RAC1 P29S mutation in primary cutaneous melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2014;27(6):1117-25.
97. Davis MJ, Ha BH, Holman EC, Halaban R, Schlessinger J, Boggon TJ. RAC1P29S is a spontaneously activating cancer-associated GTPase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(3):912-7.
98. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Cancer Res. 1969;29(3):705-27.
99. Lyth J, Mikiver R, Nielsen K, Isaksson K, Ingvar C. Prognostic instrument for survival outcome in melanoma patients: based on data from the population-based Swedish Melanoma Register. Eur J Cancer. 2016;59:171-8.
100. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. N Engl J Med. 2005;353(20):2135-47.
101. Pracht M, Mogha A, Lespagnol A, Fautrel A, Mouchet N, Le Gall F, et al. Prognostic and predictive values of oncogenic BRAF, NRAS, c-KIT and MITF in cutaneous and mucous melanoma. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015;29(8):1530-8.
102. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002;417(6892):949-54.
103. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. J Clin Oncol. 2011;29(10):1239-46.

104. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. Br J Dermatol. 2011;164(4):776-84.
105. Edlundh-Rose E, Egyhazi S, Omholt K, Mansson-Brahme E, Platz A, Hansson J, et al. NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. Melanoma Res. 2006;16(6):471-8.
106. Meckbach D, Bauer J, Pflugfelder A, Meier F, Busch C, Eigentler TK, et al. Survival according to BRAF-V600 tumor mutations--an analysis of 437 patients with primary melanoma. PLoS One. 2014;9(1):e86194.
107. Akslen LA, Angelini S, Straume O, Bachmann IM, Molven A, Hemminki K, et al. BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are not associated with tumor cell proliferation or patient survival. J Invest Dermatol. 2005;125(2):312-7.
108. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. J Natl Cancer Inst. 2003;95(24):1878-90.
109. Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, Warneke CL, Johnson MM, Cooke CP, et al. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. Clin Cancer Res. 2011;17(2):229-35.
110. Nagore E, Requena C, Traves V, Guillen C, Hayward NK, Whiteman DC, et al. Prognostic value of BRAF mutations in localized cutaneous melanoma. J Am Acad Dermatol. 2014;70(5):858-62.e1-2.
111. Mar VJ, Liu W, Devitt B, Wong SQ, Dobrovic A, McArthur GA, et al. The role of BRAF mutations in primary melanoma growth rate and survival. Br J Dermatol. 2015;173(1):76-82.
112. Thomas NE, Edmiston SN, Alexander A, Groben PA, Parrish E, Kricker A, et al. Association Between NRAS and BRAF Mutational Status and Melanoma-Specific Survival Among Patients With Higher-Risk Primary Melanoma. JAMA Oncol. 2015;1(3):359-68.
113. Hugdahl E, Kalvenes MB, Puntervoll HE, Ladstein RG, Akslen LA. BRAF-V600E expression in primary nodular melanoma is associated with aggressive tumour features and reduced survival. Br J Cancer. 2016;114(7):801-8.
114. Ortega-Martinez I, Gardeazabal J, Erramuzpe A, Sanchez-Diez A, Cortes J, Garcia-Vazquez MD, et al. Vitronectin and dermcidin serum levels predict the metastatic progression of AJCC I-II early stage melanoma. Int J Cancer. 2016.
115. Schmidt H, Johansen JS, Sjoegren P, Christensen IJ, Sorensen BS, Fode K, et al. Serum YKL-40 predicts relapse-free and overall survival in patients with American Joint Committee on Cancer stage I and II melanoma. J Clin Oncol. 2006;24(5):798-804.
116. Fleming NH, Zhong J, da Silva IP, Vega-Saenz de Miera E, Brady B, Han SW, et al. Serum-based miRNAs in the prediction and detection of recurrence in melanoma patients. Cancer. 2015;121(1):51-9.
117. Kanemaru H, Fukushima S, Yamashita J, Honda N, Oyama R, Kakimoto A, et al. The circulating microRNA-221 level in patients with malignant melanoma as a new tumor marker. J Dermatol Sci. 2011;61(3):187-93.
118. Guo S, Guo W, Li S, Dai W, Zhang N, Zhao T, et al. Serum miR-16: A Potential Biomarker for Predicting Melanoma Prognosis. J Invest Dermatol. 2016;136(5):985-93.
119. Gimotty PA, Van Belle P, Elder DE, Murry T, Montone KT, Xu X, et al. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. J Clin Oncol. 2005;23(31):8048-56.
120. Caudron A, Battistella M, Feugeas JP, Pages C, Basset-Seguin N, Mazouz Dorval S, et al. EMMPRIN/CD147 is an independent prognostic biomarker in cutaneous melanoma. Exp Dermatol. 2016.
121. Pinheiro C, Miranda-Goncalves V, Longatto-Filho A, Vicente AL, Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, et al. The metabolic microenvironment of melanomas: Prognostic value of MCT1 and MCT4. Cell Cycle. 2016:1-9.
122. McConnell AT, Ellis R, Pathy B, Plummer R, Lovat PE, O'Boyle G. The prognostic significance and impact of the CXCR4/CXCR7/CXCL12 axis in primary cutaneous melanoma. Br J Dermatol. 2016.

123. Garg K, Maurer M, Griss J, Bruggen MC, Wolf IH, Wagner C, et al. Tumor associated B cells in cutaneous primary melanoma and improved clinical outcome. Hum Pathol. 2016.
124. Altman DG, McShane LM, Sauerbrei W, Taube SE. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): explanation and elaboration. PLoS Med. 2012;9(5):e1001216.
125. Mervic L. Prognostic factors in patients with localized primary cutaneous melanoma. Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat. 2012;21(2):27-31.
126. Joosse A, Collette S, Suciu S, Nijsten T, Lejeune F, Kleeberg UR, et al. Superior outcome of women with stage I/II cutaneous melanoma: pooled analysis of four European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trials. J Clin Oncol. 2012;30(18):2240-7.
127. Joosse A, van der Ploeg AP, Haydu LE, Nijsten TE, de Vries E, Scolyer RA, et al. Sex differences in melanoma survival are not related to mitotic rate of the primary tumor. Ann Surg Oncol. 2015;22(5):1598-603.
128. Lens MB, Rosdahl I, Ahlbom A, Farahmand BY, Synnerstad I, Boeryd B, et al. Effect of pregnancy on survival in women with cutaneous malignant melanoma. J Clin Oncol. 2004;22(21):4369-75.
129. Johansson AL, Andersson TM, Plym A, Ullenhag GJ, Moller H, Lambe M. Mortality in women with pregnancy-associated malignant melanoma. J Am Acad Dermatol. 2014;71(6):1093-101.
130. Bernengo MG, Reali UM, Doveil GC, Cappello N, Lisa F, Moretti S. BANS: a discussion of the problem. Melanoma Res. 1992;2(3):157-62.
131. Gandini S, Montella M, Ayala F, Benedetto L, Rossi CR, Vecchiato A, et al. Sun exposure and melanoma prognostic factors. Oncol Lett. 2016;11(4):2706-14.
132. Mandala M, Imberti GL, Piazzalunga D, Belfiglio M, Lucisano G, Labianca R, et al. Association of socioeconomic status with Breslow thickness and disease-free and overall survival in stage I-II primary cutaneous melanoma. Mayo Clin Proc. 2011;86(2):113-9.
133. Berwick M, Armstrong BK, Ben-Porat L, Fine J, Kricker A, Eberle C, et al. Sun exposure and mortality from melanoma. J Natl Cancer Inst. 2005;97(3):195-9.
134. Rosso S, Sera F, Segnan N, Zanetti R. Sun exposure prior to diagnosis is associated with improved survival in melanoma patients: results from a long-term follow-up study of Italian patients. Eur J Cancer. 2008;44(9):1275-81.
135. Berwick M, Reiner AS, Paine S, Armstrong BK, Kricker A, Goumas C, et al. Sun exposure and melanoma survival: a GEM study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014;23(10):2145-52.
136. Egan KM, Sosman JA, Blot WJ. Sunlight and reduced risk of cancer: is the real story vitamin D? J Natl Cancer Inst. 97. United States2005. p. 161-3.
137. Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. Arch Intern Med. 2007;167(16):1730-7.
138. Randerson-Moor JA, Taylor JC, Elliott F, Chang YM, Beswick S, Kukalizch K, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms, serum 25-hydroxyvitamin D levels, and melanoma: UK case-control comparisons and a meta-analysis of published VDR data. Eur J Cancer. 2009;45(18):3271-81.
139. Zittermann A, Iodice S, Pilz S, Grant WB, Bagnardi V, Gandini S. Vitamin D deficiency and mortality risk in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. Am J Clin Nutr. 2012;95(1):91-100.
140. Raimondi S, Johansson H, Maisonneuve P, Gandini S. Review and meta-analysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk. Carcinogenesis. 2009;30(7):1170-80.
141. Gandini S, Boniol M, Haukka J, Byrnes G, Cox B, Sneyd MJ, et al. Meta-analysis of observational studies of serum 25-hydroxyvitamin D levels and colorectal, breast and prostate cancer and colorectal adenoma. Int J Cancer. 2011;128(6):1414-24.
142. Newton-Bishop JA, Beswick S, Randerson-Moor J, Chang YM, Affleck P, Elliott F, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels are associated with breslow thickness at presentation and survival from melanoma. J Clin Oncol. 2009;27(32):5439-44.
143. Saiag P, Aegerter P, Vitoux D, Lebbe C, Wolkenstein P, Dupin N, et al. Prognostic Value of 25-hydroxyvitamin D3 Levels at Diagnosis and During Follow-up in Melanoma Patients. J Natl Cancer Inst. 2015;107(12).

144. Saiag P, Aegerter P, Boniol M. Response. J Natl Cancer Inst. 2016;108(4).
145. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. J Clin Oncol. 2001;19(16):3635-48.
146. van der Ploeg AP, van Akkooi AC, Rutkowski P, Nowecki ZI, Michej W, Mitra A, et al. Prognosis in patients with sentinel node-positive melanoma is accurately defined by the combined Rotterdam tumor load and Dewar topography criteria. J Clin Oncol. 2011;29(16):2206-14.
147. Rao UN, Ibrahim J, Flaherty LE, Richards J, Kirkwood JM. Implications of microscopic satellites of the primary and extracapsular lymph node spread in patients with high-risk melanoma: pathologic corollary of Eastern Cooperative Oncology Group Trial E1690. J Clin Oncol. 2002;20(8):2053-7.
148. Moreau S, Saiag P, Aegerter P, Bosset D, Longvert C, Helias-Rodzewicz Z, et al. Prognostic value of BRAF(V(6)(0)(0)) mutations in melanoma patients after resection of metastatic lymph nodes. Ann Surg Oncol. 2012;19(13):4314-21.
149. Barbour AP, Tang YH, Armour N, Dutton-Regester K, Krause L, Loffler KA, et al. BRAF mutation status is an independent prognostic factor for resected stage IIIB and IIIC melanoma: implications for melanoma staging and adjuvant therapy. Eur J Cancer. 2014;50(15):2668-76.
150. Mann GJ, Pupo GM, Campain AE, Carter CD, Schramm SJ, Pianova S, et al. BRAF mutation, NRAS mutation, and the absence of an immune-related expressed gene profile predict poor outcome in patients with stage III melanoma. J Invest Dermatol. 2013;133(2):509-17.
151. Bogunovic D, O'Neill DW, Belitskaya-Levy I, Vacic V, Yu YL, Adams S, et al. Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(48):20429-34.
152. Mihm MC, Jr., Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. Lab Invest. 1996;74(1):43-7.
153. John T, Black MA, Toro TT, Leader D, Gedye CA, Davis ID, et al. Predicting clinical outcome through molecular profiling in stage III melanoma. Clin Cancer Res. 2008;14(16):5173-80.
154. Jacquelot N, Roberti MP, Enot DP, Rusakiewicz S, Semeraro M, Jegou S, et al. Immunophenotyping of Stage III Melanoma Reveals Parameters Associated with Patient Prognosis. J Invest Dermatol. 2016;136(5):994-1001.
155. Joosse A, Collette S, Suciu S, Nijsten T, Patel PM, Keilholz U, et al. Sex is an independent prognostic indicator for survival and relapse/progression-free survival in metastasized stage III to IV melanoma: a pooled analysis of five European organisation for research and treatment of cancer randomized controlled trials. J Clin Oncol. 2013;31(18):2337-46.
156. Balch CM, Balch GC, Sharma RR. Identifying early melanomas at higher risk for metastases. J Clin Oncol. 30. United States2012. p. 1406-7.
157. Falchook GS, Long GV, Kurzrock R, Kim KB, Arkenau TH, Brown MP, et al. Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. Lancet. 2012;379(9829):1893-901.
158. Long GV, Trefzer U, Davies MA, Kefford RF, Ascierto PA, Chapman PB, et al. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol. 2012;13(11):1087-95.
159. Neuman HB, Patel A, Ishill N, Hanlon C, Brady MS, Halpern AC, et al. A single-institution validation of the AJCC staging system for stage IV melanoma. Ann Surg Oncol. 2008;15(7):2034-41.
160. Barth A, Wanek LA, Morton DL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. J Am Coll Surg. 1995;181(3):193-201.
161. Balch CM, Soong SJ, Murad TM, Smith JW, Maddox WA, Durant JR. A multifactorial analysis of melanoma. IV. Prognostic factors in 200 melanoma patients with distant metastases (stage III). J Clin Oncol. 1983;1(2):126-34.
162. Long GV, Grob JJ, Davies MA, Lane S, Legenne P, KT. F. Baseline and postbaseline characteristics associated with treatment benefit across Dabrafenib and Trametinib registration pooled data. SMR; 2015.

