



HAL
open science

Pertinence et validations préclinique et clinique du modèle spontané canin de mélanome dans le développement thérapeutique en oncologie

Zacharie Segoula

► **To cite this version:**

Zacharie Segoula. Pertinence et validations préclinique et clinique du modèle spontané canin de mélanome dans le développement thérapeutique en oncologie. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2017. Français. NNT : 2017LIL2S004 . tel-01690816

HAL Id: tel-01690816

<https://theses.hal.science/tel-01690816>

Submitted on 23 Jan 2018

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.



Université du droit et de la santé de Lille
Faculté de Médecine Henri Warembourg

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

En Cancérologie

Spécialité Pharmacologie expérimentale et onco-immunologie

**Pertinence et validations préclinique et clinique
du modèle spontané canin de mélanome dans le
développement thérapeutique en oncologie**

Convention CIFRE n° 2013/1203

Présentée et soutenue publiquement par

Zacharie Segaoula

Le 7 Avril 2017

Membres du Jury

Pr. Bruno Quesnel
Dr. Sylvie Zouitina-Galiegue
Dr. Florence Bernex
Dr. Stéphane Depil
Dr. Jérôme Gay-Quéheillard
Pr. Dominique Helley-Russick
Pr. Benoit Deprez
Dr. Aline Primot
Dr. Xavier Thuru
Dr. Dominique Tierny

Président du jury
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Membre invité
Membre invité
Membre invité

Université du droit et de la santé de Lille
Faculté de Médecine Henri Warembourg

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

En Cancérologie

Spécialité Pharmacologie expérimentale et onco-immunologie

**Pertinence et validations préclinique et clinique
du modèle spontané canin de mélanome dans le
développement thérapeutique en oncologie**

Convention CIFRE n° 2013/1203

Présentée et soutenue publiquement par

Zacharie Segaoula

Le 7 Avril 2017

Membres du Jury

Pr. Bruno Quesnel
Dr. Sylvie Zouitina-Galiegue
Dr. Florence Bernex
Dr. Stéphane Depil
Dr. Jérôme Gay-Quéheillard
Pr. Dominique Helley-Russick
Pr. Benoit Deprez
Dr. Aline Primot
Dr. Xavier Thuru
Dr. Dominique Tierny

Président du jury
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Membre invité
Membre invité
Membre invité

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Pr **Bruno Quesnel** et le centre de recherches Jean-Pierre Aubert (UMRS-1172) pour m'avoir permis d'effectuer mes travaux de recherche et d'avancer dans mon projet au sein de son équipe.

Un grand merci au **Dr. Sylvie Zouitina** pour la relecture de ce manuscrit et les conseils pertinents ainsi qu'au **Dr. Xavier Thuru**, pour son encadrement, son écoute, ses conseils mais surtout pour son soutien infailible au cours de ces trois années, qui n'ont pas été de tout repos.

Merci à Oncovet Clinical Research (**OCR**) ainsi qu'à l'association nationale de la recherche et de la technologie (**ANRT**) pour l'apport financier, sans lequel ce travail n'aurait pu aboutir.

Merci aux membres du jury de m'avoir fait l'honneur de participer à l'évaluation de ce travail de recherche.


Je tiens à remercier chaleureusement l'Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille pour l'appui financier et logistique ainsi que tous les membres de l'équipe U1172 et mes collègues d'OCR pour leurs amitiés et leur soutien moral tout au long de cette thèse.

Je ne remercierai jamais assez Elisabeth **Bertrand** et **Romain Magnez** pour leurs amitiés et leur présence constante aux bons comme aux mauvais moments que j'ai pu traverser durant ces trois années. Merci pour les « *Gorilla Monday's* », les « *Tuesday Burrito's* », les « *Wednesday Bibo's* » et les « *Friday Capsule's* »... parce qu'il faut bien se reposer un jour dans la semaine quand même !

Merci au LRP crew, à **Jolanta**, à **Soraya** et à **Marga** de me supporter quand ça ne va pas !

Merci à la **SNCF**, de m'avoir transporté tous les jours entre Paris et Lille, et surtout à tous les points que j'ai pu cumuler dans mon *compteur ponctualité* et qui m'ont permis de voyager un certain nombre de fois « *presque* » gratuitement !

Enfin, un grand merci à **mes parents**, à **mon frère** et à **ma sœur** qui ont supporté la distance des débuts, mes sauts d'humeurs fréquents et mon emploi du temps de ministre. Merci pour tous les sacrifices que vous avez pu faire, votre confiance, votre soutien en toute circonstance et l'énergie que vous m'apportez, qui me permet d'avancer un peu plus chaque jour !



A **Annaba**, qui m'a vu pousser !

A **Rennes**, qui m'a appris plein de choses !

A **Paris**, qui m'a endurci !

A **Paris**, qui m'a donné des ailes !

A **Paris**, qui m'a vu m'envoler !

Sometimes, flying feels too godlike to be attained by man.

Sometimes, the world from above seems too beautiful,

too wonderful,

too distant for human eyes to see ...

— **Charles A. Lindbergh, The Spirit of St. Louis, 1953**

Résumé

En recherche et développement pharmaceutiques un candidat thérapeutique doit passer plusieurs barrières précliniques afin de déterminer certains paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques avant toute administration à l'homme. Malgré les efforts investis en R&D ces dernières années, l'industrie du médicament a souffert d'un ralentissement dans le développement de nouvelles molécules innovantes. Car avant sa mise sur le marché, tout candidat doit justifier de sa balance bénéfique/risque. Les modèles standards utilisés en développement en oncologie ne sont pas assez prédictifs et bien souvent non-adaptés, avec une niche tumorale inexistante. C'est pourquoi il est aujourd'hui essentiel de travailler sur des systèmes plus sensibles et mimant plus fidèlement la pathologie humaine afin d'obtenir des médicaments plus efficaces et moins toxiques pour une meilleure prise en charge.

L'utilisation du modèle spontané de cancers comme approche prédictive en oncologie comparée a été rapportée par plusieurs équipes à travers le monde. En effet, les fortes similitudes au niveau histologique, moléculaire et clinique rapportées entre les tumeurs humaines et canines, font de ce modèle un allié essentiel pour l'optimisation du développement pharmaceutique chez l'homme ayant un bénéfice réciproque à la fois à la médecine humaine et vétérinaire.

Chez l'homme, les mélanomes constituent l'une des formes les plus agressives des cancers cutanés. Ils représentent 4 à 11% des néoplasies cutanées et seulement 2% des cancers de l'épiderme. Ce sont des tumeurs très immunogènes et de très mauvais pronostic au stade métastatique contribuant au développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale bien souvent responsable d'échappements et de résistances au traitement. Et malgré l'amélioration de 50 à 80% de la survie globale à 5 ans ces vingt dernières années, son incidence ne cesse d'augmenter et environ 7000 cas sont rapportés chaque année en France avec plus de 75% de décès liés à ces tumeurs.

Bien que rares, ces tumeurs représentent 7% des cancers diagnostiqués chez le chien et environ 160000 cas sont recensés chaque année au niveau mondial. Sa localisation est buccale dans plus de 50% des cas. C'est aussi l'un des cancers les plus agressifs chez le chien, avec une survie globale post-opératoire de 173 jours associé à des métastases ganglionnaires et pulmonaires le plus souvent.

Le but de ce travail a été la validation préclinique et clinique du modèle tumoral spontané canin dans la compréhension des mécanismes de cancérogenèse, de dormance tumorale et de développement thérapeutique. Validation préclinique, dans un premier temps via le développement et la caractérisation de modèles cellulaires et murins de mélanomes canins. Puis, dans un second temps, la validation clinique par le biais d'essais thérapeutiques chez le chien.

A partir de prélèvements issus de deux profils cliniques distincts, deux lignées cellulaires de mélanome canin ont été développées et caractérisées sur le plan pharmacologique, génomique et fonctionnel. Une liste d'altérations génétiques a été établie sur ces deux profils en accord avec la littérature et présentant des points communs avec la pathologie humaine. De plus, il est bien établi que l'hétérogénéité tumorale est responsable de résistances aux traitements conduisant aux rechutes, c'est pourquoi nous sommes par la suite intéressés à l'étude des populations souches tumorales au sein de notre modèle et à l'identification de marqueur permettant le ciblage de ces cellules pouvant contribuer ainsi à l'avancement de l'enrichissement de l'arsenal thérapeutique oncologique.

En conclusion, le patient chien est doté d'un système immunitaire intact et d'une niche tumorale complète, constituant ainsi un système *in-vivo* très intéressant pour l'homme, pouvant contribuer à avancer la recherche et améliorer grandement nos connaissances sur cette pathologie.

Abstract

Pharmaceutical development is a long and fastidious process. In fact, each drug candidate has to meet with a certain safety criteria list, pharmacokinetic and pharmacodynamics profiles need to be determined prior to first use in humans and market approval.

For years, the pharmaceutical industry has been suffering from a lack of innovative molecules and thus despite the efforts and cost increases in R&D programs. And most novel drug candidates entering clinical trials fail to reach approval, largely because preclinical models used in development do not provide adequate information about their efficacy or toxicity. That's why; more predictive models of efficiency in oncology, shaping more precisely the human pathology are needed.