163. Agarwala SS, Keilholz U, Gilles E, Bedikian AY, Wu J, Kay R, et al. LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951). Eur J Cancer. 2009;45(10):1807-14.
164. Menzies AM, Wilmott JS, Drummond M, Lo S, Lyle M, Chan MM, et al. Clinicopathologic features associated with efficacy and long-term survival in metastatic melanoma patients treated with BRAF or combined BRAF and MEK inhibitors. Cancer. 2015.
165. Kelderman S, Heemskerk B, van Tinteren H, van den Brom RR, Hospers GA, van den Eertwegh AJ, et al. Lactate dehydrogenase as a selection criterion for ipilimumab treatment in metastatic melanoma. Cancer Immunol Immunother. 2014;63(5):449-58.
166. Sirott MN, Bajorin DF, Wong GY, Tao Y, Chapman PB, Templeton MA, et al. Prognostic factors in patients with metastatic malignant melanoma. A multivariate analysis. Cancer. 1993;72(10):3091-8.
167. Eton O, Legha SS, Moon TE, Buzaid AC, Papadopoulos NE, Plager C, et al. Prognostic factors for survival of patients treated systemically for disseminated melanoma. J Clin Oncol. 1998;16(3):1103-11.
168. von Schoultz E, Hansson LO, Djureen E, Hansson J, Karnell R, Nilsson B, et al. Prognostic value of serum analyses of S-100 beta protein in malignant melanoma. Melanoma Res. 1996;6(2):133-7.
169. Abraha HD, Fuller LC, Du Vivier AW, Higgins EM, Sherwood RA. Serum S-100 protein: a potentially useful prognostic marker in cutaneous melanoma. Br J Dermatol. 1997;137(3):381-5.
170. Bonfrer JM, Korse CM, Nieweg OE, Rankin EM. The luminescence immunoassay S-100: a sensitive test to measure circulating S-100B: its prognostic value in malignant melanoma. Br J Cancer. 1998;77(12):2210-4.
171. Mocellin S, Zavagno G, Nitti D. The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: a meta-analysis. Int J Cancer. 2008;123(10):2370-6.
172. Ghanem G, Loir B, Morandini R, Sales F, Lienard D, Eggermont A, et al. On the release and half-life of S100B protein in the peripheral blood of melanoma patients. Int J Cancer. 2001;94(4):586-90.
173. Sanmamed MF, Fernandez-Landazuri S, Rodriguez C, Lozano MD, Echeveste JI, Perez Gracia JL, et al. Relevance of MIA and S100 serum tumor markers to monitor BRAF inhibitor therapy in metastatic melanoma patients. Clin Chim Acta. 2014;429:168-74.
174. Abusaif S, Jradi Z, Held L, Pflugfelder A, Weide B, Meier F, et al. S100B and lactate dehydrogenase as response and progression markers during treatment with vemurafenib in patients with advanced melanoma. Melanoma Res. 2013;23(5):396-401.
175. Palmer SR, Erickson LA, Ichetovkin I, Knauer DJ, Markovic SN. Circulating serologic and molecular biomarkers in malignant melanoma. Mayo Clin Proc. 2011;86(10):981-90.
176. Alegre E, Sammamed M, Fernandez-Landazuri S, Zubiri L, Gonzalez A. Circulating biomarkers in malignant melanoma. Adv Clin Chem. 2015;69:47-89.
177. Ugurel S, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. J Clin Oncol. 2001;19(2):577-83.
178. Osella-Abate S, Quaglino P, Savoia P, Leporati C, Comessatti A, Bernengo MG. VEGF-165 serum levels and tyrosinase expression in melanoma patients: correlation with the clinical course. Melanoma Res. 2002;12(4):325-34.
179. Pelletier F, Bermont L, Puzenat E, Blanc D, Cairey-Remonnay S, Mougin C, et al. Circulating vascular endothelial growth factor in cutaneous malignant melanoma. Br J Dermatol. 2005;152(4):685-9.
180. Sanmamed MF, Carranza-Rua O, Alfaro C, Onate C, Martin-Algarra S, Perez G, et al. Serum interleukin-8 reflects tumor burden and treatment response across malignancies of multiple tissue origins. Clin Cancer Res. 2014;20(22):5697-707.
181. Gandini S, Ferrucci PF, Botteri E, Tosti G, Barberis M, Pala L, et al. Prognostic significance of hematological profiles in melanoma patients. Int J Cancer. 2016.

182. Mirzaei H, Gholamin S, Shahidsales S, Sahebkar A, Jaafari MR, Mirzaei HR, et al. MicroRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. Eur J Cancer. 2016;53:25-32.
183. Alegre E, Sanmamed MF, Rodriguez C, Carranza O, Martin-Algarra S, Gonzalez A. Study of circulating microRNA-125b levels in serum exosomes in advanced melanoma. Arch Pathol Lab Med. 2014;138(6):828-32.
184. Long E, Ilie M, Bence C, Butori C, Selva E, Lalvee S, et al. High expression of TRF2, SOX10, and CD10 in circulating tumor microemboli detected in metastatic melanoma patients. A potential impact for the assessment of disease aggressiveness. Cancer Med. 2016.
185. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer. 2011;11(6):426-37.
186. Mori T, Martinez SR, O'Day SJ, Morton DL, Umetani N, Kitago M, et al. Estrogen receptor-alpha methylation predicts melanoma progression. Cancer Res. 2006;66(13):6692-8.
187. Mori T, O'Day SJ, Umetani N, Martinez SR, Kitago M, Koyanagi K, et al. Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy. J Clin Oncol. 2005;23(36):9351-8.
188. Friedman EB, Shang S, de Miera EV, Fog JU, Teilum MW, Ma MW, et al. Serum microRNAs as biomarkers for recurrence in melanoma. J Transl Med. 2012;10:155.
189. Shiiyama R, Fukushima S, Jinnin M, Yamashita J, Miyashita A, Nakahara S, et al. Sensitive detection of melanoma metastasis using circulating microRNA expression profiles. Melanoma Res. 2013;23(5):366-72.
190. Segura MF, Belitskaya-Levy I, Rose AE, Zakrzewski J, Gaziel A, Hanniford D, et al. Melanoma MicroRNA signature predicts post-recurrence survival. Clin Cancer Res. 2010;16(5):1577-86.
191. Shinozaki M, O'Day SJ, Kitago M, Amersi F, Kuo C, Kim J, et al. Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy. Clin Cancer Res. 2007;13(7):2068-74.
192. Knol AC, Vallee A, Herbreteau G, Nguyen JM, Varey E, Gaultier A, et al. Clinical significance of BRAF mutation status in circulating tumor DNA of metastatic melanoma patients at baseline. Exp Dermatol. 2016.
193. Sanmamed MF, Fernandez-Landazuri S, Rodriguez C, Zarate R, Lozano MD, Zubiri L, et al. Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. Clin Chem. 2015;61(1):297-304.
194. Jakob JA, Bassett RL, Jr., Ng CS, Curry JL, Joseph RW, Alvarado GC, et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. Cancer. 2012;118(16):4014-23.
195. Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, Carlino MS, Howle JR, Thompson JF, et al. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. Clin Cancer Res. 2012;18(12):3242-9.
196. Meckbach D, Keim U, Richter S, Leiter U, Eigentler TK, Bauer J, et al. BRAF-V600 mutations have no prognostic impact in stage IV melanoma patients treated with monochemotherapy. PLoS One. 2014;9(2):e89218.
197. Carlino MS, Haydu LE, Kakavand H, Menzies AM, Hamilton AL, Yu B, et al. Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. Br J Cancer. 2014;111(2):292-9.
198. von Moos R, Seifert B, Simcock M, Goldinger SM, Gillessen S, Ochsenbein A, et al. First-line temozolomide combined with bevacizumab in metastatic melanoma: a multicentre phase II trial (SAKK 50/07). Ann Oncol. 2012;23(2):531-6.
199. Wilmott JS, Menzies AM, Haydu LE, Capper D, Preusser M, Zhang YE, et al. BRAF(V600E) protein expression and outcome from BRAF inhibitor treatment in BRAF(V600E) metastatic melanoma. Br J Cancer. 2013;108(4):924-31.
200. Johnson DB, Lovly CM, Flavin M, Panageas KS, Ayers GD, Zhao Z, et al. Impact of NRAS mutations for patients with advanced melanoma treated with immune therapies. Cancer Immunol Res. 2015;3(3):288-95.

201. Lardone RD, Plaisier SB, Navarrete MS, Shamonki JM, Jalas JR, Sieling PA, et al. Cross-platform comparison of independent datasets identifies an immune signature associated with improved survival in metastatic melanoma. Oncotarget. 2016;7(12):14415-28.
202. Jonsson G, Busch C, Knappskog S, Geisler J, Miletic H, Ringner M, et al. Gene expression profiling-based identification of molecular subtypes in stage IV melanomas with different clinical outcome. Clin Cancer Res. 2010;16(13):3356-67.
203. Tsao H, Zhang X, Benoit E, Haluska FG. Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. Oncogene. 1998;16(26):3397-402.
204. Bucheit AD, Chen G, Siroy A, Tetzlaff M, Broaddus R, Milton D, et al. Complete loss of PTEN protein expression correlates with shorter time to brain metastasis and survival in stage IIIB/C melanoma patients with BRAFV600 mutations. Clin Cancer Res. 2014;20(21):5527-36.
205. Mikhail M, Velazquez E, Shapiro R, Berman R, Pavlick A, Sorhaindo L, et al. PTEN expression in melanoma: relationship with patient survival, Bcl-2 expression, and proliferation. Clin Cancer Res. 2005;11(14):5153-7.
206. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. N Engl J Med. 2004;351(10):998-1012.
207. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med. 2010;363(8):711-23.
208. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. N Engl J Med. 2015;372(26):2521-32.
209. Bowyer S, Prithviraj P, Lorigan P, Larkin J, McArthur G, Atkinson V, et al. Efficacy and toxicity of treatment with the anti-CTLA-4 antibody ipilimumab in patients with metastatic melanoma after prior anti-PD-1 therapy. Br J Cancer. 2016;114(10):1084-9.
210. Rotte A, Bhandaru M, Zhou Y, McElwee KJ. Immunotherapy of melanoma: present options and future promises. Cancer Metastasis Rev. 2015;34(1):115-28.
211. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. N Engl J Med. 2015;373(1):23-34.
212. Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N, Pentheroudakis G, Keilholz U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2015;26 Suppl 5:v126-32.
213. Commission de la transparence HAS. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-14929_COTELLIC_PIC_INS_Avis2_CT14929.pdf; 16 mars 2016. p. Page 5.
214. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. N Engl J Med. 2010;363(9):809-19.
215. Dalle S, Poulalhon N, Thomas L. Vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. N Engl J Med. 2011;365(15):1448-9; author reply 50.
216. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). Nature. 2011;480(7377):387-90.
217. Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, Agarwala SS, van Herpen CM, Queirolo P, et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. Lancet Oncol. 2013;14(3):249-56.
218. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. N Engl J Med. 2011;364(26):2507-16.
219. Puzanov I, Amaravadi RK, McArthur GA, Flaherty KT, Chapman PB, Sosman JA, et al. Long-term outcome in BRAF(V600E) melanoma patients treated with vemurafenib: Patterns of disease progression and clinical management of limited progression. Eur J Cancer. 2015;51(11):1435-43.
220. Boussemart L, Routier E, Mateus C, Opletalova K, Sebille G, Kamsu-Kom N, et al. Prospective study of cutaneous side-effects associated with the BRAF inhibitor vemurafenib: a study of 42 patients. Ann Oncol. 2013;24(6):1691-7.

221. Zimmer L, Hillen U, Livingstone E, Lacouture ME, Busam K, Carvajal RD, et al. Atypical melanocytic proliferations and new primary melanomas in patients with advanced melanoma undergoing selective BRAF inhibition. J Clin Oncol. 2012;30(19):2375-83.
222. Debarbieux S, Dalle S, Depaepe L, Poulalhon N, Balme B, Thomas L. Second primary melanomas treated with BRAF blockers: study by reflectance confocal microscopy. Br J Dermatol. 2013;168(6):1230-5.
223. Perier-Muzet M, Thomas L, Poulalhon N, Debarbieux S, Bringuier PP, Duru G, et al. Melanoma patients under vemurafenib: prospective follow-up of melanocytic lesions by digital dermoscopy. J Invest Dermatol. 2014;134(5):1351-8.
224. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. Nature. 2010;464(7287):431-5.
225. Boussemart L, Girault I, Malka-Mahieu H, Mateus C, Routier E, Rubington M, et al. Secondary Tumors Arising in Patients Undergoing BRAF Inhibitor Therapy Exhibit Increased BRAF-CRAF Heterodimerization. Cancer Res. 2016;76(6):1476-84.
226. Kefford RF, Maio M, Arance A, Nathan P, Blank C, MF. A. Vemurafenib in Metastatic Melanoma Patients With Brain Metastases: An Open-Label, Single-Arm, Phase 2, Multicenter Study [abstract]. Pigment Cell Melanoma Res. 2013;26 (Suppl.):p.965.
227. Dummer R, Goldinger SM, Turtschi CP, Eggmann NB, Michielin O, Mitchell L, et al. Vemurafenib in patients with BRAF(V600) mutation-positive melanoma with symptomatic brain metastases: final results of an open-label pilot study. Eur J Cancer. 2014;50(3):611-21.
228. Gibney GT, Gauthier G, Ayas C, Galebach P, Wu EQ, Abhyankar S, et al. Treatment patterns and outcomes in BRAF V600E-mutant melanoma patients with brain metastases receiving vemurafenib in the real-world setting. Cancer Med. 2015;4(8):1205-13.
229. Sakji-Dupre L, Le Rhun E, Templier C, Desmedt E, Blanchet B, Mortier L. Cerebrospinal fluid concentrations of vemurafenib in patients treated for brain metastatic BRAF-V600 mutated melanoma. Melanoma Res. 2015;25(4):302-5.
230. Schafer N, Scheffler B, Stuplich M, Schaub C, Kebir S, Rehkamper C, et al. Vemurafenib for leptomeningeal melanomatosis. J Clin Oncol. 2013;31(11):e173-4.
231. Kim DW, Barcena E, Mehta UN, Rohlfs ML, Kumar AJ, Penas-Prado M, et al. Prolonged survival of a patient with metastatic leptomeningeal melanoma treated with BRAF inhibition-based therapy: a case report. BMC Cancer. 2015;15:400.
232. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. Lancet. 2012;380(9839):358-65.
233. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. N Engl J Med. 2012;367(2):107-14.
234. Kelleher FC, McArthur GA. Targeting NRAS in melanoma. Cancer J. 2012;18(2):132-6.
235. Falchook GS, Lewis KD, Infante JR, Gordon MS, Vogelzang NJ, DeMarini DJ, et al. Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. Lancet Oncol. 2012;13(8):782-9.
236. Gupta A, Love S, Schuh A, Shanyinde M, Larkin JM, Plummer R, et al. DOC-MEK: a double-blind randomized phase II trial of docetaxel with or without selumetinib in wild-type BRAF advanced melanoma. Ann Oncol. 2014;25(5):968-74.
237. Lebbe C. LT, Raymond E. , *et al*. Pimasertib (MSCMSC1936369/AS703026), a selective oral MEK1/2 inhibitor, shows clinical activity in cutaaneous and uveal metastastic melanoma in the phase I. program European Association of Dermato-Oncology (EADO) Congress; 2012.
238. Dummer R SD, Ascierto PA,, Arance Fernández AM DC, Maio M, Rutkowski P, Del Vecchio M, Gutzmer R, Mandalà M, Thomas L, Wasserman E, Ford J, Weill M, Sirulnik LA, Jehl V,, Bozon V LG, Flaherty K. Results of NEMO: A phase III trial of binimetinib (BINI) vs dacarbazine (DTIC) in *NRAS*-mutant cutaneous melanoma. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 9500).