The study of novel drug candidates in dogs with naturally occurring tumors allows drug assessment in neoplasms sharing many fundamental features with its human counterparts, and thus provides an opportunity to answer questions guiding the cancer drug development path in ways not possible in more conventional models. Moreover, the strong homologies in clinical presentation, morphology, and overall biology between dogs and their human counterparts make companion animals a good model to investigate tumor process from aetiology to tailored treatments.

The aim of this project was to validate the canine spontaneous tumor model, by combining preclinical and clinical approaches, in the comprehension of the underlying mechanisms of cancer from carcinogenesis to drug resistance and tumor dormancy and also the discovery of new tools essential for the prediction, diagnosis, clinical follow-up and treatment.

Metastatic melanoma is one of the most aggressive forms of cutaneous tumors in humans. It constitutes 4 to 11% of skin malignancies and only 2% of the cancers of the epidermis. These highly immunogenic tumors hold a severe prognosis when metastasized and contribute to an immune anti-tumor reaction which could potentially lead to immune escape and resistance to most standard treatment protocols. And even if the 5-year survival has been improved to 50 – 80% over the past decades, its incidence is still in the rise with 7000 cases and 75% related deaths reported every year in France.

In dogs, melanomas are one of the most frequently diagnosed malignancies of the oral cavity. These cancers account for 7% of all malignant tumors in dogs and 160000 reported every year worldwide. It also constitutes one of the most aggressive metastasizing tumors with a median post-surgery survival rate of 173 days.

We developed and characterized immunocytochemically, pharmacologically and genomically two canine melanoma cell lines from naturally occurring dog tumors with distinct clinical profiles. A list of genetic alterations of these two profiles has also been established and is in accordance with the published literature, presenting same features as human tumors. And because tumor heterogeneity is responsible of resistance to treatment and relapse, we isolated and investigated cancer stem cell populations in our cell line models in order to identify the linked biomarkers which may constitute future potential targets for the expansion of the oncological therapeutic panel.

In conclusion, due to its intact immune system, tumor niche and also because it shares the same environment as we do, the canine patient represent a promising opportunity in the advancement of cancer research, the acceleration of translation process and the setting up of more effective and less toxic molecules with dual benefits for the human and veterinary medicine toward better patient care.

Table des Matières

Remerciements	3
Résumé	5
Abstract.....	6
Table des Matières	7
Glossaire.....	11
Liste des tableaux et figures.....	16
INTRODUCTION	20
A. Généralités sur le cancer	21
1. Données épidémiologiques	21
2. Le processus de cancérisation	22
3. L'angiogenèse tumorale	23
4. Thérapeutiques du cancer	24
a) La chirurgie	24
b) La radiothérapie.....	25
c) La chimiothérapie	26
d) A la découverte des thérapies ciblées	28
e) Approches thérapeutiques innovantes.....	29
i. L'immunothérapie	29
ii. Approches immunothérapeutiques de deuxième génération : l'axe PD-1 / PD-L1	33
iii. Ciblage des cellules souches cancéreuses : les racines du mal	36
B. Les principaux modèles utilisés dans le développement pharmaceutique en oncologie	37
1. Modèles de cancérogénèse chimique	37
2. Modèles transgéniques (GEM: <i>Genetically Engineered Mouse</i>)	38
3. Modèles de xénogreffe	39
4. L'utilisation du poisson zèbre	40
C. Les nouvelles approches dans le développement pharmaceutique en oncologie	42
1. Les nouveaux concepts émergents du développement pharmaceutique	42
a) Le concept « d'avatars » et d'essais « co-cliniques »	43
i. Les avatars de tumeurs	43
ii. Les essais co-cliniques.....	44
b) Intérêts de la médecine comparative : le modèle canin	45
i. Intérêt dans la compréhension des mécanismes biologiques.....	46

ii.	Intérêt dans la compréhension de l'évolution clinique de la maladie	47
iii.	Intérêt dans l'évaluation de nouvelles entités chimiques	48
2.	Apports de la médecine translationnelle	49
D.	Importance du modèle canin en recherche préclinique	51
1.	Le lymphome	52
2.	L'ostéosarcome	53
3.	Les cancers cutanés	54
a)	La peau : rappels anatomo-physiopathologiques	54
b)	Mécanismes de régulation de la mélanogenèse	58
c)	Classification des cancers de la peau	60
d)	Moyens préventifs et traitements du mélanome	70
E.	Validation clinique du modèle canin	73
1.	Cadre éthique et réglementaire	73
2.	Méthodes alternatives	74
3.	Mise en place d'essais cliniques	75
4.	Challenges associés	76
F.	But de la thèse	77
	MATERIEL ET METHODES	79
A.	Modèles d'étude	80
1.	Modèles cellulaires	80
a.	Lignées cellulaires de mélanome	80
b.	Lignée cellulaire NK92	81
2.	Modèles animaux	81
B.	Méthodes d'étude et d'analyse	83
1.	Culture cellulaire	83
a.	Culture des lignées de mélanome	83
b.	Culture des lignées NK92	83
c.	Expansion et purification de lymphocytes T cytotoxiques	83
2.	Mesure de la croissance cellulaire	85
3.	Analyse du cycle cellulaire	85
4.	Etude de la viabilité, de la prolifération cellulaire et de la cytotoxicité	86
a.	Test Annexine V / IP	86
b.	Test MTS	87
c.	Etude de la mort cellulaire	88
d.	Etude de la migration cellulaire par la technique de blessure ou « wound healing »	89
e.	Mesure ex-vivo de la protéine γ H2AX par cytométrie	90

5. Analyses microscopiques	90
a. Analyse Cytologique	90
b. Par Immunohistochimie (IHC)	90
c. Par immunofluorescence (IF)	91
6. Analyse protéique	92
a. Dosage et extraction	92
b. Migration.....	92
7. Caractérisation d'une population de cellules souches cancéreuses	94
a. Formation de sphéroïdes.....	94
b. Test de rétention du marqueur DiI.....	94
c. Test d'exclusion à la Rhodamine 123	94
8. Caractérisation génomique	95
a. Extraction d'ADN	95
b. Analyse CGH	95
9. Analyses statistiques	96
RESULTATS	97
I. Validation Préclinique	98
Partie A : Mise en place du modèle	99
Partie B : Caractérisation des deux modèles cellulaires canins	103
1. Caractérisation histologique	103
2. Caractérisation génomique	108
3. Caractérisation pharmacologique	113
4. Caractérisations fonctionnelles	118
a. Identification des cellules souches cancéreuses (CSC) dans les lignées cMeX et cDuX	118
<i>i.</i> Tests d'exclusion à la Rh 123	119
<i>ii.</i> Formation de sphéroïdes	120
<i>iii.</i> Etude du cycle cellulaire.....	122
b. Echappement immunitaire et étude de l'interaction PD-1/ PD-L1 dans nos lignées modèles de mélanome canin.....	123
Discussion et perspectives	131
II. Validation clinique	141
Evaluation préalable d'un composé anti-mitotique dans les modèles de mélanomes canin établis	141
1. Effets du composé 16a sur la morphologie cellulaire des lignées modèles de mélanome canin	142
2. Analyse du cycle cellulaire	142

3. Etude de la prolifération des modèles cellulaires de mélanome canin traités par ces deux composés	144
Discussion et perspectives	147
Conclusion générale	150
Références	153
Annexes	182
Annexe A	183
Annexe B	184
Annexe C	185
Annexe D	186
Annexe E	187

Glossaire

	α -MSH	Melanocyte Stimulating Hormone
	μ g	microgramme
	μ l	microlitre
	μ m	micromètre
	μ M	micromolaire
	5-FU	5-Fluorouracile
A	ABCB	ATP Binding Cassette Subfamily B Member
	ADM2	Aberation Detection Method 2
	ADN	Acide désoxyribonucléique
	ALDH1	Aldehyde dehydrogenase 1
	ALM	mélanome acrolentigineux
	AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
	AMS	atypical mole syndrome, ou syndrome du nævus atypique
	Ang-2	angiopoïétine 2
	ANOVA	analysis of variance
	ARN	acide ribonucléique
	ATCC	American Type Culture Collection
	av. J-C	avant Jésus-Christ
B	BaP	Benzo(a)pyrène
	BAC	Bacterial Artificial Chromosome
	BCA	bicinchoninic acid assay
	BCG	Bacillus Calmette–Guérin
	bFGF	basic fibroblast growth factor
	BSA	bovine serum albumine
C	CARD	Caspase activation and recruitment domain
	CBC	carcinome basocellulaire
	CD	cluster of differentiation
	CDK	cyclin-dependent kinase
	CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
	CGH	Comparative Genome Hybridization
	CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
	CNV	Copy Number Variation
	CO ₂	dioxyde de carbone
	COTC	Comparative Oncology Trial Consortium
	CPA	Cellules Présentatrices d'Antigène
	CSC	cancer stem cell
	CSPC	carcinome spinocellulaire
	CTL	Lymphocytes T cytotoxiques
	CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