239. Vu HL, Aplin AE. Targeting mutant NRAS signaling pathways in melanoma. Pharmacol Res. 2016;107:111-6.
240. Johnson DB, Estrada MV, Salgado R, Sanchez V, Doxie DB, Opalenik SR, et al. Melanoma-specific MHC-II expression represents a tumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy. Nat Commun. 2016;7:10582.
241. Ebert PJ, Cheung J, Yang Y, McNamara E, Hong R, Moskalenko M, et al. MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade. Immunity. 2016;44(3):609-21.
242. Bendell JC KT, Goh BC, Wallin J, Oh DY, Han SW, Lee CB, Hellmann MD, Desai J, Lewin JH, Solomon BJ, Quan Man Chow L, Miller WH, Gainor JF, Flaherty K, Infante JR, Das-Thakur M, Foster P, Cha E, Bang YJ, S C. Clinical activity and safety of cobimetinib (cobi) and atezolizumab in colorectal cancer (CRC). J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 3502).
243. Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. Nature. 2013;503(7477):548-51.
244. Lito P, Solomon M, Li LS, Hansen R, Rosen N. Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. Science. 2016;351(6273):604-8.
245. Dean EJ BU, Girotti R, Niculescu-Duvaz I , Lopes F, Davies L, Niculescu-Duvaz D, Dhomen N, Ellis S, Ali Z, O'Carrigan B, Carter L, Chisolm L, Dive C, Lane HA, Lorigan P, Gore ME, Larkin J, Marais R, Springer C. A Phase 1 first-in-human trial to evaluate the safety and tolerability of CCT3833, an oral panRAF inhibitor, in patients with advanced solid tumours, including metastatic melanoma. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr TPS9597).
246. Dias-Santagata D, Su Y, Hoang MP. Immunohistochemical Detection of NRASQ61R Mutation in Diverse Tumor Types. Am J Clin Pathol. 2016;145(1):29-34.
247. Ilie M, Long-Mira E, Funck-Brentano E, Lassalle S, Butori C, Lespinet-Fabre V, et al. Immunohistochemistry as a potential tool for routine detection of the NRAS Q61R mutation in patients with metastatic melanoma. Journal of the American Academy of Dermatology. 2015.
248. Lee SJ, Kim TM, Kim YJ, Jang KT, Lee HJ, Lee SN, et al. Phase II Trial of Nilotinib in Patients With Metastatic Malignant Melanoma Harboring KIT Gene Aberration: A Multicenter Trial of Korean Cancer Study Group (UN10-06). Oncologist. 2015;20(11):1312-9.
249. Kluger HM, Dudek AZ, McCann C, Ritacco J, Southard N, Jilaveanu LB, et al. A phase 2 trial of dasatinib in advanced melanoma. Cancer. 2011;117(10):2202-8.
250. Kalinsky K, Lee SJ, Rubin KM, Lawrence DP, Iafrate AJ, Borger DR, et al. A phase II trial of dasatinib in patients with unresectable locally advanced or stage IV mucosal, acral, and vulvovaginal melanomas: A trial of the ECOG-ACRIN Cancer Research Group (E2607). ASCO Meeting. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 9501).
251. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. N Engl J Med. 2012;366(8):707-14.
252. Kim KB, Kefford R, Pavlick AC, Infante JR, Ribas A, Sosman JA, et al. Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. J Clin Oncol. 2013;31(4):482-9.
253. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. N Engl J Med. 2012;367(18):1694-703.
254. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. N Engl J Med. 2014;371(20):1877-88.
255. Schadendorf D, Amonkar MM, Stroyakovskiy D, Levchenko E, Gogas H, de Braud F, et al. Health-related quality of life impact in a randomised phase III study of the combination of dabrafenib and trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with BRAF V600 metastatic melanoma. Eur J Cancer. 2015;51(7):833-40.
256. Flaherty K DM, Grob JJ, et al. Genomic analysis and 3-y efficacy and safety update of COMBI-d: A Phase III study of dabrafenib (D) + trametinib (T) vs D monotherapy in patients with unresectable or metastatic BRAF V600E/K-mutant cutaneous melanoma. J Clin Oncol; 2016.

257. Grob JJ, Amonkar MM, Karaszewska B, Schachter J, Dummer R, Mackiewicz A, et al. Comparison of dabrafenib and trametinib combination therapy with vemurafenib monotherapy on health-related quality of life in patients with unresectable or metastatic cutaneous BRAF Val600-mutation-positive melanoma (COMBI-v): results of a phase 3, open-label, randomised trial. Lancet Oncol. 2015;16(13):1389-98.
258. Larkin J MG, Ascierto, PA LG, Maio M *et al*. Update of progression-free survival (PFS) and correlative biomarker analysis from coBRIM: phase III study of cobimetinib (cobi) plus vemurafenib (vem) in advanced BRAF-mutated melanoma.: J Clin Oncol 33 (suppl; abstr 9006); 2015.
259. Davies M, Martins, K. S, T. and Swann, S. Phase II, open-label study of dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF mutation-positive melanoma brain metastases: a GSK-sponsored trial.: J Clin Oncol 32: TPS9106; 2014.
260. Yee M, Lin, Y., Gorantla, V., Butterfield, L., Kluger, H., Chapman, P. *et al.* Phase 2 study of cobimetinib in combination with vemurafenib in active melanoma brain metastases (coBRIM-B). J Clin Oncol 33: TPS9088.; 2015.
261. Menzies AM, Haydu LE, Carlino MS, Azer MW, Carr PJ, Kefford RF, et al. Inter- and intra-patient heterogeneity of response and progression to targeted therapy in metastatic melanoma. PLoS One. 2014;9(1):e85004.
262. Queirolo P, Picasso V, Spagnolo F. Combined BRAF and MEK inhibition for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. Cancer Treat Rev. 2015;41(6):519-26.
263. Jang S, Atkins MB. Treatment of Melanoma CNS Metastases. Cancer Treat Res. 2016;167:263-79.
264. Johnson DB, Flaherty KT, Weber JS, Infante JR, Kim KB, Kefford RF, et al. Combined BRAF (Dabrafenib) and MEK inhibition (Trametinib) in patients with BRAFV600-mutant melanoma experiencing progression with single-agent BRAF inhibitor. J Clin Oncol. 2014;32(33):3697-704.
265. Moriceau G, Hugo W, Hong A, Shi H, Kong X, Yu CC, et al. Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK cotargeting but result in melanoma drug addiction. Cancer Cell. 2015;27(2):240-56.
266. Das Thakur M, Salangsang F, Landman AS, Sellers WR, Pryer NK, Levesque MP, et al. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. Nature. 2013;494(7436):251-5.
267. Eroglu Z, Ribas A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. Ther Adv Med Oncol. 2016;8(1):48-56.
268. Ribas A, Hodi FS, Callahan M, Konto C, Wolchok J. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. N Engl J Med. 2013;368(14):1365-6.
269. Puzanov I. Combining targeted and immunotherapy: BRAF inhibitor dabrafenib (D) ± the MEK inhibitor trametinib (T) in combination with ipilimumab (Ipi) for V600E/K mutation-positive unresectable or metastatic melanoma (MM). J Transl Med. 2015;13(Suppl 1):K8.
270. Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, Cooper ZA, Lezcano C, Ferrone CR, et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. Clin Cancer Res. 2013;19(5):1225-31.
271. Wargo JA, Cooper ZA, Flaherty KT. Universes collide: combining immunotherapy with targeted therapy for cancer. Cancer Discov. 2014;4(12):1377-86.
272. Wilmott JS, Long GV, Howle JR, Haydu LE, Sharma RN, Thompson JF, et al. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. Clin Cancer Res. 2012;18(5):1386-94.
273. Queirolo P, Morabito A, Laurent S, Lastraioli S, Piccioli P, Ascierto PA, et al. Association of CTLA-4 polymorphisms with improved overall survival in melanoma patients treated with CTLA-4 blockade: a pilot study. Cancer Invest. 2013;31(5):336-45.
274. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature. 2014;515(7528):568-71.
275. Spagnolo F, Ghiorzo P, Queirolo P. Overcoming resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutated metastatic melanoma. Oncotarget. 2014;5(21):10206-21.

276. Long GV, Weber JS, Infante JR, Kim KB, Daud A, Gonzalez R, et al. Overall Survival and Durable Responses in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Receiving Dabrafenib Combined With Trametinib. J Clin Oncol. 2016;34(8):871-8.
277. Rizos H, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Fung C, Hyman J, et al. BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact. Clin Cancer Res. 2014;20(7):1965-77.
278. Shi H, Hugo W, Kong X, Hong A, Koya RC, Moriceau G, et al. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. Cancer Discov. 2014;4(1):80-93.
279. Fedorenko IV, Paraiso KH, Smalley KS. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. Biochem Pharmacol. 2011;82(3):201-9.
280. Long GV, Fung C, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Hyman J, et al. Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. Nat Commun. 2014;5:5694.
281. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. Nature. 2012;487(7408):500-4.
282. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. Nature. 2012;487(7408):505-9.
283. Obenauf AC, Zou Y, Ji AL, Vanharanta S, Shu W, Shi H, et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. Nature. 2015;520(7547):368-72.
284. Girotti MR, Pedersen M, Sanchez-Laorden B, Viros A, Turajlic S, Niculescu-Duvaz D, et al. Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. Cancer Discov. 2013;3(2):158-67.
285. Girotti MR, Lopes F, Preece N, Niculescu-Duvaz D, Zambon A, Davies L, et al. Paradox-breaking RAF inhibitors that also target SRC are effective in drug-resistant BRAF mutant melanoma. Cancer Cell. 2015;27(1):85-96.
286. Whittaker SR, Theurillat JP, Van Allen E, Wagle N, Hsiao J, Cowley GS, et al. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. Cancer Discov. 2013;3(3):350-62.
287. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. Cancer Discov. 2014;4(1):94-109.
288. Watson IR, Li L, Cabeceiras PK, Mahdavi M, Gutschner T, Genovese G, et al. The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF. Cancer Res. 2014;74(17):4845-52.
289. Halaban R. RAC1 and melanoma. Clin Ther. 2015;37(3):682-5.
290. Nikolaev SI, Rimoldi D, Iseli C, Valsesia A, Robyr D, Gehrig C, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. Nat Genet. 2012;44(2):133-9.
291. Trunzer K, Pavlick AC, Schuchter L, Gonzalez R, McArthur GA, Hutson TE, et al. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. J Clin Oncol. 2013;31(14):1767-74.
292. Shi H, Moriceau G, Kong X, Koya RC, Nazarian R, Pupo GM, et al. Preexisting MEK1 exon 3 mutations in V600E/KBRAF melanomas do not confer resistance to BRAF inhibitors. Cancer Discov. 2012;2(5):414-24.
293. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. Nature. 2010;468(7326):968-72.
294. Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE, Jr., et al. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. Nat Genet. 2009;41(5):544-52.

295. Paraiso KH, Xiang Y, Rebecca VW, Abel EV, Chen YA, Munko AC, et al. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. Cancer Res. 2011;71(7):2750-60.
296. Shao Y, Aplin AE. Akt3-mediated resistance to apoptosis in B-RAF-targeted melanoma cells. Cancer Res. 2010;70(16):6670-81.
297. Nathanson KL, Martin AM, Wubbenhorst B, Greshock J, Letrero R, D'Andrea K, et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). Clin Cancer Res. 2013;19(17):4868-78.
298. Deng W, Gopal YN, Scott A, Chen G, Woodman SE, Davies MA. Role and therapeutic potential of PI3K-mTOR signaling in de novo resistance to BRAF inhibition. Pigment Cell Melanoma Res. 2012;25(2):248-58.
299. McArthur G LJ, Dréno B, Ascierto P, G Liszkay, Maio M, Mandalà M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L , De la Cruz-Merino L, Atkinson V, Dutriaux C, Garbe C, Wongchenko M, Hsu J, Koralek D, Rooney I, Yan Y, Ribas A. LATE BREAKING ABSTRACT:Impact of baseline genetic heterogeneities on progression-free survival (PFS) in patients (pts) with advanced BRAFV600-mutated melanoma treated with cobimetinib (COBI) + vemurafenib (VEM) in the phase 3 coBRIM study. ESMO http://www.eccocongress.org/Vienna2015/Scientific-Programme/Abstract-search#; 2015.
300. Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, Xiao M, Desai B, Egyhazi S, et al. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. Mol Cancer Ther. 2008;7(9):2876-83.
301. Spitz F, Gonzalez F, Peichel C, Vogt TF, Duboule D, Zakany J. Large scale transgenic and cluster deletion analysis of the HoxD complex separate an ancestral regulatory module from evolutionary innovations. Genes Dev. 2001;15(17):2209-14.
302. Hoogstraat M, Gadellaa-van Hooijdonk CG, Ubink I, Besselink NJ, Pieterse M, Veldhuis W, et al. Detailed imaging and genetic analysis reveal a secondary BRAF(L505H) resistance mutation and extensive intrapatient heterogeneity in metastatic BRAF mutant melanoma patients treated with vemurafenib. Pigment Cell Melanoma Res. 2015;28(3):318-23.
303. Wagenaar TR, Ma L, Roscoe B, Park SM, Bolon DN, Green MR. Resistance to vemurafenib resulting from a novel mutation in the BRAFV600E kinase domain. Pigment Cell Melanoma Res. 2014;27(1):124-33.
304. Choi J, Landrette SF, Wang T, Evans P, Bacchiocchi A, Bjornson R, et al. Identification of PLX4032-resistance mechanisms and implications for novel RAF inhibitors. Pigment Cell Melanoma Res. 2014;27(2):253-62.
305. Wagle N, Van Allen EM, Treacy DJ, Frederick DT, Cooper ZA, Taylor-Weiner A, et al. MAP kinase pathway alterations in BRAF-mutant melanoma patients with acquired resistance to combined RAF/MEK inhibition. Cancer Discov. 2014;4(1):61-8.
306. Basile KJ, Le K, Hartsough EJ, Aplin AE. Inhibition of mutant BRAF splice variant signaling by next-generation, selective RAF inhibitors. Pigment Cell Melanoma Res. 2014;27(3):479-84.
307. Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee MK, Lee H, Koya RC, et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. Nat Commun. 2012;3:724.
308. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. Nature. 2010;468(7326):973-7.
309. Paraiso KH, Haarberg HE, Wood E, Rebecca VW, Chen YA, Xiang Y, et al. The HSP90 inhibitor XL888 overcomes BRAF inhibitor resistance mediated through diverse mechanisms. Clin Cancer Res. 2012;18(9):2502-14.
310. Hugo W, Shi H, Sun L, Piva M, Song C, Kong X, et al. Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. Cell. 2015;162(6):1271-85.
311. Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. J Clin Oncol. 2011;29(22):3085-96.

312. Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, Sawyer AM, Niu L, Kim JJ, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(48):20411-6.
313. Villanueva J, Infante JR, Krepler C, Reyes-Uribe P, Samanta M, Chen HY, et al. Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma. Cell Rep. 2013;4(6):1090-9.
314. Gilmartin AG, Bleam MR, Groy A, Moss KG, Minthorn EA, Kulkarni SG, et al. GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. Clin Cancer Res. 2011;17(5):989-1000.
315. Duncan JS, Whittle MC, Nakamura K, Abell AN, Midland AA, Zawistowski JS, et al. Dynamic reprogramming of the kinome in response to targeted MEK inhibition in triple-negative breast cancer. Cell. 2012;149(2):307-21.
316. Ussar S, Voss T. MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition. J Biol Chem. 2004;279(42):43861-9.
317. Khokhlatchev A, Xu S, English J, Wu P, Schaefer E, Cobb MH. Reconstitution of mitogen-activated protein kinase phosphorylation cascades in bacteria. Efficient synthesis of active protein kinases. J Biol Chem. 1997;272(17):11057-62.
318. Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJ, Prahallad A, Robert C, et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. Nature. 2014;508(7494):118-22.
319. Eblen ST, Slack-Davis JK, Tarcsafalvi A, Parsons JT, Weber MJ, Catling AD. Mitogen-activated protein kinase feedback phosphorylation regulates MEK1 complex formation and activation during cellular adhesion. Mol Cell Biol. 2004;24(6):2308-17.
320. Catalanotti F, Reyes G, Jesenberger V, Galabova-Kovacs G, de Matos Simoes R, Carugo O, et al. A Mek1-Mek2 heterodimer determines the strength and duration of the Erk signal. Nat Struct Mol Biol. 2009;16(3):294-303.
321. Sabbatino F, Wang Y, Wang X, Flaherty KT, Yu L, Pepin D, et al. PDGFRalpha up-regulation mediated by sonic hedgehog pathway activation leads to BRAF inhibitor resistance in melanoma cells with BRAF mutation. Oncotarget. 2014;5(7):1926-41.
322. Yadav V, Zhang X, Liu J, Estrem S, Li S, Gong XQ, et al. Reactivation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway by FGF receptor 3 (FGFR3)/Ras mediates resistance to vemurafenib in human B-RAF V600E mutant melanoma. J Biol Chem. 2012;287(33):28087-98.
323. Girotti MR, Marais R. Deja Vu: EGF receptors drive resistance to BRAF inhibitors. Cancer Discov. 2013;3(5):487-90.
324. Abel EV, Basile KJ, Kugel CH, 3rd, Witkiewicz AK, Le K, Amaravadi RK, et al. Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. J Clin Invest. 2013;123(5):2155-68.
325. Miao B, Ji Z, Tan L, Taylor M, Zhang J, Choi HG, et al. EPHA2 is a mediator of vemurafenib resistance and a novel therapeutic target in melanoma. Cancer Discov. 2015;5(3):274-87.
326. Shi H, Kong X, Ribas A, Lo RS. Combinatorial treatments that overcome PDGFRbeta-driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition. Cancer Res. 2011;71(15):5067-74.
327. Carlino MS, Long GV, Kefford RF, Rizos H. Targeting oncogenic BRAF and aberrant MAPK activation in the treatment of cutaneous melanoma. Crit Rev Oncol Hematol. 2015;96(3):385-98.
328. Montagut C, Sharma SV, Shioda T, McDermott U, Ulman M, Ulkus LE, et al. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. Cancer Res. 2008;68(12):4853-61.
329. Su F, Bradley WD, Wang Q, Yang H, Xu L, Higgins B, et al. Resistance to selective BRAF inhibition can be mediated by modest upstream pathway activation. Cancer Res. 2012;72(4):969-78.
330. Doudican NA, Orlow SJ. Inhibition of the CRAF/prohibitin interaction reverses CRAF-dependent resistance to vemurafenib. Oncogene. 2016.
331. Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. Nature. 2010;464(7287):427-30.

332. Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, Ng E, Shapiro RL, Berman RS, et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E))mutations in primary and metastatic melanoma. PLoS One. 2012;7(1):e29336.
333. Heinzerling L, Baiter M, Kuhnapfel S, Schuler G, Keikavoussi P, Agaimy A, et al. Mutation landscape in melanoma patients clinical implications of heterogeneity of BRAF mutations. Br J Cancer. 2013;109(11):2833-41.
334. Menzies AM, Lum T, Wilmott JS, Hyman J, Kefford RF, Thompson JF, et al. Intrapatient homogeneity of BRAFV600E expression in melanoma. Am J Surg Pathol. 2014;38(3):377-82.
335. Gray ES, Rizos H, Reid AL, Boyd SC, Pereira MR, Lo J, et al. Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. Oncotarget. 2015;6(39):42008-18.
336. Schreuer M, Meersseman G, Van Den Herrewegen S, Jansen Y, Chevolet I, Bott A, et al. Quantitative assessment of BRAF V600 mutant circulating cell-free tumor DNA as a tool for therapeutic monitoring in metastatic melanoma patients treated with BRAF/MEK inhibitors. J Transl Med. 2016;14(1):95.
337. Liu F, Cao J, Wu J, Sullivan K, Shen J, Ryu B, et al. Stat3-targeted therapies overcome the acquired resistance to vemurafenib in melanomas. J Invest Dermatol. 2013;133(8):2041-9.
338. Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. Nat Med. 2013;19(11):1401-9.
339. Abel EV, Aplin AE. FOXD3 is a mutant B-RAF-regulated inhibitor of G(1)-S progression in melanoma cells. Cancer Res. 2010;70(7):2891-900.
340. Basile KJ, Abel EV, Aplin AE. Adaptive upregulation of FOXD3 and resistance to PLX4032/4720-induced cell death in mutant B-RAF melanoma cells. Oncogene. 2012;31(19):2471-9.
341. Corazao-Rozas P, Guerreschi P, Jendoubi M, Andre F, Jonneaux A, Scalbert C, et al. Mitochondrial oxidative stress is the Achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. Oncotarget. 2013;4(11):1986-98.
342. Martinez-Cardus A, Vizoso M, Moran S, Manzano JL. Epigenetic mechanisms involved in melanoma pathogenesis and chemoresistance. Ann Transl Med. 2015;3(15):209.
343. Gallagher SJ, Tiffen JC, Hersey P. Histone Modifications, Modifiers and Readers in Melanoma Resistance to Targeted and Immune Therapy. Cancers (Basel). 2015;7(4):1959-82.
344. Smith MP, Ferguson J, Arozarena I, Hayward R, Marais R, Chapman A, et al. Effect of SMURF2 targeting on susceptibility to MEK inhibitors in melanoma. J Natl Cancer Inst. 2013;105(1):33-46.
345. Johannessen CM, Johnson LA, Piccioni F, Townes A, Frederick DT, Donahue MK, et al. A melanocyte lineage program confers resistance to MAP kinase pathway inhibition. Nature. 2013;504(7478):138-42.
346. Muller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. Nat Commun. 2014;5:5712.
347. Ji Z, Erin Chen Y, Kumar R, Taylor M, Jenny Njauw CN, Miao B, et al. MITF Modulates Therapeutic Resistance through EGFR Signaling. J Invest Dermatol. 2015;135(7):1863-72.
348. Vizoso M, Ferreira HJ, Lopez-Serra P, Carmona FJ, Martinez-Cardus A, Girotti MR, et al. Epigenetic activation of a cryptic TBC1D16 transcript enhances melanoma progression by targeting EGFR. Nat Med. 2015;21(7):741-50.
349. Wang J, Huang SK, Marzese DM, Hsu SC, Kawas NP, Chong KK, et al. Epigenetic changes of EGFR have an important role in BRAF inhibitor-resistant cutaneous melanomas. J Invest Dermatol. 2015;135(2):532-41.
350. Shao Y, Aplin AE. BH3-only protein silencing contributes to acquired resistance to PLX4720 in human melanoma. Cell Death Differ. 2012;19(12):2029-39.
351. Heinemann A, Cullinane C, De Paoli-Iseppi R, Wilmott JS, Gunatilake D, Madore J, et al. Combining BET and HDAC inhibitors synergistically induces apoptosis of melanoma and suppresses AKT and YAP signaling. Oncotarget. 2015;6(25):21507-21.
352. Dar AA, Nosrati M, Bezrookove V, de Semir D, Majid S, Thummala S, et al. The role of BPTF in melanoma progression and in response to BRAF-targeted therapy. J Natl Cancer Inst. 2015;107(5).

353. Kakavand H, Wilmott JS, Menzies AM, Vilain R, Haydu LE, Yearley JH, et al. PD-L1 Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes Define Different Subsets of MAPK Inhibitor-Treated Melanoma Patients. Clin Cancer Res. 2015;21(14):3140-8.
354. Cooper ZA, Frederick DT, Juneja VR, Sullivan RJ, Lawrence DP, Piris A, et al. BRAF inhibition is associated with increased clonality in tumor-infiltrating lymphocytes. Oncoimmunology. 2013;2(10):e26615.
355. Massi D, Brusa D, Merelli B, Falcone C, Xue G, Carobbio A, et al. The status of PD-L1 and tumor-infiltrating immune cells predict resistance and poor prognosis in BRAFi-treated melanoma patients harboring mutant BRAFV600. Ann Oncol. 2015;26(9):1980-7.
356. Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. Clin Cancer Res. 2013;19(3):598-609.
357. Tiffen JC, Gallagher SJ, Tseng HY, Filipp FV, Fazekas de St Groth B, Hersey P. EZH2 as a mediator of treatment resistance in melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2016.
358. Flach EH, Rebecca VW, Herlyn M, Smalley KS, Anderson AR. Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance. Mol Pharm. 2011;8(6):2039-49.
359. Castells M, Thibault B, Delord JP, Couderc B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. Int J Mol Sci. 2012;13(8):9545-71.
360. Zhou L, Yang K, Andl T, Wickett RR, Zhang Y. Perspective of Targeting Cancer-Associated Fibroblasts in Melanoma. J Cancer. 2015;6(8):717-26.
361. Fedorenko IV, Wargo JA, Flaherty KT, Messina JL, Smalley KS. BRAF Inhibition Generates a Host-Tumor Niche that Mediates Therapeutic Escape. J Invest Dermatol. 2015;135(12):3115-24.
362. Capparelli C, Rosenbaum S, Berger AC, Aplin AE. Fibroblast-derived neuregulin 1 promotes compensatory ErbB3 receptor signaling in mutant BRAF melanoma. J Biol Chem. 2015;290(40):24267-77.
363. Hirata E, Girotti MR, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, et al. Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. Cancer Cell. 2015;27(4):574-88.
364. Fedorenko IV, Smalley KS. The complexity of microenvironment-mediated drug resistance. Genes Cancer. 2015;6(9-10):367-8.
365. Seifert H, Hirata E, Gore M, Khabra K, Messiou C, Larkin J, et al. Extrinsic factors can mediate resistance to BRAF inhibition in central nervous system melanoma metastases. Pigment Cell Melanoma Res. 2016;29(1):92-100.
366. Huang T, Karsy M, Zhuge J, Zhong M, Liu D. B-Raf and the inhibitors: from bench to bedside. J Hematol Oncol. 2013;6:30.
367. Actualisation des recommandations de prise en charge du mélanome stade I à III - SFD. http://www.sfdermato.org/media/pdf/recommandation/recos-mealnome-dc704d984ef0fe69278c90c3bd5ac5c7.pdf ed2016.
368. Emile JF, Tisserand J, Bergougnoux L, Nowak F, Faucher G, Surel S, et al. Improvement of the quality of BRAF testing in melanomas with nationwide external quality assessment, for the BRAF EQA group. BMC Cancer. 2013;13:472.
369. Søndergaard JN, Nazarian R, Wang Q, Guo D, Hsueh T, Mok S, et al. Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032. J Transl Med. 2010;8:39.
370. Halaban R, Zhang W, Bacchiocchi A, Cheng E, Parisi F, Ariyan S, et al. PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells. Pigment Cell Melanoma Res. 2010;23(2):190-200.
371. Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, Ariyan S, Cheng E, Bacchiocchi A, et al. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. J Transl Med. 8. England2010. p. 67.

372. Soh J, Okumura N, Lockwood WW, Yamamoto H, Shigematsu H, Zhang W, et al. Oncogene mutations, copy number gains and mutant allele specific imbalance (MASI) frequently occur together in tumor cells. PLoS One. 2009;4(10):e7464.
373. Lapunzina P, Monk D. The consequences of uniparental disomy and copy number neutral loss-of-heterozygosity during human development and cancer. Biol Cell. 2011;103(7):303-17.
374. Bullinger L, Kronke J, Schon C, Radtke I, Urlbauer K, Botzenhardt U, et al. Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis. Leukemia. 2010;24(2):438-49.
375. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002409/WC500124317.pdf [
376. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer. 2009;45(2):228-47.
377. Capaldo BJ, Roller D, Axelrod MJ, Koeppel AF, Petricoin EF, Slingluff CL, Jr., et al. Systems Analysis of Adaptive Responses to MAP Kinase Pathway Blockade in BRAF Mutant Melanoma. PLoS One. 2015;10(9):e0138210.
378. Aran D, Sirota M, Butte AJ. Systematic pan-cancer analysis of tumour purity. Nat Commun. 2015;6:8971.
379. Chan MM, Haydu LE, Menzies AM, Azer MW, Klein O, Lyle M, et al. The nature and management of metastatic melanoma after progression on BRAF inhibitors: effects of extended BRAF inhibition. Cancer. 2014;120(20):3142-53.
380. Lebbe C, How-Kit A, Battistella M, Sadoux A, Podgorniak MP, Sidina I, et al. BRAF(V600) mutation levels predict response to vemurafenib in metastatic melanoma. Melanoma Res. 2014;24(4):415-8.
381. Satzger I, Marks L, Kerick M, Klages S, Berking C, Herbst R, et al. Allele frequencies of BRAFV600 mutations in primary melanomas and matched metastases and their relevance for BRAF inhibitor therapy in metastatic melanoma. Oncotarget. 2015;6(35):37895-905.
382. Holderfield M, Nagel TE, Stuart DD. Mechanism and consequences of RAF kinase activation by small-molecule inhibitors. Br J Cancer. 2014;111(4):640-5.
383. Konieczkowski DJ, Johannessen CM, Abudayyeh O, Kim JW, Cooper ZA, Piris A, et al. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. Cancer Discov. 2014;4(7):816-27.
384. Flaherty K, Davies MA, Grob JJ, Long GV, Nathan PD, Ribas A, et al. Genomic analysis and 3-y efficacy and safety update of COMBI-d: A Phase III study of dabrafenib (D) + trametinib (T) vs D monotherapy in patients with unresectable or metastatic BRAF V600E/K-mutant cutaneous melanoma. ASCO meeting. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 9502).
385. Thumar J, Shahbazian D, Aziz SA, Jilaveanu LB, Kluger HM. MEK targeting in N-RAS mutated metastatic melanoma. Mol Cancer. 2014;13:45.
386. Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, Cordon-Cardo C, McNutt NS, Bressler J, et al. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. Oncogene. 1989;4(11):1363-74.
387. Greaves WO, Verma S, Patel KP, Davies MA, Barkoh BA, Galbincea JM, et al. Frequency and spectrum of BRAF mutations in a retrospective, single-institution study of 1112 cases of melanoma. J Mol Diagn. 2013;15(2):220-6.
388. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. Clin Cancer Res. 2003;9(17):6483-8.
389. Caponigro F, Casale M, Bryce J. Farnesyl transferase inhibitors in clinical development. Expert Opin Investig Drugs. 2003;12(6):943-54.
390. Helias-Rodzewicz Z, Funck-Brentano E, Baudoux L, Jung CK, Zimmermann U, Marin C, et al. Variations of BRAF mutant allele percentage in melanomas. BMC Cancer. 2015;15:497.