D	CTV	Carcinomes transitionnels de la Vessie	
	DED	Death Effector Domain	
	DHI	5,6 dihydroxy-indole	
	DHIC	5,6 dihydroxy-indole 2-carboxylic acid	
	DITC	dacarbazine	
	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	
	DMSO	Dimethyl sulfoxide	
	DOM	département d'outre mer	
	DOPA	3,4 di-hydroxy-phénylalanine	
	E	E	Acide glutamique
EDTA		Ethylenediaminetetraacetic acid	
EGF		Epidermal Growth Factor	
EGFR		epidermal growth factor receptor	
ENU		N-éthyl-N-nitrosourée	
ERK		Extracellular signal-Regulated Kinase	
E/T		Effector to Target ratio	
F		FDA	Food and Drug Administration
		FGF	Fibroblast Growth Factor
		FITC	fluorescein isothiocyanate
G	GEO	Gene Expression Omnibus	
	GIST	Gastro Intestinal Stromal Tumor	
	GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	
	Gy	Gray, $1 \text{ m}^2 \cdot \text{sec}^{-2}$	
H	H&E	Hematoxylin-Eosin	
	HAP	hydrocarbures aromatiques polycycliques	
	HCl	chlorure d'hydrogène	
	HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique	
	HMB45	human melanoma black 45	
	HPV	human papilloma virus	
	HRP	horseradish peroxidase	
	HSC70	Heat Shock Cognate 70kDa	
	HSPG	héparan-sulfates-protéoglycans	
	I	ICC	Immunocytochimie
IDO		Indoleamine 2,3-dioxygénase	
IF		Immunofluorescence	
IFN		interferon	
IHC		Immunohistochimie	
IL		interleukine	
INCA		Institut national du cancer	
IP		iodure de propidium	
IPA		Ingenuity Pathway Analysis	
IRCL		Institut Pour la Recherche sur le Cancer de Lille	
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitor Motif		

	ITSM	Immunoreceptor Tyrosine Switch Motif
K	kDa	kilo Dalton
	KIR	Killer-cell immunoglobulin-like receptor
L	LAM	Leucémie Aiguë Myéloïde
	LDH	lactate deshydrogénase
	LDS	Lithium Dodecyl Sulfate
	LMM	mélanome lentigo malin
M	M	molaire
	MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
	Mb	Mégabase
	MDSC	Myeloid Derived Suppressor Cell
	MEC	matrice extracellulaire
	MEK	Mitogen-activated protein/Extracellular signal-regulated Kinase
	MEM	Minimum Essential Media
	mg	milligramme
	MgCl ₂	chlorure de magnésium
	MGG	May-Grünwald Giemsa
	ml	millilitre
	mm	millimètre
	mM	millimolaire
	MMP	matrix metalloproteinase
	MTIC	temozolomide
		[3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfohenyl)]
	MTS	2H-tetrazolium
	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
N	NEC	Nouvelles Entités Chimiques
	NH	Nombre de cellules récupérées
	NI	Nombre de cellulesensemencées
	NK	Natural Killer
	NKG2D	Natural Killer Group 2D
	NM	mélanome nodulaire
	nm	nanomètre
	NSCLC	Non-small cell lung cancer
O	oaCGH	oligonucleotide array Comparative Genome Hybridization
	OMS	organisation mondiale de la santé
P	P24	Plaque 24 puits
	PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
	Pb	Paire de bases
	PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
	PBS	Phosphate-buffered saline
	PD	programmed death 1
	PDCD1	programmed cell death 1
	PD-L	programmed death ligand

	p-gp	p-glycoprotéine
	PK/PD	Profile Pharmacocinétique/ Pharmacodynamique
	PLSD	protected least significant difference
	PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
	PNPLA	Patatin Like Phospholipase Domain Containing
	PO	per os
	PTEN	Phosphatase and tensin homolog
	PTS	Polyamine Transfert System
R	R&D	Recherche et Développement
	RefSeq	Reference Sequence
	Rh123	Rhodamine 123
	RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
	RNA	ribonucleic acid
	RNA-seq	RNA sequencing
	rpm	rotation par minute
	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
	RSA	Relation Structure-Activité
S	SAM	Stress Associated Molecules
	SCID	Severe combined immunodeficiency
	SDS	sodium dodecyl sulfate
	SFU	sphere forming unit
	SHO®	SCID Hairless Outbred®
	SHP	Src homology region 2 domain-containing phosphatase
	SOPF	Specific Opportunistic and Pathogen Free
	SSM	mélanome malin extensif superficiel
	SVF	serum de veau fœtal
T	TAA	Tumor Associated Antigen
	TAM	tumor associated macrophages
	TBST	tris-buffered saline-tween
	TCR	T-cell Receptor
	TEM	Tie-2 expressing macrophages
	TGFβ	Transforming Growth Factor bêta
	Tie-2	Angiopoietin-1 receptor
	TIL	Tumor Infiltrating Lymphocytes
	TNF	tumor necrosis factor
	TNM	tumore, node, metastasis
	TRAIL	Tumor-Necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand
	Treg	Lymphocytes T régulateurs
	TRP	Tyrosine Related Peptide
	TSM	Taux standardisé à la population mondiale
	UI	unité internationale
U	UV	ultraviolet
V	V	Valine

v/v	volume/volume
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF receptor

Liste des tableaux et figures

Liste des Figures

Figure 1 : Principales étapes de la carcinogenèse. Durant ces étapes la plupart des cellules cancéreuses développent l'ensemble des caractéristiques leurs permettant d'induire l'initiation, la croissance, la prolifération, ainsi que l'angiogenèse et la dissémination tumorales (<i>Hanahan & Weinberg, 2011</i>).	22
Figure 2 : Les débuts de la chirurgie oncologique :	25
Figure 3 : Coopération spatiale et temporelle entre chimio- et radiothérapie.	27
Figure 4 : Ciblage des récepteurs à activité tyrosine kinase dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules (NSCLC).	29
Figure 5 : Vue d'ensemble du microenvironnement immunitaire dans la réponse anti-tumorale (adapté de <i>Chen & Mellman, 2013</i>)	31
Figure 6 : Principales stratégies mises en place pour la restauration de la réponse immunitaire anti-tumorale.	32
Figure 7 : Principales stratégies thérapeutiques dans le ciblage de l'immunoéchappement (adapté de <i>GennetechTM</i>).....	36
Figure 8 : Avantages et inconvénients des principaux modèles animaux utilisés dans le développement préclinique pharmaceutique.	41
Figure 9 : Concepts émergents dans le développement et la prise en charge thérapeutique en cancérologie.....	45
Figure 10 : structure et modélisation du composé ABT-751.....	49
Figure 11 : Exemple de monitoring précoce des phases d'évolution et de réponse au traitement dans le cancer du sein (adapté de <i>Sundaresan & Harber, 2015</i>).	50
Figure 12 : Organisation histologique de la peau (<i>Van De Graaff et al, 1998</i>).	57
Figure 13 : Voies de biosynthèse de la mélanine.....	59
Figure 14 : Stades d'évolution d'un grain de beauté.....	63
Figure 15 : Différentes étapes de la mélanomagenèse	66
Figure 16 : Illustration des différentes formes de mélanomes	67
Figure 17 : Coupe verticale d'une section de la peau illustrant les outils diagnostics et pronostiques dans la classification du mélanome malin	67
Figure 18 : Observations macroscopiques des masses buccales de mélanome canin (A) ainsi que des métastases cérébrales (B) et pulmonaires (C) (d'après <i>Liptak et al, 2012</i>).	70
Figure 19 : Voies de signalisations et cibles thérapeutiques impliquées dans le mélanome (<i>Weeraratna, 2012</i>)..	71
Figure 20: Etapes majeures de l'évolution du paysage réglementaire de la recherche préclinique.....	74
Figure 21 : Approche intégrée du modèle vétérinaire de maladie spontanée dans le développement thérapeutique standard.....	75
Figure 22: Structures chimiques des composés 16a (a) et 16c (b).....	78
Figure 23 : Bilan radiographique et tomодensitométrie montrant un nodule gingival à la commissure labiale gauche (flèche rouge) (A) et une radiographie latérale indiquant la présence de lésions métastatiques au niveau du thorax (B) ainsi que leurs évolution trois (C) et six mois (D) après le diagnostic.	81
Figure 24 : Les différentes étapes de la mort cellulaire	86
Figure 25 : Structure et biotransformation du MTS.....	87