391. Colomba E, Helias-Rodzewicz Z, Von Deimling A, Marin C, Terrones N, Pechaud D, et al. Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing. J Mol Diagn. 2013;15(1):94-100.
392. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal. 2013;6(269):pl1.
393. Xu J, Haigis KM, Firestone AJ, McNerney ME, Li Q, Davis E, et al. Dominant role of oncogene dosage and absence of tumor suppressor activity in Nras-driven hematopoietic transformation. Cancer Discov. 2013;3(9):993-1001.
394. Chen X, Mitsutake N, LaPerle K, Akeno N, Zanzonico P, Longo VA, et al. Endogenous expression of Hras(G12V) induces developmental defects and neoplasms with copy number imbalances of the oncogene. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(19):7979-84.
395. Chen X, Makarewicz JM, Knauf JA, Johnson LK, Fagin JA. Transformation by Hras(G12V) is consistently associated with mutant allele copy gains and is reversed by farnesyl transferase inhibition. Oncogene. 2014;33(47):5442-9.
396. Matsuda K, Nakazawa Y, Sakashita K, Shiohara M, Yamauchi K, Koike K. Acquisition of loss of the wild-type NRAS locus with aggressive disease progression in a patient with juvenile myelomonocytic leukemia and a heterozygous NRAS mutation. Haematologica. 92. Italy2007. p. 1576-8.
397. Gast A, Scherer D, Chen B, Bloethner S, Melchert S, Sucker A, et al. Somatic alterations in the melanoma genome: a high-resolution array-based comparative genomic hybridization study. Genes Chromosomes Cancer. 2010;49(8):733-45.
398. Stark M, Hayward N. Genome-wide loss of heterozygosity and copy number analysis in melanoma using high-density single-nucleotide polymorphism arrays. Cancer Res. 2007;67(6):2632-42.
399. Modrek B, Ge L, Pandita A, Lin E, Mohan S, Yue P, et al. Oncogenic activating mutations are associated with local copy gain. Mol Cancer Res. 2009;7(8):1244-52.
400. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, Bordoni R, Casetti I, Milanesi C, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. Blood. 2013;121(21):4388-95.
401. Dunbar AJ, Gondek LP, O'Keefe CL, Makishima H, Rataul MS, Szpurka H, et al. 250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies. Cancer Res. 2008;68(24):10349-57.
402. Jonsson G, Dahl C, Staaf J, Sandberg T, Bendahl PO, Ringner M, et al. Genomic profiling of malignant melanoma using tiling-resolution arrayCGH. Oncogene. 2007;26(32):4738-48.
403. Trent JM, Meyskens FL, Salmon SE, Ryschon K, Leong SP, Davis JR, et al. Relation of cytogenetic abnormalities and clinical outcome in metastatic melanoma. N Engl J Med. 1990;322(21):1508-11.
404. Rakosy Z, Vizkeleti L, Ecsedi S, Voko Z, Begany A, Barok M, et al. EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. Int J Cancer. 2007;121(8):1729-37.
405. Boone B, Jacobs K, Ferdinande L, Taildeman J, Lambert J, Peeters M, et al. EGFR in melanoma: clinical significance and potential therapeutic target. J Cutan Pathol. 2011;38(6):492-502.
406. Li J, Miao N, Liu M, Cui W, Liu X, Li X, et al. Clinical significance of chromosome 1p/19q loss of heterozygosity and Sox17 expression in oligodendrogliomas. Int J Clin Exp Pathol. 2014;7(12):8609-15.
407. Caron H, van Sluis P, van Roy N, Beks L, Maes P, Pereira do Tanque R, et al. Chromosome 1p allelic loss in neuroblastoma: prognosis, genomic imprinting and 1;17 translocations. Prog Clin Biol Res. 1994;385:35-42.
408. Borg A, Zhang QX, Olsson H, Wenngren E. Chromosome 1 alterations in breast cancer: allelic loss on 1p and 1q is related to lymphogenic metastases and poor prognosis. Genes Chromosomes Cancer. 1992;5(4):311-20.

409. Sharma SV, Gajowniczek P, Way IP, Lee DY, Jiang J, Yuza Y, et al. A common signaling cascade may underlie "addiction" to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes. Cancer Cell. 2006;10(5):425-35.
410. Sharma SV, Settleman J. Exploiting the balance between life and death: targeted cancer therapy and "oncogenic shock". Biochem Pharmacol. 2010;80(5):666-73.
411. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature. 2005;436(7051):720-4.
412. Wheler J, Yelensky R, Falchook G, Kim KB, Hwu P, Tsimberidou AM, et al. Next generation sequencing of exceptional responders with BRAF-mutant melanoma: implications for sensitivity and resistance. BMC Cancer. 2015;15:61.
413. Kramkimel N, Thomas-Schoemann A, Sakji L, Golmard J, Noe G, Regnier-Rosencher E, et al. Vemurafenib pharmacokinetics and its correlation with efficacy and safety in outpatients with advanced BRAF-mutated melanoma. Target Oncol. 2016;11(1):59-69.
414. Aronson JK, Hardman M. ABC of monitoring drug therapy. Measuring plasma drug concentrations. Bmj. 1992;305(6861):1078-80.
415. Costedoat-Chalumeau N, Galicier L, Aumaitre O, Frances C, Le Guern V, Liote F, et al. Hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus: results of a French multicentre controlled trial (PLUS Study). Ann Rheum Dis. 2013;72(11):1786-92.
416. Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z, Hulot JS, Hammoud HA, Aymard G, Cacoub P, et al. Low blood concentration of hydroxychloroquine is a marker for and predictor of disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2006;54(10):3284-90.
417. Burger H, van Tol H, Brok M, Wiemer EA, de Bruijn EA, Guetens G, et al. Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. Cancer Biol Ther. 2005;4(7):747-52.
418. Chartrain M, Riond J, Stennevin A, Vandenberghe I, Gomes B, Lamant L, et al. Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. PLoS One. 2012;7(5):e36762.
419. Wu CP, Sim HM, Huang YH, Liu YC, Hsiao SH, Cheng HW, et al. Overexpression of ATP-binding cassette transporter ABCG2 as a potential mechanism of acquired resistance to vemurafenib in BRAF(V600E) mutant cancer cells. Biochem Pharmacol. 2013;85(3):325-34.
420. Hurabielle C, Pillebout E, Stehle T, Pages C, Roux J, Schneider P, et al. Mechanisms Underpinning Increased Plasma Creatinine Levels in Patients Receiving Vemurafenib for Advanced Melanoma. PLoS One. 2016;11(3):e0149873.
421. Teuma C, Perier-Muzet M, Pelletier S, Nouvier M, Amini-Adl M, Dijoud F, et al. New insights into renal toxicity of the B-RAF inhibitor, vemurafenib, in patients with metastatic melanoma. Cancer Chemother Pharmacol. 2016.
422. Ouellet D, Gibiansky E, Leonowens C, O'Hagan A, Haney P, Switzky J, et al. Population pharmacokinetics of dabrafenib, a BRAF inhibitor: effect of dose, time, covariates, and relationship with its metabolites. J Clin Pharmacol. 2014;54(6):696-706.
423. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002604/WC500149671.pdf.
424. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Assessment_Report_-_Variation/human/002643/WC500196317.pdf.
425. Infante JR, Fecher LA, Falchook GS, Nallapareddy S, Gordon MS, Becerra C, et al. Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1 dose-escalation trial. Lancet Oncol. 2012;13(8):773-81.
426. European Union: Strategic Research Agenda for Innovative Medicines Initiative.: http://www.efpia.eu/uploads/Modules/Documents/def_efpia_brochure_sra_a4_web.pdf.; Assessed 21 September 2015.
427. Zabor EC, Heller G, Schwartz LH, Chapman PB. Correlating Surrogate Endpoints with Overall Survival at the Individual Patient Level in BRAFV600E-Mutated Metastatic Melanoma Patients Treated with Vemurafenib. Clin Cancer Res. 2016;22(6):1341-7.

428. Pazdur R. Endpoints for assessing drug activity in clinical trials. Oncologist. 2008;13 Suppl 2:19-21.
429. Fleming TR, DeMets DL. Surrogate end points in clinical trials: are we being misled? Ann Intern Med. 1996;125(7):605-13.
430. Buyse M, Thirion P, Carlson RW, Burzykowski T, Molenberghs G, Piedbois P. Relation between tumour response to first-line chemotherapy and survival in advanced colorectal cancer: a meta-analysis. Meta-Analysis Group in Cancer. Lancet. 2000;356(9227):373-8.
431. Ratain MJ, Eckhardt SG. Phase II studies of modern drugs directed against new targets: if you are fazed, too, then resist RECIST. J Clin Oncol. 22. United States2004. p. 4442-5.
432. Flaherty KT, Hennig M, Lee SJ, Ascierto PA, Dummer R, Eggermont AM, et al. Surrogate endpoints for overall survival in metastatic melanoma: a meta-analysis of randomised controlled trials. Lancet Oncol. 2014;15(3):297-304.
433. Ascierto PA, Long GV. Progression-free survival landmark analysis: a critical endpoint in melanoma clinical trials. Lancet Oncol. 2016.
434. Grob JJ, Long GV, Schadendorf D, Flaherty K. Disease kinetics for decision-making in advanced melanoma: a call for scenario-driven strategy trials. Lancet Oncol. 2015;16(13):e522-6.
435. Seifert H, Fisher R, Martin-Liberal J, Edmonds K, Hughes P, Khabra K, et al. Prognostic markers and tumour growth kinetics in melanoma patients progressing on vemurafenib. Melanoma Res. 2016;26(2):138-44.
436. Long GV., Grob JJ, Davies MA, Lane S, Legenne P, Flaherty KT. Baseline and postbaseline characteristics associated with treatment benefit across Dabrafenib and Trametinib registration pooled data. SMR; 2015.
437. McArthur G, Larkin J, Asciertp P, Hsu J, Yan Y, Rooney I, et al. Efficacy of cobimetinib (C) and vemurafenib (V) in advanced *BRAF*-mutated melanoma patients (pts) with poor and favorable prognosis in the coBRIM phase III study. ASCO meeting. J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 9530).
438. Einarsdottir BO, Bagge RO, Bhadury J, Jespersen H, Mattsson J, Nilsson LM, et al. Melanoma patient-derived xenografts accurately model the disease and develop fast enough to guide treatment decisions. Oncotarget. 2014;5(20):9609-18.

ANNEXES

- Ilie M, Long-Mira E, Funck-Brentano E, Lassalle S, Butori C, Lespinet-Fabre V, Bordone O, Gay A, Zahaf K, Poissonnet G, Lacour JP, Bahadoran P, Ballotti R, Gros A, Dutriaux C, Saiag P, Merlio JP, Vergier B, Emile JF, Hofman V, Hofman P. Immunohistochemistry as a potential tool for routine detection of the *NRAS* Q61R mutation in patients with metastatic melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2015 May;72(5):786-93. doi: 10.1016/j.jaad.2015.01.012. Epub 2015 Feb 7. PubMed PMID: 25659223.

- Goldwirt L, Chami I, Feugeas JP, Pages C, Brunet-Possenti F, Allayous C, Baroudjian B, Madelaine I, Sauvageon H, Mourah S, Lebbé C. Reply to 'Plasma vemurafenib concentrations in advanced *BRAF*V600^{mut} melanoma patients: impact on tumour response and tolerance' by Funck-Brentano et al. *Ann Oncol*. 2016 Feb;27(2):363-4. doi: 10.1093/annonc/mdv538. Epub 2015 Nov 16. PubMed PMID:26578723.

Immunohistochemistry as a potential tool for routine detection of the *NRAS* Q61R mutation in patients with metastatic melanoma

Marius Ilie, MD, PhD,[a,b] Elodie Long-Mira, MD,[a] Elisa Funck-Brentano, MD,[c,d] Sandra Lassalle, MD, PhD,[a] Catherine Butori, MD,[a] Virginie Lespinet-Fabre, PhD,[b] Olivier Bordone, MSc,[b] Alexandre Gay, MSc,[b] Katia Zahaf, MSc,[b] Gilles Poissonnet, MD,[f] Jean-Philippe Lacour, MD, PhD,[g] Philippe Bahadoran, MD, PhD,[g,h] Robert Ballotti, PhD,[h] Audrey Gros, MD,[i] Caroline Dutriaux, MD, PhD,[j] Philippe Saiag, MD, PhD,[c,d] Jean-Philippe Merlio, MD, PhD,[i] Béatrice Vergier, MD, PhD,[i] Jean François Emile, MD, PhD,[c,e] Véronique Hofman, MD, PhD,[a,b] and Paul Hofman, MD, PhD[a,b]

Nice, Boulogne, and Bordeaux, France

Background: It can be useful to assess the *NRAS* mutation status in patients with metastatic melanoma because *NRAS*-activating mutations confer resistance to RAF inhibitors, and *NRAS*-mutated patients appear to be sensitive to mitogen-activated protein kinase (MEK) inhibitors.

Objective: We aimed to assess the diagnostic accuracy of an immunohistochemistry (IHC) approach using a novel anti-NRAS (Q61R) monoclonal antibody on formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples from patients with metastatic melanoma.

Methods: We conducted a retrospective multicenter cohort study on 170 patients with metastatic melanoma. The automated IHC assay was performed using the SP174 clone, and compared with results of the molecular testing.

Results: Evaluation of a test cohort with knowledge of the mutation status established a specific IHC pattern for the mutation. In the independent blinded analysis of the remaining cases, the anti-NRAS (Q61R) antibody accurately identified all *NRAS* Q61R-mutated tumors, and demonstrated 100% sensitivity and specificity.

Limitations: Limitations include retrospective design and lack of multicenter interobserver reproducibility.

Conclusion: The NRAS (Q61R) IHC assay is reliable and specific for the evaluation of the Q61R mutation status in metastatic melanoma and may be an alternative to molecular biology in evaluation of metastatic melanoma in routine practice. (J Am Acad Dermatol 2015;72:786-93.)

Key words: immunohistochemistry; metastatic melanoma; molecular biology; *NRAS*; Q61R mutation; SP174 clone.

The *NRAS* gene is mutated in approximately 15% to 25% of melanomas of Caucasian patients, most frequently at hotspots in exons 1 (codons 12 and 13) and 2 (codon 61).[1,2] Among codon-61 *NRAS* mutations in cutaneous melanoma, the most common is the Q61R (CAA>CGA) point

From the Laboratory of Clinical and Experimental Pathology[a] and Human Biobank BB-0033-00025,[b] Pasteur Hospital, Nice; EA4340-Biomarqueurs en Cancérologie et Onco-Hématologie (BCOH), University of Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (SQY), Boulogne[c]; Departments of General and Oncologic Dermatology[d] and Pathology,[e] Ambroise Paré Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Boulogne; Surgery Department, Comprehensive Cancer Center Antoine Lacassagne, Nice[f]; Dermatology Department, Archet II Hospital, Nice[g]; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1065, Team 1, University of Nice Sophia Antipolis[h]; Pathology and Molecular Biology Departments, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) and EA2406 University of Bordeaux[i]; and Department of Oncologic Dermatology, CHU Bordeaux.[j]

Funding sources: None.

Conflicts of interest: None declared.

Accepted for publication January 9, 2015.

Reprint requests: Paul Hofman, MD, PhD, Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, Pasteur Hospital, 30 Voie Romaine, 06001 Nice Cedex 01, France. E-mail: hofman.p@chu-nice.fr.

Published online February 5, 2014.

0190-9622/$36.00

© 2015 by the American Academy of Dermatology, Inc.

http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2015.01.012

mutation (approximately 35%-40% of all *NRAS* mutations), which leads to substitution of glutamine by arginine.[3,4] Although the effect of these mutations on clinical outcome remains uncertain,[5,6] patients with *NRAS* mutations have a higher incidence of brain metastases at the time of diagnosis of stage IV disease compared with patients with wild type. The *NRAS* mutation status has been identified as an independent predictor of shorter survival after diagnosis of stage IV melanoma.[4]

NRAS mutations have been consistently described as a mechanism of resistance to BRAF inhibitors.[7,8] Importantly, there is some evidence that a subgroup of *NRAS*-mutated melanoma may be sensitive to MEK inhibition, either alone or with combinatorial strategies.[9-11] Thus, therapeutic strategies targeting the signaling pathways downstream NRAS are under development and are being evaluated in clinical trials.[12]

Currently, the *NRAS* mutation status is routinely screened in patients with metastatic melanoma. The screening is typically determined by DNA-based molecular techniques. However, this strategy is relatively expensive and time-consuming. Additional preanalytical issues include the variable quality of DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue, specimens of small size or with a low tumor cell content, and inhibition of polymerase chain reaction by melanin pigment.[13] These issues highlight the need to establish faster and more efficient methods to screen for *NRAS* mutations. Of particular interest, the development of an antibody directed against the Q61R protein, the clone SP174 has opened new avenues in metastatic melanoma diagnosis by immunohistochemistry (IHC) to identify the *NRAS* Q61R mutation in routine clinical practice.

Accordingly, we conducted a large retrospective multicenter cohort study to assess the efficacy of the SP174 antibody in cases of metastatic melanoma by comparison with DNA analyses.

CAPSULE SUMMARY

- *NRAS* mutations are currently detected by sequencing assays.
- The anti-NRAS Q61R antibody accurately identifies the *NRAS* Q61R mutation in patients with metastatic melanoma.
- The reported immunohistochemistry assay may be a reliable alternative to molecular biology in evaluation of metastatic melanoma in routine practice.

METHODS

Sample selection

Patient specimens were retrieved from 3 centers: the Department of Clinical and Experimental Pathology and the Hospital-integrated Biobank (BB-0033-00025, Pasteur Hospital, Nice, France), the Department of Pathology of the Ambroise Paré Hospital (AP-HP, Boulogne, France), and the Pathology Department of the CHU of Bordeaux (Bordeaux, France). Written informed consent regarding the use of tissue and data for scientific purposes was obtained from all participating patients. Data transfer and use for statistical analyses were done in an anonymized manner. The ethics committees of the participating centers approved this retrospective study.

Histologic sections of all cases were reviewed by 2 board-certified dermatopathologists in each center. A total of 170 patients across the 3 centers were included in the study. These included archival tissue from metastatic (n = 154) (regional lymph nodes, cutaneous/subcutaneous, lung, liver) and primary cutaneous (n = 28) melanoma collected before targeted therapy (BRAF/MEK inhibitors) between January 2008 and August 2014. Inclusion criteria required selected cases with adequate tumor tissue in the FFPE block for genetic and immunohistochemical analyses. The demographics of the patients included in the study are detailed in Table I.

Molecular analyses

In all cases, the tumor mutation status was determined before the study as part of a clinical workup by International Organization for Standardization (ISO) 15189-accredited pyrosequencing assays in each of the 3 centers. Tumor DNA was isolated from FFPE tissue samples using the QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Pyrosequencing of the *NRAS* exon 1 (codon 12 and 13) and exon 2 (codons 60 and 61) using the Therascreen *NRAS* Pyro kit (Qiagen) and *BRAF* exon 15 using the Therascreen *BRAF* Pyro Kit (Qiagen) was performed as previously described.[14,15]

Immunohistochemistry

To avoid experimental variability, a single immunostaining protocol was performed in the Clinical and Experimental Pathology Laboratory (Nice, France) on all specimens. The original block used for molecular analyses was accessible and immunostained for all the specimens.

All staining procedures were performed in an automated immunostainer (Ventana BenchMark XT,

Table I. Main clinicopathological parameters of the patients with metastatic melanoma included in this study

	Overall
	170 (100%)
Age at diagnosis, y	
Median	68
Range	25-89
Gender	
Male	102 (60%)
Female	68 (40%)
Histology	
Superficial spreading	69 (41%)
Nodular	45 (26%)
Acral lentiginous	14 (8%)
Lentigo maligna	8 (5%)
Other*	14 (8%)
Unknown	20 (12%)
Primary site	
Trunk	48 (28%)
Arm/leg	52 (31%)
Hand/foot	20 (12%)
Head/neck	19 (11%)
Not assessed	31 (18%)
Breslow thickness, median (range), mm	2.6 (0.4-19.0)
Assessed	150 (88%)
Not assessed	20 (12%)
Ulceration	
Present	63 (37%)
Absent	77 (45%)
Not assessed	30 (18%)
Mitotic rate/mm^2	
<1	23 (14%)
≥1	99 (58%)
Not assessed	48 (28%)
M category†	
M1a	83 (49%)
M1b	50 (29%)
M1c	37 (22%)
Mutation status	
Double WT	36 (21%)
Mutated *BRAF*	65 (38%)
Mutated *NRAS*	70 (41%)
Q61R	45 (26%)
Other	25 (15%)

*Spindle, desmoplastic, epithelioid, nevoid, or Spitzoid histology.
†By anatomical sites of involvement: M1a = skin, subcutaneous, lymph nodes; M1b = lung; M1c = any other visceral site.

Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) using standard reagents provided by the manufacturer. We baked 4 μm–thick whole sections from FFPE melanoma tissue blocks at 75°C for 30 minutes. After CC1 (Ventana Medical Systems) antigen retrieval, deparaffinized sections were incubated with the anti-NRAS (Q61R) rabbit monoclonal antibody (clone SP174, catalog number, M4742; Spring Bioscience, Pleasanton, CA) at a dilution of 1:50 for 32 minutes at 37°C. For visualization, the ultraView Universal DAB Detection Kit was used according to the manufacturer's instructions (Ventana Medical Systems).

A positive control cell line (C-12.38) was a kind gift from Dr Maryline Allegra (INSERM, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Team 1, Nice, France). Each IHC run contained a positive control (C-12.38 cells) and an antibody negative control (buffer, no primary antibody).

Table II. Summary of the *NRAS* mutation status based on the molecular analysis and the highest intensity staining score on immunohistochemistry with the anti-NRAS Q61R antibody

		IHC intensity scores, n			
NRAS genotype	Overall, n	0	1+	2+	3+
Q61R	45	0	0	11	34
Q61K	17	14	3	0	0
Q61L	4	3	1	0	0
Q61H	3	2	1	0	0
G13R	1	1	0	0	0
Wild type	100	96	4	0	0

IHC, Immunohistochemistry.

IHC scoring methodology

NRAS Q61R expression was quantified using the H-score method, which is derived by summing the products of the percentage of positive cells (0%-100%) and the intensity (0-3+) for that group, resulting in a final IHC score e ranging from 0 to 300. The staining intensity was scored based on the cytoplasmic and/or membrane staining intensity as follows: 0 if tumor cells had a complete absence of staining or faint staining intensity in less than 10%; 1+ if more than 10% of tumor cells had faint staining only detectable at high magnification (×20–40 objective); 2+ if tumor cells had moderate staining; and 3+ if tumor cells had strong staining, based on the ease of detection at low magnification (×4 objective).[16] Consensus examination of IHC staining was first performed by 3 pathologists (M. I., V. H., and P. H.) on a test cohort consisting of 10 cases with full knowledge of the *NRAS* mutation status (Q61R, n = 5; Q61K, n = 2; and WT, n = 3) to characterize the staining pattern for the NRAS Q61R mutation. Subsequently, a validation cohort of 160 cases was used to assess the diagnostic accuracy of the NRAS Q61R antibody. All immunostained slides were independently evaluated by each of the above observers blinded to clinical, histopathological, and genotype data. The 3 H-scores were averaged. Differences in interpretation were resolved at a multihead microscope by consensus.

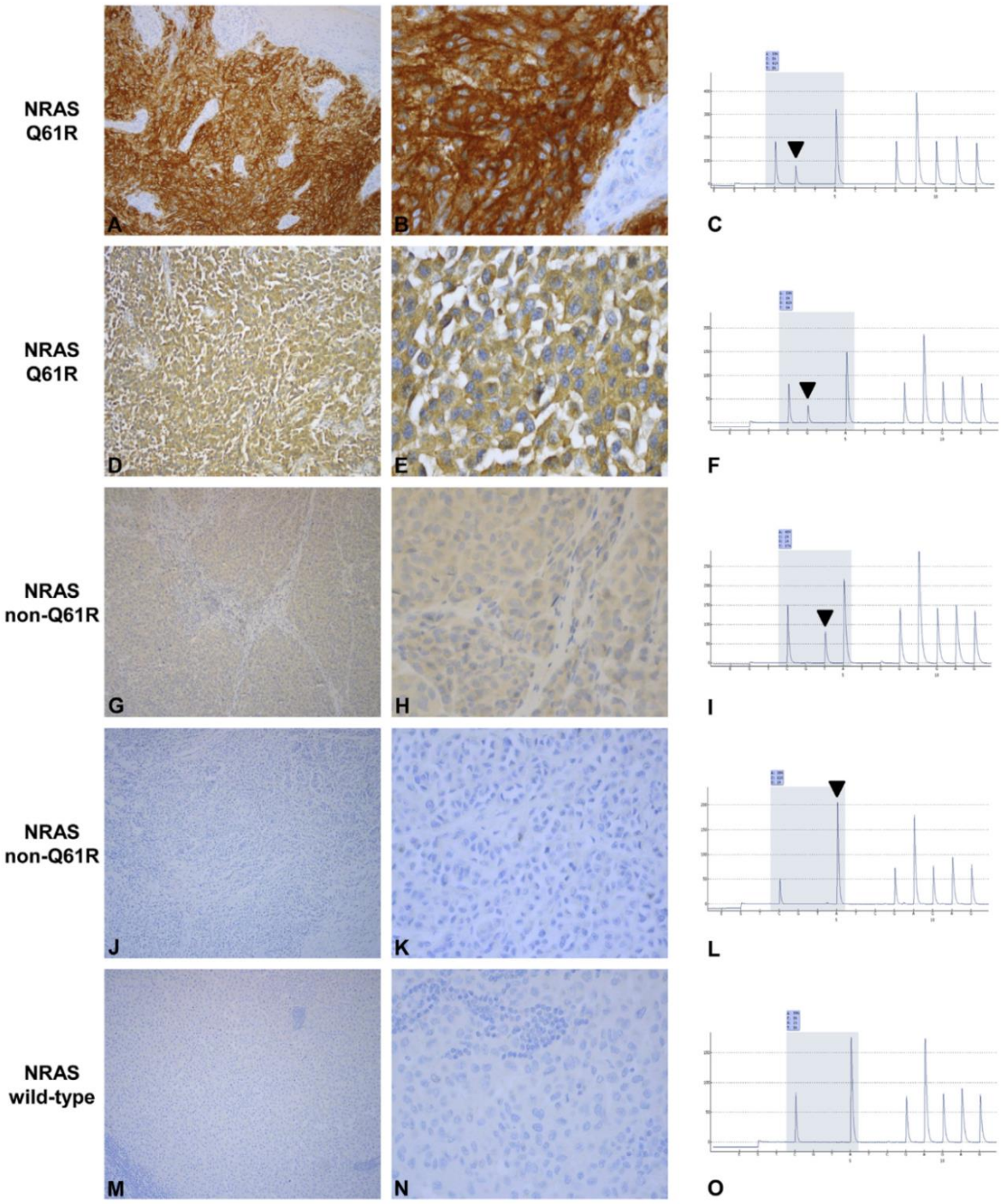


Fig 1. Representative images for NRAS Q61R detection in melanoma by immunohistochemistry (monoclonal SP174 NRAS Q61R antibody). **A** and **B**, *NRAS* Q61R-mutated lymph node metastatic melanoma specimen showing diffusely strong (3+) cytoplasmic staining with some membranous accentuation. **C**, Pyrosequencing graph demonstrating 42% of *NRAS* Q61R-mutated allele (*arrowhead*). **D** and **E**, *NRAS* Q61R-mutated lung metastatic melanoma specimen showing diffusely moderate (2+) cytoplasmic staining. **F**, Pyrosequencing graph demonstrating 41% of *NRAS* Q61R-mutated allele (*arrowhead*). **G** and **H**, Lymph node metastatic melanoma harboring the *NRAS* Q61L mutation showing only weak (1+) staining. **I**, Pyrogram showing the glutamine to leucine substitution (CAA to CTA) (*arrowhead*). **J** and **K**, One case harboring the *NRAS* Q61K mutation with no background staining. **L**, Pyrogram demonstrating the glutamine to lysine substitution (CAA to AAA) (*arrowhead*). **M** and **N**, *NRAS* wild-type lymph node metastatic specimen with no staining. **O**, Pyrosequencing graph demonstrating no *NRAS* mutation in codon 61. (Original magnifications; **A**, **D**, **G**, **J**, and **M**, ×10; **B**, **E**, **H**, **K**, and **N**, ×40.)

Statistical analysis

The receiver operating characteristic curve was used to estimate the cutoff value for NRAS Q61R immunostaining based on the H-score in the test cohort. Specificity, sensitivity, positive predictive value, and negative predictive value were calculated using the molecular testing results as the reference standard. Fleiss κ statistics were calculated using software (SPSS, Version 16.0, IBM Corp, Armonk, NY).

RESULTS

To evaluate the performance of the mutant-specific NRAS Q61R antibody, the population studied was enriched in *NRAS* Q61R-mutant cases. *NRAS* mutations were identified in 41% (70/170) of the cases by pyrosequencing, reflecting enrichment compared with a reported prevalence of about 15% to 25%.[1,2] The *NRAS* Q61R mutation was detected in 64% (45/70), whereas 36% (25/70) of cases had mutations other than Q61R (Table II). Two (1%) patients had activating mutations in both *NRAS* and *BRAF* genes; 32 (19%) of patients did not have a mutation in either the *BRAF* exon 15 or *NRAS* exons 1 to 2.