Figure 26 : Représentation schématique et fonctions des protéines caspases. La structure de base est composée de deux sous-unités et un domaine N-terminal.	89
Figure 27 : Evolution in-situ de la croissance tumorale 45 (A), 65 (B) et 110 (C) jours post-injection.	99
Figure 28 : Courbes de croissance tumorales des lignées de mélanome canin <i>cMeX</i> et <i>cDuX</i>	100
Figure 29 : Caractérisation macroscopique des tumeurs greffées et mise en évidence de lésions métastatiques	101
Figure 30 : Marquage par immunohistochimie (IHC) H&E et anti-Melan-A des coupes tumorales de xélogreffe des lignées <i>cMeX</i> (A et C) et <i>cDuX</i> (B et D)	104
Figure 31 : Coloration MGG et marquage anti-MelanA par ICC des lignées cellulaires établies.....	105
Figure 32 : Marquage anti-melanA par IF des lignées cellulaires <i>cMeX</i> (A & C) et <i>cDuX</i> (B & D) établies.....	105
Figure 33 : Marquage IHC de la protéine S100 dans les lignées établies <i>cMeX</i> (A & C) et <i>cDuX</i> (B & D).	106
Figure 34 : Marquage anti-melanA par IF des lignées cellulaires <i>cMeX</i> (A & C) et <i>cDuX</i> (B & D) établies. Observation au microscope à fluorescence Leica DMRB et à l'objectif x20.	107
Figure 35: Chromosome plot des lignées <i>cDuX</i> (A, C, E) et <i>cMeX</i> (B, D, F) montrant les altérations au niveau des chromosomes 11, 26 et 30 (sur 39 paires de chromosomes).	109
Figure 36: <i>Clustering</i> génétique représentant la classification hiérarchique des échantillons issus de Tania et Dolly et la matrice des distances entre chaque échantillon.....	111
Figure 37 : Courbes doses-réponse du DTIC. Les cellules ont été incubées 72h en présence de la molécule. ...	114
Figure 38 : Courbes doses-réponse 72h après traitement au Vémurafenib.	115
Figure 39 : Activation de la voie BRAF (A) et PI3K/Akt (B) dans les modèles cellulaires établis de mélanome. ..	117
Figure 40 : Test d'exclusion de la rhodamine 123 (Rh 123). Les cellules ont été incubées en présence de Rh123 pendant 20 minutes (A, C) suivies d'une phase d'exclusion de 60 minutes (B, E).	120
Figure 41 : Formation de sphéroïdes pour les lignées <i>cMeX</i> (A, C) et <i>cDUX</i> (B, D),	121
Figure 42 : Niveaux d'expression de la protéine PD-L1 par IHC sur une cohorte de 53 blocs de paraffine de mélanome canin.	125
Figure 43 : Etudes de l'infiltrat lymphocytaire par IHC sur une cohorte de 53 blocs de paraffine de mélanome canin. Co-marquages des lymphocytes CD8+ / FoxP3+ (A).	126
Figure 43 : Profils d'expression de la protéine PD-L1 par cytométrie de flux dans les lignées <i>cDuX</i> (A) et <i>cMeX</i> (B).	127
Figure 45 : Lyse non-spécifique des cellules de mélanome A375 (A), <i>cDuX</i> (B) et <i>cMeX</i> (C) par les cellules NK..	128
Figure 46 : Identifications des populations cellulaires présentes dans les PBMC canins par cytométrie de flux.	129
Figure 47 : Impact des molécules 16c (A) et 16a (B) sur la morphologie cellulaire de la lignée <i>cMeX</i>	142
Figure 48 : Effets du composé 16a vs. 16c sur le cycle cellulaire.	143
Figure 49 : Modèle de cicatrisation cellulaire en monocouche pour la lignée <i>cDuX</i>	145
Figure 50 : Modèle de cicatrisation cellulaire en monocouche pour la lignée <i>cMeX</i>	146

Liste des tableaux

Tableau 1 : Agents d'immunothérapie utilisés en clinique.....	33
Tableau 2 : Les différents sous-types de mélanome selon l'organisation mondiale de la santé (OMS).	66
Tableau 3 : Classification TNM des mélanomes (D'après <i>Morton et al, 2000</i>).	68
Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour la caractérisation des PBMCs	85
Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour le phénotypage des lignées	91
Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés en Western blot.....	93
Tableau 7 : Caractéristiques cliniques, morphologiques et cellulaires des lignées isolées.	102
Tableau 8: Liste commune de gènes délétés dans les deux lignées cellulaires de mélanomes canin et leur position chromosomique (<i>CFA : Canis lupus Familiaris</i>).....	110
Tableau 9 : Description du nombre d'évènements génomiques (amplification/ délétion) dans chaque échantillon.....	112
Tableau 10 : Valeurs IC50 des lignées de mélanome après 24 et 72h de traitement au Vémurafenib (IC50 ± sem).	115
Tableau 11 : Analyse des différentes phases du cycle cellulaire entre les populations Rh 123 ^{low} et Rh123 ^{high} de la lignée <i>cDuX</i>	122



*Now it's cancer's turn to be the disease that
doesn't knock before it enters.*

*-Susan Sontag, *Illness as Metaphor**

INTRODUCTION

A. Généralités sur le cancer

1. Données épidémiologiques

Bien qu'elles représentent toujours un problème majeur de santé publique, les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui la deuxième cause de mortalité dans le monde après le cancer. En effet, les rapports épidémiologiques récents publiés par les autorités compétentes révèlent que chaque année environ 355 354 personnes développent un cancer et environ 148 000 personnes en meurent. Les prédispositions varient en fonction du type de tumeur, de l'âge, du sexe ainsi que du profil génétique de chaque individu. La survenue des cancers est plus fréquente chez l'homme avec un sexe ratio publié de 1,3 pour l'année 2012. Ainsi, on compte chaque année 200 350 hommes et 155 004 femmes atteints de cancers dont 85 000 hommes et 63 000 femmes qui en succombent. Et même si l'âge médian au diagnostic est de 68 ans chez les hommes et 67 ans chez la femme, 2500 nouveaux cas sont rapportés chaque année chez les moins de 18 ans.

Le taux standardisé à la population mondiale (TSM) est une indication qui correspond à l'incidence d'un évènement estimé et rapporté à la population mondiale (valeur référence). Cette valeur concernant l'incidence des cancers en France pour l'année 2012 a été estimée à 362,2 pour 100 000 hommes et 252 pour 100 000 femmes (*Données épidémiologiques de l'INCA, 2014*).

Le mot cancer tient son origine du grec *καρκινος* (*karkinos*) signifiant crabe ou écrevisse et fut décrit pour la première fois par Hippocrate au IV^{ème} siècle avant J-C. Le nom « *carcinome* » ou « *squirre* » fut attribué pour la première fois à cette pathologie et sera traduit plus tard en latin par le terme cancer en raison de l'aspect de son évolution en forme de pinces de crabe. Il désigne un ensemble de pathologies dont la caractéristique principale est la perte du contrôle du cycle cellulaire aboutissant à une division anarchique et incontrôlée. C'est la pathologie la plus redoutée du XXI^e siècle bien qu'elle soit connue et décrite depuis l'antiquité. En effet, les premiers textes médicaux traitant du cancer remontent à l'Égypte antique, aux alentours de 2500 avant J-C. C'est dans le papyrus d'Ebers, un ensemble volumineux de traités médicaux où on retrouve pour la première fois la description des tumeurs mammaires : « *protubérance*

non-inflammatoire, d'origine incertaine, logée dans la poitrine et ayant tendance à la récurrence, conduisant à une issue fatale » (Scholl, 2002 ; Mukherjee, 2006).

2. Le processus de cancérisation

La cancérogenèse est un processus séquentiel très complexe. En effet, avant de se développer et d'envahir le tissu environnant, la cellule tumorale va subir plusieurs changements au niveau génotypique et phénotypique lui conférant une résistance et un échappement aux mécanismes de contrôle de la machinerie cellulaire (Figure 1).

De ce *continuum* évolutif, quatre étapes principales ont pu être décrites : l'initiation, la promotion, la croissance/ progression tumorale et enfin la dissémination métastatique.

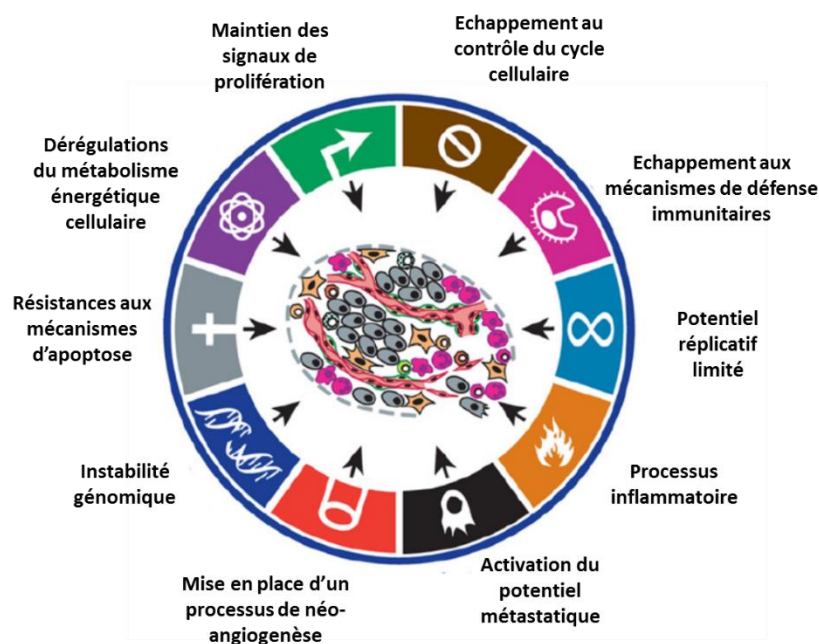


Figure 1: Principales étapes de la carcinogenèse. Durant ces étapes la plupart des cellules cancéreuses développent l'ensemble des caractéristiques leurs permettant d'induire l'initiation, la croissance, la prolifération, ainsi que l'angiogenèse et la dissémination tumorales (Hanahan & Weinberg, 2011).

Ainsi la cellule cancéreuse présente des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles différentes parmi lesquelles on note des anomalies de taille, des atypies nucléaires mais aussi l'immortalité, une perte de l'inhibition de contact, une indépendance totale vis-à-vis des facteurs de croissance, une perte de la nécessité d'ancrage au point de restriction et de contrôle du cycle cellulaire (blocage en G1), et surtout la capacité d'agencement en tissu tumoral malin.

L'initiation : cette première étape ne concerne qu'une seule cellule (dite *initiatrice*, *transformée ou maligne*) et aboutit à la formation d'une lésion précancéreuse. C'est la mutation irréversible d'une cellule somatique suite à l'exposition à un carcinogène chimique comme le benzo(a)pyrène (BaP), les radicaux libres, ou physique comme les rayonnements ionisants par exemple, qui serait à l'origine de la formation d'un adduit à l'ADN conduisant ensuite à des erreurs de réparation lors de la réplication de ce dernier ou induisant des cassures double brin irréversibles. L'exposition chronique et prolongée stabilise et maintient la lésion initiatrice. S'en suit une perturbation de la croissance cellulaire et de l'homéostasie tissulaire. On est dans un état d'hyperprolifération, la cellule envoie des réponses anormales aux stimuli de son microenvironnement (*Vogelstein et al, 2015*).

La promotion : réversible et assimilable à la notion de transformation, c'est un état dysplasique correspondant à un envahissement tissulaire local aussi connu sous le terme de *carcinome in-situ* (stade pré-invasif) (*Vogelstein et al, 2015*).

La croissance/ progression : c'est l'acquisition des propriétés de prolifération non contrôlée. Lors de cette phase, on observe une sélection permanente des clones les plus malins, capables de métastases. La population cellulaire ainsi constituée développe un certain nombre de caractéristiques telles que l'indépendance aux facteurs de croissance, l'immortalité, la perte de la différenciation, l'anomalie de la morphogenèse, la désorganisation et enfin l'invasion tissulaire. Ce stade est défini par le terme « *carcinome invasif* » et correspond au franchissement des barrières séparant les tissus. C'est l'étape finale, où l'angiogenèse va prendre le relais et permettre la prolifération et la dissémination à distance par la mise en place d'un réseau vasculaire (*Vogelstein et al, 2015*).

3. L'angiogenèse tumorale

L'une des principales causes de décès par cancer est la capacité de ce dernier à évoluer vers un processus métastatique, ce qui lui confère un pouvoir de résistance et d'échappement aux thérapies conventionnelles (*Fidler et al, 2004*). L'acquisition de ce pouvoir pro-métastatique passe par l'angiogenèse. En effet, selon un postulat émis par *Judah Folkman* en 1971 (*Folkman, 1971*) la croissance tumorale et son pouvoir invasif est fortement angiogenèse-dépendant.

L'angiogenèse, par définition, consiste en la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau sanguins préexistants (*Carmeliet, 2000*). Les cellules endothéliales matures des vaisseaux prolifèrent, en réponse à des stimuli pro-angiogènes (*vascular endothelial growth factor* : VEGF, *basic fibroblast growth factor* : bFGF et angiopoïétine-2 : Ang-2). C'est un processus complexe faisant intervenir plusieurs facteurs. Le bourgeonnement est stimulé par les interactions du VEGF avec son récepteur (VEGFR), la formation du couple Ang-2/Tie-2 et l'association des intégrines avec les protéines de la matrice extracellulaire (MEC). Les précurseurs circulants endothéliaux de la moelle osseuse migrent au site de la tumeur en réponse au VEGF et se différencient en cellules endothéliales. Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en leucocytes proangiogènes incluant les TAM (*tumor associated macrophages*) et les TEM (*Tie2-expressing macrophages*). Ces derniers infiltrent la tumeur et sécrètent les facteurs angiogènes et les protéinases de la matrice (*MMP* : *matrix metalloproteinases*) responsables du remodelage de la MEC ainsi que de la libération des facteurs de croissance liés aux constituants de cette matrice, notamment les héparan-sulfate-protéoglycans (HSPG) (*Carmeliet et al, 2011*).

4. Thérapeutiques du cancer

a) La chirurgie

Elle constitue l'un des traitements les plus anciens connu à ce jour. La chirurgie constituait pendant plusieurs siècles et reste aujourd'hui l'alternative la plus favorable pour le traitement des formes localisées de la maladie. Ce n'est qu'au XIX^e siècle que cette discipline a connu d'énormes progrès et succès majeurs, comme l'illustre parfaitement l'exemple du carcinome mammaire (Figure 2). En effet, au début du siècle dernier le traitement consistait en l'ablation de la glande mammaire et d'une partie du muscle grand pectoral. Cette procédure est plus communément connue sous le terme de « *mastectomie radicale* », même si elle augmente considérablement les taux de survie, elle est peu esthétique et difficilement acceptée par les patientes à l'époque qui repartaient avec une énorme cicatrice au niveau de la cage thoracique (Figure 2).

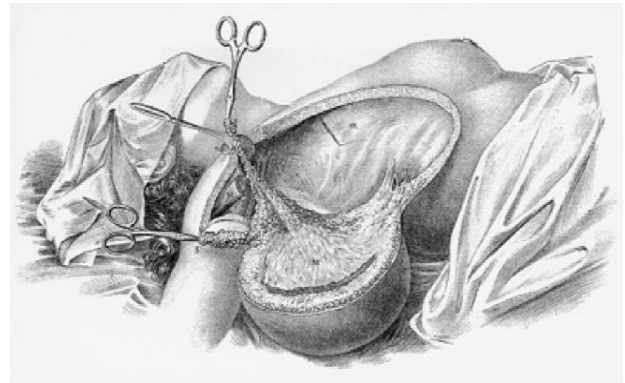


Figure 2 : Les débuts de la chirurgie oncologique : les premières procédures remontent à l'époque médiévale. Ces illustrations sont tirées d'un ouvrage posthume sur les travaux de Jean Scultet (1595 – 1645). Ce chirurgien Allemand, décrit ici l'exérèse d'une masse tumorale envahissant le tissu mammaire à l'aide d'acide et de bandage spécifique (Première description de la mastectomie, *Armentarium Chirurgicum*) ([Mukherjee, 2006](#)).

L'arrivée des techniques de robotisation, d'imagerie et de chirurgie réparatrice a amélioré la prise en charge en chirurgie oncologique, permettant au maximum le maintien de l'intégrité de l'organe, de ses fonctions biologiques et la réduction de l'impact psychologique sur le patient.

b) La radiothérapie

Les origines des traitements par rayons X remontent au début du XX^e siècle. C'est *Emile Grubbe*, un hématologue américain qui fut le premier à utiliser l'administration de rayonnements à des fins thérapeutiques et qui en succomba des suites de sa toxicité importante en 1960. Cette technique consiste en la délivrance de doses importantes de rayonnements au niveau de la cellule tumorale tout en limitant au maximum la toxicité au niveau du tissu sain environnant. La sélectivité est donc la clé de son efficacité qui est améliorée par des schémas thérapeutiques fractionnés, rendant le rayonnement ionisant plus puissant.

Souvent utilisée en traitement adjuvant à la chirurgie, ou en complément à la chimiothérapie, son principe repose sur la capacité limitée de réparation de l'ADN des cellules tumorales. Ainsi, l'ensemble des radicaux libres formés et d'espèces activées de l'oxygène générés pendant l'irradiation entrent en interaction avec les biomolécules (ADN, protéines, macromolécules...etc.) et entraînent la production d'un grand nombre de lésions cellulaires entraînant par la suite la mort de celles-ci (*Schaue & McBride, 2015*).

c) La chimiothérapie

Le terme de chimiothérapie fut utilisé pour la première fois en 1909 suite à la découverte par Paul Ehrlich de l'*arsphénamine*, dérivé arsenical commercialisé sous le nom de Salvarsan® et utilisé dans le traitement de la Syphilis. Ce n'est qu'en 1946, à l'issue de la seconde guerre mondiale, que l'utilisation des dérivés de moutardes à l'azote comme thérapeutique du cancer fut proposée par Louis Goodman et Alfred Gilman (*Morrison et al, 2010*).

En cancérologie, la chimiothérapie, contrairement à la chirurgie, permet non seulement la préservation fonctionnelle et esthétique des tissus néoplasiques mais peut également être utilisée comme thérapie néo-adjuvante à l'irradiation, pouvant induire une radiosensibilisation de la tumeur et optimisant ainsi l'action locale de celle-ci. En traitement adjuvant, elle permettrait de compléter son action locale par le biais d'éradication de micrométastases potentielles (Figure 3).