Consensus evaluation of the test cohort (n = 10) with full knowledge of the *NRAS* mutation status revealed a specific staining pattern for predicting the *NRAS* Q61R mutation. Cases were marked positive if they exhibited diffuse cytoplasmic staining, with or without membrane reinforcement, with a moderate 2+ or strong 3+ intensity in any extent. Application of this staining pattern in the validation cohort yielded an overall sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of 100%, across the 3 observers, following independent blinded evaluation of the NRAS Q61R staining (Table II). The Fleiss κ for interobserver agreement was 0.97. In the 2 discrepant cases, 2 of the 3 pathologists concurred; thus the cases were reviewed and assigned a consensus result. The H-score range for the *NRAS* Q61R-mutated cases was 190 to 300 (median, 300), for the non-Q61R-mutated cases was 0 to 100 (median, 0), and for the wild-type cases was 0 to 50 (median, 0). The lowest positive staining had an H-score of 190, showing 90% of tumor cells with moderate (2+) staining and 10% with weak (1+) staining. Based on the raw H-scores in the validation cohort, we further set up a more conventional criteria for routine practice based on staining extent and intensity. Thus, the receiver operating characteristic curve analysis showed that an H-score of 120 or greater still predicted *NRAS* Q61R-mutated cases with 100% sensitivity and specificity. The best separation was achieved when immunopositivity was defined as 60% or more tumor cells labeling with moderate 2+ staining, as recently reported.[17]

Moreover, in 10 cases with specimens available from 2 different sites from the same patient (synchronous metastatic sites, n = 3; synchronous primary and metastatic specimens, n = 7), there was 100% accuracy in staining, in agreement with the molecular analysis. Interestingly, among 6 patients carrying the *NRAS* Q61R mutation as demonstrated by both IHC and molecular analyses, 2 patients demonstrated a discordant *NRAS* Q61R mutation status between the primary wild type and the metastatic site that had the *NRAS* Q61R mutation. In addition, 1 patient harbored the *NRAS* Q61R mutation in a metastatic site, whereas the second metastatic site had the *NRAS* Q61K mutation. All these specimens were *BRAF* wild type. Finally, 2 synchronous primary melanomas from the same patient presented a divergent *NRAS* status: 1 had a *NRAS* Q61R mutation whereas the second harbored the *NRAS* Q61L mutation.

A large majority (64%) of the *NRAS* Q61R-mutated cases showed diffuse and homogeneous 3+ in 58% or 2+ only staining in 6% of the cases. In 16 cases (36%) the staining pattern was diffuse, but the intensity was less homogenous. In 14 cases tumor cells showed 3+ intensity staining along with 2+ intensity staining within a range of 10% to 80% (H-score range, 210-280). Two cases had a majority of tumor cells with 2+ cytoplasmic staining with the remaining cells (10%) showing a weak (1+) staining intensity. There was no relation between the SP174 staining intensity and frequency of *NRAS* Q61R-mutated allele determined by pyrosequencing analysis (mean percent mutated allele in the 3+ group = 47% vs 41% in the 2+ intensity group).

Focal weak (1+) staining was observed in occasional wild−type (4%, 4/100) or non−Q61R *NRAS*-mutant cases (Fig 1 and Table II). It is noteworthy that necrotic areas, lymphoreticular cells, and histiocytes showed rather frequently a high degree of background staining (Fig 2). A weak nonspecific reaction was sometimes observed in adipocytes, vascular tissue, plasma cells, and some benign bronchial epithelial cells. No nuclear staining was noted. Pyrosequencing analysis of such cases demonstrated this staining to be nonspecific and such staining should be excluded in the interpretation of the IHC.

DISCUSSION

Our study shows that immunohistochemical staining with the SP174 clone performs remarkably well for *NRAS* Q61R-mutant protein assessment in a

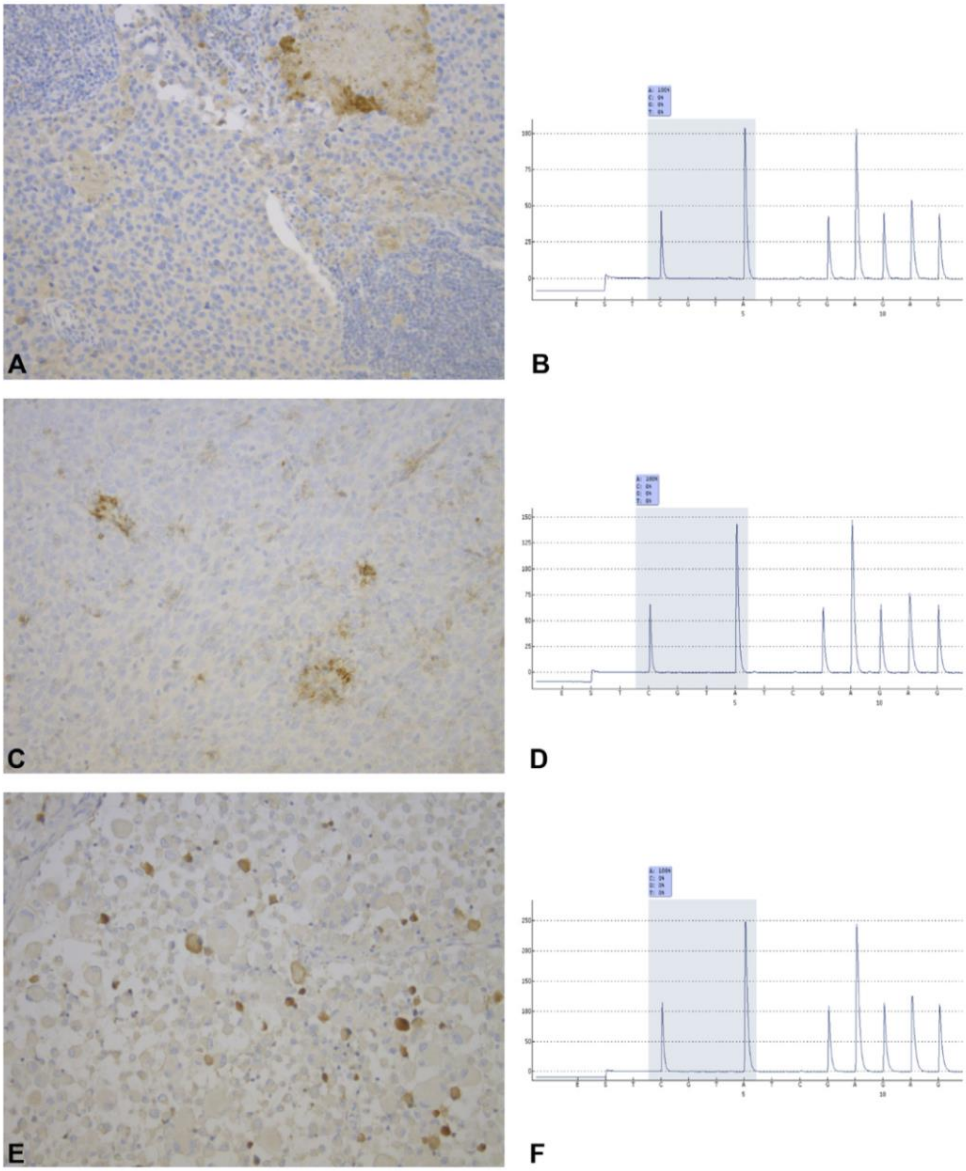


Fig 2. Metastatic melanoma specimens with negative immunostaining of the tumor cells but a nonspecific reaction in necrotic area (**A**), lymphoreticular cells (**C**), or histiocytes (**E**). **B**, **D**, and **F**, Pyrograms demonstrating no *NRAS* mutation in codon 61 in the corresponding cases. (**A**, **C**, and **E**, Original magnifications: ×10.)

large multicenter cohort of patients with metastatic melanoma. Our results are in agreement with a recently concomitantly published study.[17] Here, we provide helpful clues to predict *NRAS* Q61R mutation in routine practice based on the IHC approach, such as diffuse extent, moderate to strong staining intensity, H-score 120 or greater, and immunopositivity defined as 60% or greater tumor cells labeling with moderate 2+ staining. Adherence to predefined staining criteria as determined in a cohort test resulted not only in high concordance with the mutation analysis, but also in excellent interobserver agreement between pathologists, suggesting that the interpretation was straightforward and reproducible.

In our study the staining pattern of the *NRAS* Q61R-mutant cases revealed a relatively low degree of intratumoral heterogeneity staining. Nevertheless, 20% of non-Q61R cases and 11% of *NRAS* wild-type cases showed weak focal cytoplasmic staining, which if counted would have decreased the specificity of the IHC assay from 100% to 92%. Thus, faint cytoplasmic staining should be disregarded for positivity with the SP174 antibody. In addition, awareness of pitfalls in interpretation of staining is essential as nonspecific staining was frequently

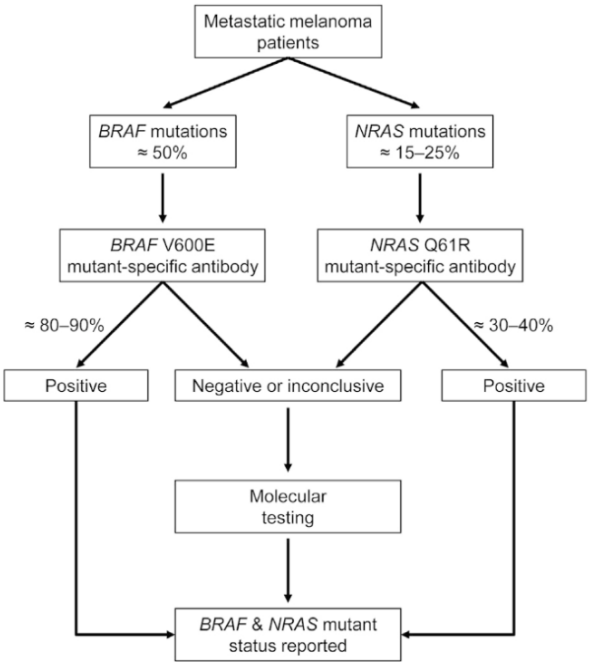


Fig 3. Proposed algorithm for the use of NRAS and BRAF mutation−specific antibodies.

observed in our series, most likely in necrotic areas, lymphoreticular, and histiocytes. Isolated faint staining may be the result of a nonspecific chromogen uptake of variably pigmented cells whose true nature (melanoma cells vs cells of histiocytic/macrophage lineage) can be difficult to assess with certainty on immunostained slides. In such cases, a clearly positive *NRAS* Q61R external specimen, processed on each slide tested, may be useful to confirm the nonspecific weak background staining.

Some degree of *NRAS*-mutant clonal heterogeneity was described within the same tumor specimen and between the primary and the metastatic lesion.[18,19] In our study, the staining intensity was not related to the frequency of the mutated allele, suggesting that a *NRAS* Q61R mutation subclone with less than 10% of mutated tumor cells, but with a staining intensity of 2+/3+, could theoretically be detected. Further, we demonstrated 100% concordance and accuracy of staining in 10 cases for which both primary and metastatic samples from the same patient were examined. Consistent with recent reports, we found in rare cases intertumoral heterogeneity of IHC SP174 staining.[18,19] In some cases, the event of an unknown primary tumor may explain this discrepancy. Moreover, this study shows that *NRAS* and *BRAF* mutations are not necessarily mutually exclusive in metastatic melanoma, as previously described.[19-22] These findings argue for testing for both *BRAF* and *NRAS* mutations before targeted treatment of patients with metastatic melanoma.

We found the IHC assay for the *NRAS* Q61R mutation to be highly reliable. Thus, a positive result could obviate the need for confirmatory molecular testing and targeted therapy could be initiated based only on the IHC result, whereas a negative or equivocal result would require additional molecular testing. A similar scenario has been proposed for the use of the *BRAF*V600E mutation-specific antibody in patients with metastatic melanoma.[23-26] Based on these considerations, we propose here a schema for the possible use of these antibodies, which could reduce the volume of molecular testing for *NRAS* and *BRAF* mutations in metastatic melanomas by about 55% (Fig 3). The benefits of such a test algorithm should be balanced with the potential delay caused by the introduction of a supplementary step before molecular testing and with the cost tradeoff of running IHC for all cases so as to reduce the number of molecular tests.[27] Before implementation of NRAS Q61R IHC for clinical use, it is pivotal to understand the issues potentially associated with the variability between the different IHC platforms. Nevertheless, IHC provides a rapid standardized test, which is now widely accessible to all clinical pathology laboratories and should be integrated into a clinical context.[28]

In conclusion, mutation-specific IHC for the *NRAS* Q61R mutation is highly reliable and could be used as a rapid screening test for mutations in patients with metastatic melanoma.

We thank Professor M. Beylot-Barry (Service de dermatologie, Hopital Haut-lévêque CHU Bordeaux) and the team EA2406 (Université Bordeaux 2, Histologie et Pathologie Moléculaires des Tumeurs) for their support.

REFERENCES

1. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2011;164:776-784.
2. Ekedahl H, Cirenajwis H, Harbst K, et al. The clinical significance of BRAF and NRAS mutations in a clinic-based metastatic melanoma cohort. *Br J Dermatol*. 2013;169:1049-1055.
3. Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol*. 2008;1:395-405.
4. Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS, et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer*. 2012;118:4014-4023.
5. Carlino MS, Haydu LE, Kakavand H, et al. Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 2014;111:292-299.
6. Mandala M, Merelli B, Massi D. Nras in melanoma: targeting the undruggable target. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;92:107-122.