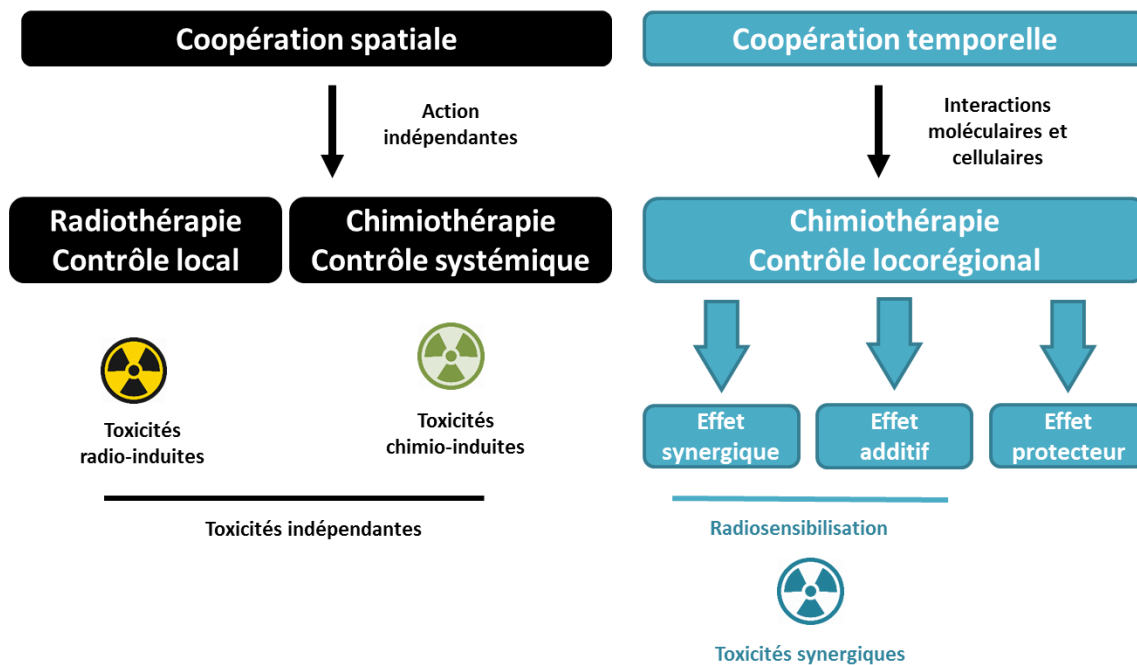


Figure 3 : Coopération spatiale et temporelle entre chimio- et radiothérapie.

Elle peut également être utilisée en traitement adjuvant à la chirurgie afin de limiter le risque de récurrences et en augmentant parfois la survie globale.

Plusieurs classes thérapeutiques ont été décrites. Elles sont groupées en fonctions de leur mécanisme d'action :

- Les agents intercalant de l'ADN : famille des anthracyclines (Doxorubicine, Daunorubicine)
- Les inhibiteurs des enzymes de réparation de l'ADN : Camptotecin, Irinotecan, Topotecan
- Les agents alkylants : moutarde à l'azote et dérivés, cyclophosphamide
- Les analogues métaboliques : 5-Fluorouracile (5-FU)
- Les terminateurs de chaîne : cytarabine, gemcitabine
- Les inhibiteurs du cycle cellulaire : paclitaxel, podophylotoxines et dérivés

Enfin, une des caractéristiques principales mises en évidence dans certains cancers et ayant permis le développement de thérapeutique adaptée est l'hormonodépendance de certaines formes. En effet, le cancer du sein ainsi que les carcinomes prostatiques sont dits hormono-dépendants. C'est donc une stimulation hormonale qui serait à l'origine de la croissance et la prolifération tumorale. Une des stratégies thérapeutiques visant ainsi à induire la régression

tumorale a été la synthèse d'inhibiteurs pouvant interagir avec les enzymes principales entrant dans la néosynthèse de ces hormones.

d) A la découverte des thérapies ciblées

Avec l'essor de la biologie moléculaire et de la génomique à la fin du siècle dernier, de nouvelles alternatives thérapeutiques ont vu le jour dans le traitement du cancer : les thérapies ciblées. En effet, toutes les tumeurs n'ont pas le même profil clinique de réponse à un traitement donné. On entend par là que chaque type tumoral représente un modèle à part entière dans l'étude du cancer chez l'homme. Cela est dû à des variations au sein même de la tumeur, la surexpression de certains récepteurs par exemple et/ ou un nombre de facteurs intrinsèques (facteurs de croissance, facteurs de transcription, hormones, molécules endogènes... etc.). Cette approche repose donc sur un principe de connaissances approfondies de la cellule tumorale et de sa physiopathologie d'un point de vue moléculaire et fonctionnel. On cherche ici à viser un mécanisme particulier, une voie de signalisation, un ligand ou un récepteur par exemple (Figure 4).

Contrairement à une chimiothérapie classique, les toxicités liées à ces traitements sont peu fréquentes et moins sévères car ces thérapies sont sélectives, plus adaptées et plus efficaces sur la cellule cancéreuse, permettant ainsi de réduire les doses et de limiter le risque de développement de résistances mais sans l'éradiquer pour autant (*Baselga et al, 2006*).

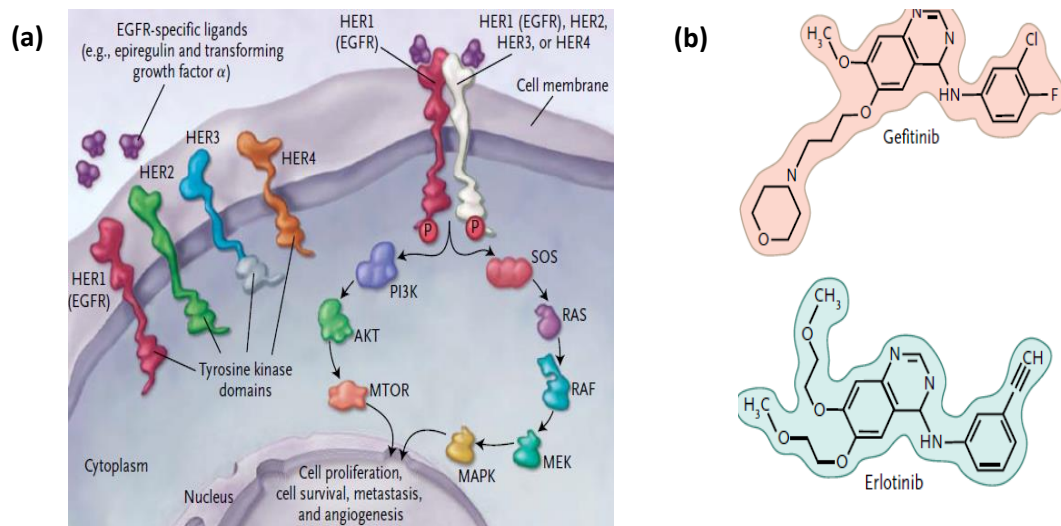


Figure 4 : Ciblage des récepteurs à activité tyrosine kinase dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules (NSCLC). (a) les différentes cibles cellulaires (b) structures chimiques de deux composés inhibant les récepteurs EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Cataldo *et al* 2011).

e) Approches thérapeutiques innovantes

i. L'immunothérapie

Le système immunitaire tient une part importante et constitue l'une des premières réponses mises en place dans les stratégies de défense anti-tumorale (Roitt *et al*, 1994). En effet, l'organisme est soumis à une surveillance permanente lui permettant d'assurer une protection face aux agressions externes chimiques, physiques ou encore virales. L'hypothèse d'immunosurveillance a été définie pour la première fois par Macfarlane Burnet et Lewis Thomas dans leurs travaux à la fin des années 1950 (Dunn *et al*, 2002).

Le système immunitaire assure un monitoring continu et joue donc un rôle important dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Il vise donc au maintien de l'intégrité et de l'homéostasie tissulaire et la conservation d'un équilibre physiologique dans le but de contrôler la croissance et la prolifération tumorale (Roitt *et al*, 1994). C'est pourquoi les sujets âgés sont plus disposés au développement de tumeurs en raison d'un affaiblissement des défenses immunitaires, rendant ces réponses moins efficaces.

Ce système constitue un réseau cellulaire complexe de partenaires en perpétuel remaniement et en interaction permanente. Deux mécanismes ont été identifiés dans la réponse immunitaire anti-tumorale, une réponse innée médiée par les cellules NK (*Natural Killer*) et les lymphocytes T $\gamma\delta$, ne nécessitant pas de sensibilisation préalable, et une réponse spécifique après sensibilisation à l'antigène tumoral (TAA : *tumor associated antigen*) par les lymphocytes

CD8⁺ (CTL : *cytotoxic T lymphocyte*), entraînant par la suite l'élaboration d'une réponse anticancéreuse efficace (*Chen & Mellman, 2013*). Parmi les acteurs majeurs de l'immunité, on cite :

- **Les cellules NK** : les lymphocytes NK sont dépourvus de TCR (*T-cell receptor*) et ont donc une action non spécifique. Ils représentent environ 15% des lymphocytes circulants (*Morrison et al, 2002*) et sont doués d'une activité cytotoxique anti-tumorale modulée par les cytokines. L'INF γ et l'IL-2 principalement vont ainsi stimuler leur prolifération. Contrairement aux lymphocytes B et T, ils sont immédiatement activables. La reconnaissance directe se fait par les récepteurs KIR et NKG2D avec le CMH-I et les molécules associées au stress (*SAM : stress associated molecules*), exprimées à la surface des cellules tumorales. Cette activation entraîne la libération consécutive de perforines et de granzymes, responsables de la lyse des cellules tumorales (Figure 5).
- **Les CTL CD8⁺** : ces cellules interviennent dans la réponse immunitaire anti-tumorale spécifique et achèvent leur maturation grâce au signal B7/CD28. La reconnaissance des cellules tumorales se fait principalement par deux mécanismes. Soit par une activation directe via le complexe CMH-I/TCR conduisant au largage de perforines et de granzymes, entraînant la mort cellulaire par apoptose, soit par l'intermédiaire des récepteurs à domaine de mort (Fas Ligand, TRAIL : *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) appartenant à la famille TNF (*Tumor Necrosis Factor*) et conduisant à une cascade enzymatique et cellulaire, provoquant la fragmentation de l'ADN (*Medzhitov et al, 2001*) (Figure 5).
- **Les cellules auxiliaires CD4⁺ (T-helper)** : Ces effecteurs cytotoxiques sont responsables de la sécrétion de cytokines, notamment TNF α , TNF β et INF γ , stimulant ainsi l'activation des CTL par interaction avec les cellules présentatrices d'antigène (CPA) (*Lichtman, 2004*). Ils interviennent également dans l'augmentation du recrutement des cellules NK et la potentialisation de la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces cellules auxiliaires ont donc un rôle dans l'orientation et la modulation de la réponse immunitaire par l'intermédiaire de médiateurs cytokiniques (Figure 5).

Le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans le développement et la progression tumorale mais aussi dans la résistance et l'échappement au traitement. Le système immunitaire constitue donc un pilier essentiel de la réussite de l'efficacité des traitements contre le cancer. En déterminant ainsi l'efficacité d'une chimio ou d'une radiothérapie par la modulation des réponses immunitaires (*Bissel & Hines, 2011*).

Deux types d'immunothérapies ont ainsi été décrits, une approche non spécifique visant à stimuler d'une manière générale le système immunitaire et une approche spécifique par l'intermédiaire de ligands ou d'anticorps bloquant spécifiquement l'interaction d'un antigène tumoral avec son récepteur (*Galluzzi et al, 2014*).

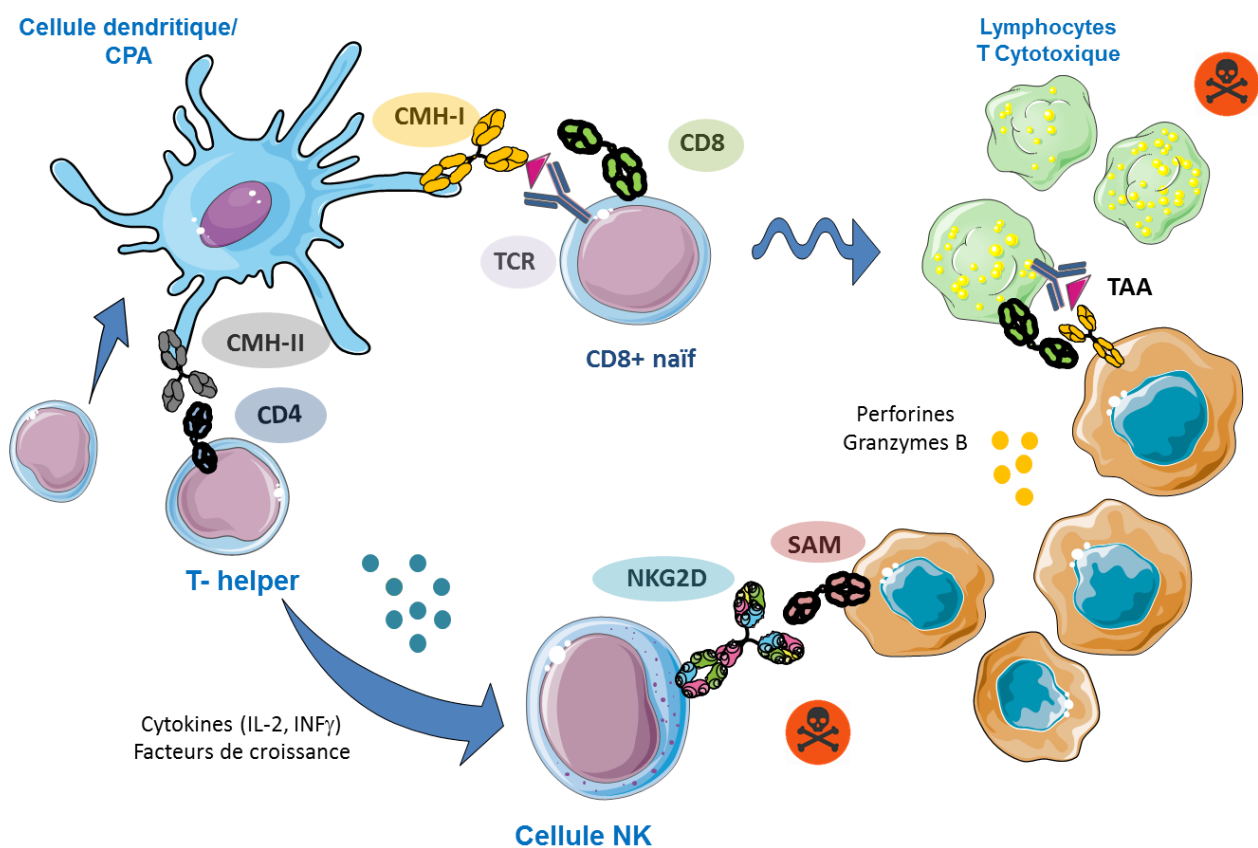


Figure 5 : Vue d'ensemble du microenvironnement immunitaire dans la réponse anti-tumorale (adapté de *Chen & Mellman, 2013*)

Les premières approches, connues depuis les années 1970 consistaient à utiliser des thérapies vaccinales visant à stimuler le système immunitaire de l'hôte, comme l'administration de BCG (*Bacille de Calmette et Guérin*) dans les cancers de la vessie par exemple ou encore l'administration de cytokines, telles que l'interleukine 2 (IL-2) dans le carcinome rénal et

l'interféron alpha ($IFN\alpha$) dans le mélanome. Ces petites molécules secrétées naturellement par les cellules immunocompétentes et impliquées dans les mécanismes de défense immunitaires n'ont montré aucun effet significatif sur l'évolution clinique de la maladie (: Principales stratégies mises en place pour la restauration de la réponse immunitaire anti-tumorale Figure 6).

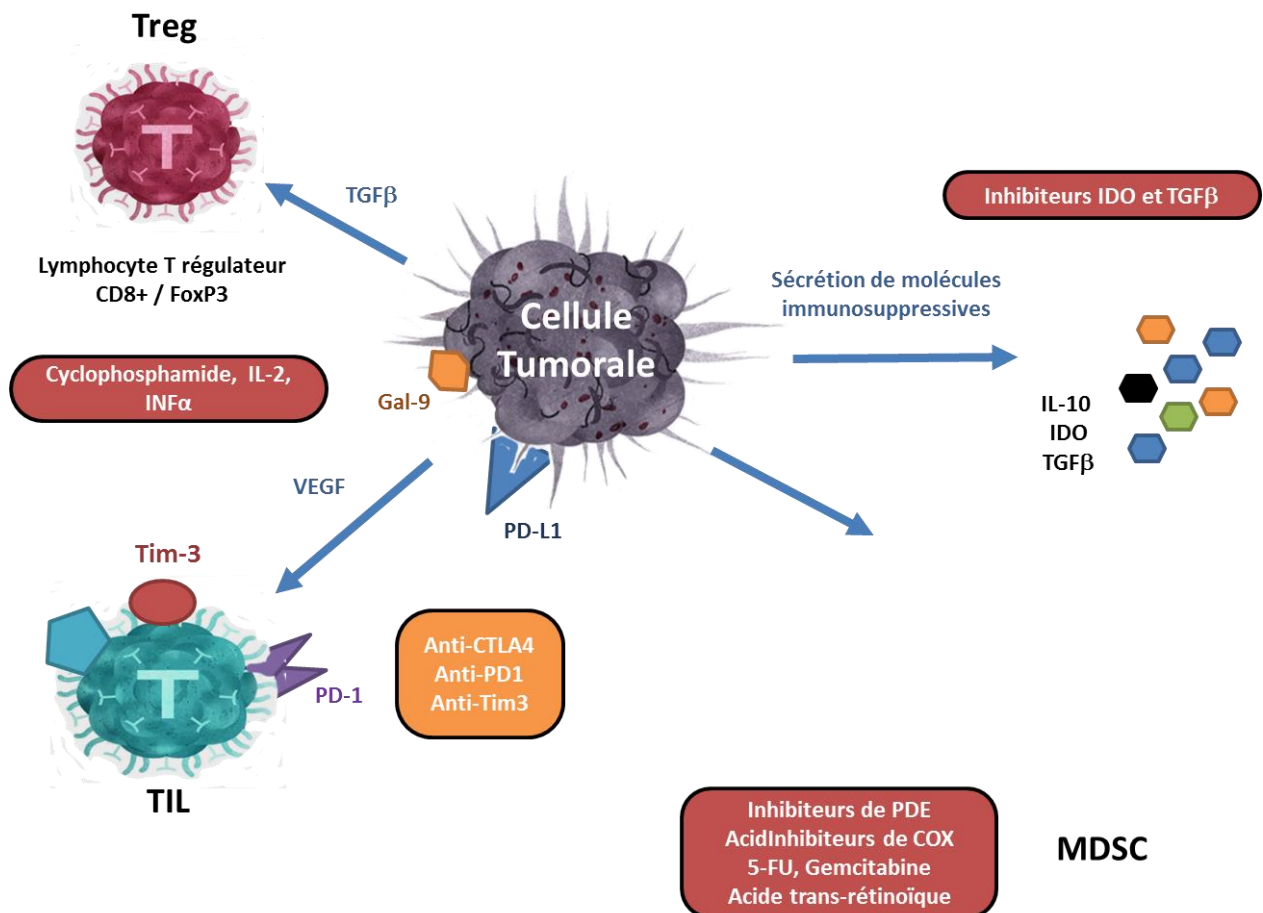


Figure 6 : Principales stratégies mises en place pour la restauration de la réponse immunitaire anti-tumorale.