7. Nazarian R, Shi H, Wang Q, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 2010;468:973-977.
8. Trunzer K, Pavlick AC, Schuchter L, et al. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31:1767-1774.
9. Posch C, Moslehi H, Feeney L, et al. Combined targeting of MEK and PI3K/mTOR effector pathways is necessary to effectively inhibit NRAS mutant melanoma in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:4015-4020.
10. Ascierto PA, Schadendorf D, Berking C, et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harboring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomized, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2013;14:249-256.
11. Rebecca VW, Alicea GM, Paraiso KH, et al. Vertical inhibition of the MAPK pathway enhances therapeutic responses in NRAS-mutant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014; 27:1154-1158.
12. Johnson DB, Smalley KS, Sosman JA. Molecular pathways: targeting NRAS in melanoma and acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. 2014;20:4186-4192.
13. Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci*. 2010;55:25-33.
14. Moreau S, Saiag P, Aegerter P, et al. Prognostic value of BRAF(V(6)(0)(0)) mutations in melanoma patients after resection of metastatic lymph nodes. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19:4314-4321.
15. Ilie MI, Lassalle S, Long-Mira E, et al. Diagnostic value of immunohistochemistry for the detection of the BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid carcinoma: comparative analysis with three DNA-based assays. *Thyroid*. 2014;24:858-866.
16. Ruschoff J, Dietel M, Baretton G, et al. HER2 diagnostics in gastric cancer—guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch*. 2010;457:299-307.
17. Massi D, Simi L, Sensi E, et al. Immuhistochemistry is highly sensitive and specific for the detection of NRASQ61R mutation in melanoma. *Mod Pathol*. doi: 10.1038/modpathol.2014.137. Published online October 24, 2014.
18. Chiappetta C, Proietti I, Soccodato V, et al. BRAF and NRAS mutations are heterogeneous and not mutually exclusive in nodular melanoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. doi: 10.1097/PAI.0000000000000071. Published online April 5, 2014.
19. Colombino M, Capone M, Lissia A, et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol*. 2012;30:2522-2529.
20. Akslen LA, Angelini S, Straume O, et al. BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are not associated with tumor cell proliferation or patient survival. *J Invest Dermatol*. 2005;125:312-317.
21. Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. *PLoS One*. 2012;7:e29336.
22. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*. 2006;126: 154-160.
23. Fisher KE, Cohen C, Siddiqui MT, et al. Accurate detection of BRAF p.V600E mutations in challenging melanoma specimens requires stringent immunohistochemistry scoring criteria or sensitive molecular assays. *Hum Pathol*. 2014;45: 2281-2293.
24. Chen Q, Xia C, Deng Y, et al. Immunohistochemistry as a quick screening method for clinical detection of BRAF(V600E) mutation in melanoma patients. *Tumour Biol*. 2014;35: 5727-5733.
25. Ihle MA, Fassunke J, Konig K, et al. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer*. 2014;14:13.
26. Boursault L, Haddad V, Vergier B, et al. Tumor homogeneity between primary and metastatic sites for BRAF status in metastatic melanoma determined by immunohistochemical and molecular testing. *PLoS One*. 2013;8:e70826.
27. Hofman V, Ilie M, Long E, et al. Immunohistochemistry and personalized medicine in lung oncology: advantages and limitations [in French]. *Bull Cancer*. 2014;101:958-965.
28. Ilie M, Hofman P. The potential value of immunohistochemistry as a screening tool for oncogenic targets of personalized lung cancer therapy. *J Oncopathol*. 2013;1:1.

Annals of Oncology Advance Access published November 30, 2015

letter to the editor

Annals of Oncology 00: 1–2, 2015

Reply to 'Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance' by Funck-Brentano *et al*.

We read with great interest the manuscript by Funck-Brentano et al. [1], reporting in a prospective study the association of low plasma vemurafenib concentrations (PVC) with tumor progression disease (PD) according RECIST criteria in 23 advanced *BRAFV600* mutated melanoma patients.

In a monocentric prospective study enrolling 48 patients (28 M/20 F) with metastatic *BRAFV600* mutated unresectable melanoma treated with vemurafenib monotherapy (American Joint Commitee on Cancer stage IIIC $n = 9$ or IV $n = 39$), we extended these results on a larger series and provided new insight on a PVC cutoff predicting progression.

Vemurafenib (960 mg b.i.d. $n = 44$; 720 mg b.i.d. $n = 4$) was used as first-line therapy in 29 patients (60.4%), second-line in 12 patients (25%) and third-line or more in 7 patients (14.6%). Blood samples ($n = 148$, supplementary Figure S1, available at *Annals of Oncology* online) were collected monthly at any time during a dosing interval at steady state, as PVC during a dosing interval varies by only 16% over time [2]. Patients were followed every month for tolerance and response evaluation was carried out every 2 months using total body computed tomography scan with RECIST 1.1 criteria. PVC was measured using a routine high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection method. Regression analysis was carried out with R-software. PVC cutoff to predict progression was determined on median PVC for each patient by ROC curve analysis and progression-free survival (PFS) was assessed by multivariate Cox analysis (R Package).

After 12 months median follow-up (1–50), overall response rate was 52.1% [95% confidence interval CI (50–54%)] and median overall PFS reached 5.5 months (95% CI 4.5; 8 months), which was consistent with clinical trial data (BRIM-3) [3].

As expected, mean intrapatient variability reached 20.1% [3]. In line with Funck-Brentano et al. [1], PVC displayed a wide interindividual variability nonrelated to dose [2] (5.3–135.2 μg/mL, median 66.8) and median PVC tented to be lower in patients experiencing PD (51 ± 22 μg/mL) compared with complete, partial or stable responders (67 ± 24 μg/mL, $P = 0.060$, Wald test for logistic regression).

Furthermore, we extended these findings by establishing a predictive PVC cutoff for progression that was consistent with Kramkimel et al. results [4]. Indeed, patients with median PVC higher than 42 μg/mL presented a significantly lower risk of PD than patients with median PVC below 42 μg/mL during the first year after vemurafenib initiation ($P = 0.005$, supplementary Figure S2, available at *Annals of Oncology* online), confirming that low PVC could favor emerging resistance. However, such effect is no more significant after 1 year of treatment ($P = 0.071$). Therefore, we observed that even with optimized PVC, resistance occurs in the majority of cases through non-pharmacokinetics mechanisms.

In our cohort, as reported by Funck-Brentano et al. [1] no exposure–tolerance relationship was observed as PVC during adverse event occurrence ranged from 26.9 to 117.6 μg/mL.

With a longer follow-up and the determination of a PVC cutoff value predictive of PD, our study brings new insight for vemurafenib therapeutic drug monitoring during the first year of treatment. These data need to be confirmed in a larger independent study of patients treated with combination of BRAF and MEK inhibitors, now considered to be the standard of care of targeted therapy in BRAF mutated advanced melanoma.

L. Goldwirt[1,*], I. Chami[2,3,4], J.-P. Feugeas[5], C. Pages[2,3,4], F. Brunet-Possenti[2,3,4], C. Allayous[2,3,4], B. Baroudjian[2,3,4], I. Madelaine[6], H. Sauvageon[1], S. Mourah[1,†] & C. Lebbé[2,3,4,†]

[1]Department of Pharmacology, AP-HP, Saint-Louis Hospital, Inserm, U976 Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR-S-976, Paris;
[2]Department of Dermatology, AP-HP, Saint-Louis Hospital, Paris;
[3]Inserm, U 976, Paris;
[4]Faculté de Médecine, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris;
[5]INSERM, IAME, UMR 1137, Université Paris Diderot, Paris;
[6]Deparment of Pharmacy, AP-HP, Saint-Louis Hospital, Paris, France
(*E-mail: lauriane.goldwirt@aphp.fr)

disclosure

CL: Scientific committee board and consultation for Roche. SM: Scientific committee board for Roche. The other co-authors have declared no conflicts of interest.

references

1. Funck-Brentano E, Alvarez JC, Longvert C et al. Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance. Ann Oncol 2015; 26: 1470–1475.
2. EMEA. Public assessment report on Zelboraf®, EMA/200986/2012. 2012.

†Both authors contributed equally to this work.

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the European Society for Medical Oncology.
All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

3. McArthur GA, Chapman PB, Robert C et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAFV600E and BRAFV600K mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. Lancet Oncol 2014; 15: 323–332.
4. Kramkimel N, Thomas-Schoemann A, Sakji L et al. Vemurafenib pharmacokinetics and its correlation with efficacy and safety in outpatients with advanced BRAF-mutated melanoma. Target Oncol 2015 Jul 25 [epub ahead of print], doi:10.1007/s11523-015-0375-8.

doi: 10.1093/annonc/mdv538

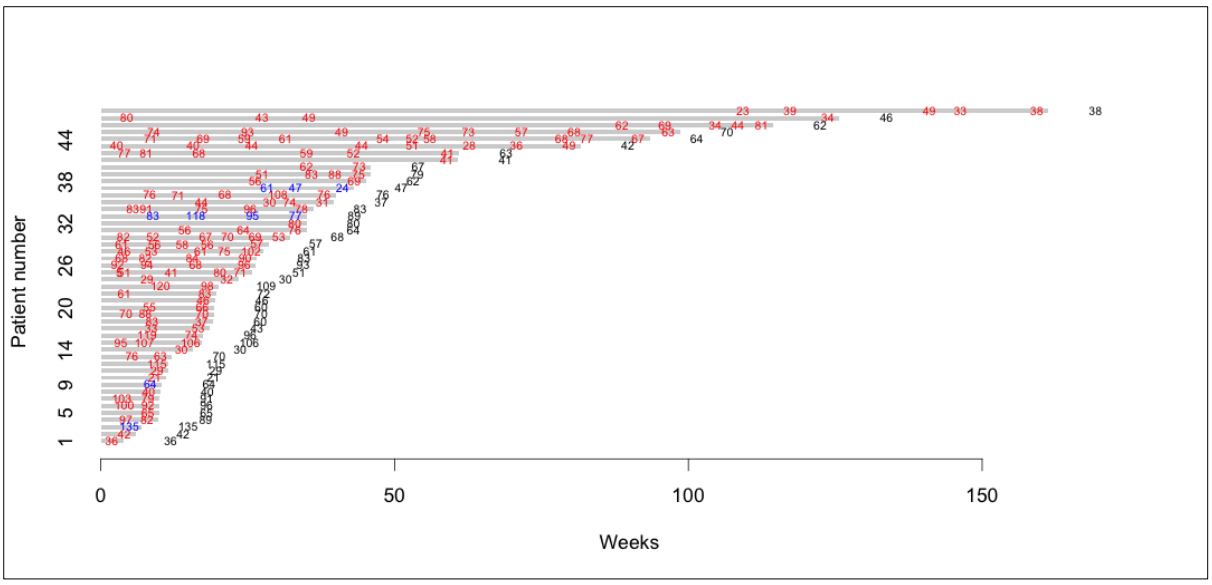


Figure S1 Swimmer plot presenting plasma vemurafenib concentrations in µg/mL. Each bar represents one patient, from the beginning of vemurafenib (0) to end of treatment in weeks or end of study. Each numerical value placed over each plot represents a vemurafenib plasma concentration result, its position on the bar represent the date of plasma drawn, the color of the result represents the dosage received (red for full dose 960mg BID; blue for reduced dose 720mg BID). The numerical value in black on the right side of each plot represents the median vemurafenib plasma concentration for each patient and overall follow-up.

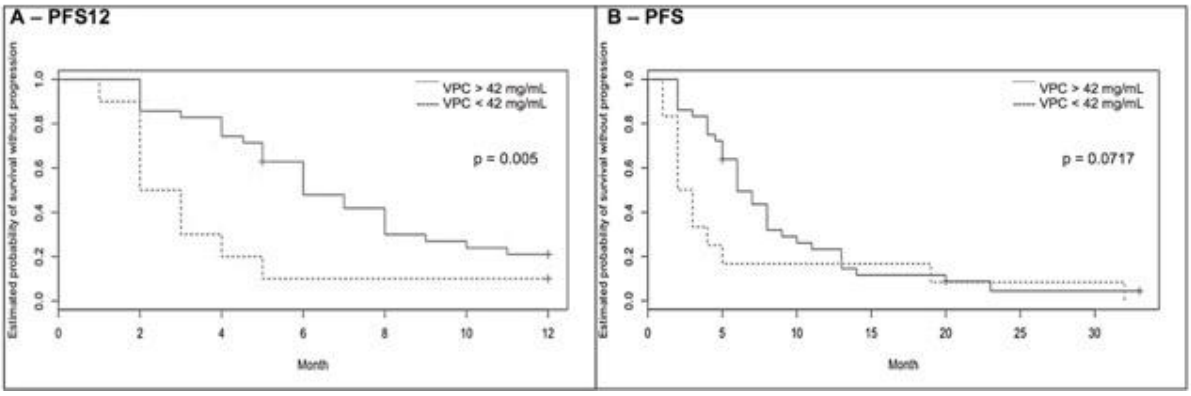


Figure S2 Progression-free survival: 1A - Progression-free survival at 12 months (PFS12); 1B - Overall progression-free survival (PFS)

université PARIS-SACLAY | ÉCOLE DOCTORALE Cancérologie, biologie, médecine, santé (CBMS)

Titre : Marqueurs prédictifs de réponse aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome cutané métastatique

Mots clés : mélanome, marqueurs, thérapies ciblées, déséquilibre allélique, pharmacologie anti-tumorale

Résumé : Les thérapies ciblées ont amélioré la survie des patients atteints de mélanome cutané métastatique, toutefois certains patients échappent au traitement. La réponse au traitement met en jeu des paramètres dépendants du patient, de la biologie de la tumeur, et de la survenue de mécanismes de résistance largement étudiés.
Le but de ce travail est d'étudier deux marqueurs mesurables en pratique clinique lors du suivi des patients, pour leur potentiel prédictif de réponse aux inhibiteurs de BRAF en monothérapie, l'un biologique et l'autre pharmacologique : la charge allélique mutée (CAM), définie par le rapport muté/total, des oncogènes *BRAF* et *NRAS*, et la concentration plasmatique de vemurafenib (CPV).
Nous rapportons pour la première fois la prévalence et les mécanismes du déséquilibre allélique des oncogènes *BRAF* et *NRAS*, défini par une CAM élevée (>60%) ou faible (≤30%), par opposition à une CAM « hétérozygote » équilibrée (entre 30 et 60%). Des arguments *in vitro* et *in vivo* soutiennent l'hypothèse qu'une CAM *BRAF*V600E >60% puisse être associée à une meilleure réponse aux inhibiteurs de BRAF. La CAM de *NRAS* ne semble pas être un marqueur pronostique au moment du diagnostic de mélanome, toutefois sa valeur prédictive sur la réponse aux inhibiteurs de MEK sera intéressante à étudier.
Nous montrons pour la première fois l'impact du dosage de la CPV lors du suivi des patients traités en monothérapie. Une CPV basse serait prédictive d'une progression ; ainsi, la CPV semble être un marqueur prédictif original de réponse, pour lequel la valeur seuil ainsi que les mécanismes pharmacogénétiques impliqués restent à déterminer.

Title: Predictive markers of response to BRAF inhibitors in metastatic cutaneous melanoma

Keywords: melanoma, markers, targeted therapies, allelic imbalance, anti-tumor pharmacology

Abstract: Targeted therapies have improved survival in patients with metastatic cutaneous melanoma, but some patients escape treatment. Response to treatment involves parameters dependent of the patient, the tumor biology, and the occurrence of resistance mechanisms extensively investigated. The aim of this work is to study two measurable markers in clinical practice in patient monitoring, for their predictive potential of response to BRAF inhibitors monotherapy; the first one is biological and the other one is pharmacological: mutant allele burden (MAB), defined by the ratio mutant/total, of *BRAF* and *NRAS* oncogenes, and plasma vemurafenib concentration (PVC).
We report for the first time the prevalence and the mechanisms of *BRAF* and *NRAS* oncogenic allelic imbalance, defined by a high (>60%) or a low (≤30%) MAB, as opposed to a balanced "heterozygous" MAB (30 to 60%). *In vitro* experiments and *in vivo* data support the hypothesis that a *BRAF*V600E MAB >60% may be associated with a better response to BRAF inhibitors. *NRAS* MAB does not seem to be a baseline prognostic marker, but its predictive value of response to MEK inhibitors will be interesting to investigate.
We demonstrated for the first time the impact of CPV assay during the monitoring of patients treated with monotherapy. A low CPV would be predictive of progression; thus, CPV appears to be an original predictive marker of response, for which the threshold value and the involved pharmacogenetic mechanisms remain to be determined.