Ce n'est qu'à la fin du XX^e siècle que les avancées thérapeutiques majeures de l'immunothérapie ont vu le jour avec le transfert autologue de cellules T ou le développement d'un ensemble d'anticorps (Tableau 1) ayant démontré une efficacité clinique dans la survie des patients et utilisés aujourd'hui en thérapie anti-cancéreuse (*Finn et al, 2008*).

Anticorps	Cible	Nom commercial	Type de cancer
Trastuzumab	Her 2/ Neu	Herceptine®	Cancer du sein
Rituximab	CD20	Mabthera®	Lymphome
Bevacizumab	VEGF	Avastin®	Cancers solides

Tableau 1 : Agents d'immunothérapie utilisés en clinique.

ii. Approches immunothérapeutiques de deuxième génération : l'axe PD-1 / PD-L1

Les cellules tumorales sont le siège d'un remodelage génétique et d'une plasticité cellulaire importante. Ces manifestations peuvent se traduire par des changements morphologiques et phénotypiques comme l'expression de certains antigènes au niveau de la membrane plasmique perçues par le système immunitaire et entraînant ainsi une réponse spécifique.

Les cellules tumorales développent différents mécanismes leur permettant de rester en équilibre avec l'hôte, notamment l'immuno-échappement et la tolérance en surexprimant des molécules immuno-régulatrices telles que PD-L1 (B7H1, CD274) et PD-1 ou encore en masquant l'expression des TAA par des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation (*Quesnel 2010 ; Schumacher et al, 2015*). Ainsi, il a été démontré que le ligand PD-L1 agit comme un facteur permettant aux cellules de diverses néoplasies malignes d'échapper à la lyse induite par les lymphocytes T cytotoxiques.

La survenue de rechutes tardives pourrait ainsi s'expliquer par la présence d'une maladie résiduelle à l'état stable pendant une période prolongée, et potentiellement due à la présence d'une population de cellules quiescentes, surexprimant fortement ces protéines. Il a été observé, en particulier, que les cellules tumorales dormantes surexpriment la molécule B7-H1, ainsi que B7-1 (CD80). B7-H1 est une molécule aux fonctions principalement inhibitrice des cellules T, via une interaction avec son récepteur PD-1. L'expression de la molécule B7-H1 à la surface des cellules tumorales semble modulée par différentes voies de signalisation. Ainsi, B7-H1 pourrait être un facteur d'échappement à la dormance tumorale au cours des mélanomes malins métastatiques (*Ascierto et Marincola, 2015*). Un certain nombre d'outils thérapeutiques visant spécialement cet axe ont été approuvés ou sont actuellement en phase de développement clinique dans un grand nombre d'indications en oncologie (*Harvey et al, 2014 ; Chang et al, 2015 ; Cho et al, 2016*). L'identification de composés pouvant agir sur l'affinité du complexe

entre PD-1 et PD-L1 représente une stratégie majeure dans le développement de nouveaux traitements ciblant l'immuno-échappement en oncologie.

PD-1 ou « *Programmed cell death 1* » est une protéine de surface exprimée à la surface des lymphocytes T activés. Elle est codée par le gène PDC1, situé sur le chromosome 2 humain. Ses ligands, PD-L1 (*Programmed Death Ligand 1*) et PD-L2 (*Programmed Death Ligand 2*) sont exprimés par les cellules tumorales. PD-1 est une glycoprotéine transmembranaire de type I composé de 288 acides aminés. Elle appartient à la superfamille des immunoglobulines comme les molécules CD28 et CTLA-4. Elle se compose d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique. Le domaine cytoplasmique possède deux tyrosines, l'une constitue le domaine ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitor Motif*), l'autre le domaine ITSM (*Immunoreceptor Tyrosine Switch Motif*), indispensable au rôle inhibiteur de la protéine. PD-1 est exprimé à la surface des lymphocytes CD4, CD8, des cellules NK mais aussi sur les cellules B et les cellules T périphériques ainsi que les cellules dendritiques et les monocytes (*Shinohara et al. 1994*).

Un infime niveau de PD-1 est suffisant pour assurer le rôle inhibiteur de l'activation des lymphocytes T. En cas de déficit en PD-1, l'administration de B7-H1 n'entraîne pas d'inhibition de l'activation des lymphocytes T. Cela confirme que la fonction inhibitrice de B7-H1 passe donc bien par l'interaction avec son récepteur PD-1 (*Lin et al. 2008*). PD-L1 est une protéine transmembranaire de type I qui comporte 290 acides aminés. Elle est codée par le gène CD274, qui se trouve sur le chromosome 9 chez l'homme. Elle est composée d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire (*Keir et al. 2008*). B7-H1 est exprimé sur les lymphocytes B, T, les macrophages, les cellules mésenchymateuses et les cellules dendritiques (*Yamazaki et al. 2002*). A la différence des autres membres de cette famille, B7-H1 est aussi présente à la surface des cellules non hématopoïétiques comme les cellules endothéliales, cardiaques, pulmonaires, pancréatiques, musculaires et placentaires.

La protéine PD-L1 fut découverte en 1999 en tant que nouveau membre de la famille des molécules B7 (*Dong et al. 1999*). L'identification de PD-L1 en tant que premier ligand connu de PD-1 a été réalisée l'année suivante (*Freeman et al. 2000*). B7-H1 et B7-1 interagissent au niveau de leur domaine IgV like (*Freeman et al. 2000*). Cette liaison va induire un signal inhibiteur sur les lymphocytes T entraînant une diminution de la prolifération et une diminution de la production de cytokines. L'engagement du TCR et de PD-1 avec leurs ligands respectifs

entraîne, au niveau de PD-1, la phosphorylation des tyrosines des motifs ITIM et ITSM et le recrutement de SHP-1 et/ou SHP-2. Ceci entraîne l'inhibition des signaux activateurs du complexe du TCR par déphosphorylation, et l'augmentation de l'expression de PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*). Ainsi, l'activation de la voie PI3K/Akt est atténuée ce qui peut aboutir à l'inhibition de la prolifération cellulaire et de la survie du lymphocyte T, ainsi qu'à une diminution de la synthèse des protéines et de la production des cytokines (*Butte et al, 2007*).

La molécule PD-L2, second ligand de PD-1, fut découverte un an plus tard (*Latchman et al. 2001*). C'est un homologue de la famille B7 et sa structure est proche de celle de PD-L1. Chez l'homme, l'expression de PD-L2 est limitée à certaines cellules hématopoïétiques que sont les cellules dendritiques et les monocytes (*Keir et al. 2008*). PD-L1 et PD-L2 interagissent avec PD-1 d'une manière compétitive mais avec des mécanismes différents. Ils ne sont pas spécifiques de PD-1 et n'interagissent pas exclusivement avec ce dernier. En effet, un second ligand connu pour PD-L1 est la molécule B7-1, membre de la famille B7 (*Butte et al. 2007*). Cependant, PD-L1 possède une plus grande affinité pour PD-1 que pour B7-1 (*Butte et al. 2007*). Les modèles murins ont permis de montrer que l'interaction de PD-L1 avec B7-1 est capable d'exercer un effet inhibiteur sur la prolifération, l'activation ainsi que les fonctions sécrétrices des lymphocytes T (*Butte et al. 2007*). PD-L1 est impliquée dans le contrôle des lymphocytes T auto-réactifs et le maintien de la tolérance immune vis-à-vis des auto-antigènes (*Martin-Orozco et al. 2006*) alors que PD-L2 est impliquée dans le contrôle des réponses immunes vis-à-vis des antigènes environnementaux. PD-L2 entretient un rôle important dans le maintien de l'homéostasie immunitaire au niveau des muqueuses respiratoires et digestives. L'environnement tumoral est hautement immunosuppresseur et inhibe localement la réponse anti-tumorale des lymphocytes T infiltrant la tumeur. De manière générale, ils expriment PD-1 et les cellules tumorales expriment son ou ses ligands (PD-L1 et/ou PD-L2). Le blocage de l'interaction récepteur-ligand par un anticorps anti PD-1 permet de restaurer cette perte de fonction immunitaire dans certains cancers dont ceux de la voie oropharyngée. Ainsi, certains patients pourraient bénéficier d'une approche thérapeutique plus ciblée utilisant le blocage de l'interaction de PD-1 avec ses ligands (*Badoual et al. 2013*). Ces observations ont conduit à la mise en place de différents essais cliniques ciblant le blocage de l'interaction entre PD-1 et PD-L1 par des anticorps monoclonaux anti PD-1 ou anti PD-L1, dans plusieurs types de cancer (mélanome, cancer gastrique, myélome multiple) (*Sheridan et al. 2012 ; Badoual et al. 2013*).

Ainsi plusieurs molécules visant cet axe sont actuellement en phase de développement clinique. On cite à titre d'exemple le Nivolumab (Opdivo®) ou le Pembrolizumab (Keytruda®), anticorps monoclonaux ciblant PD-1 et ayant récemment obtenu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement du mélanome et des carcinomes pulmonaires non à petites cellules (NSCLC) (*Fulchiero et al, 2014 ; Chen & Mellman 2013*). Citons encore l'Atezolizumab (Tecentriq®), un anticorps anti-PD-L1 récemment validé dans les carcinomes avancés de la vessie (*Markham et al, 2016*) (Figure 7).

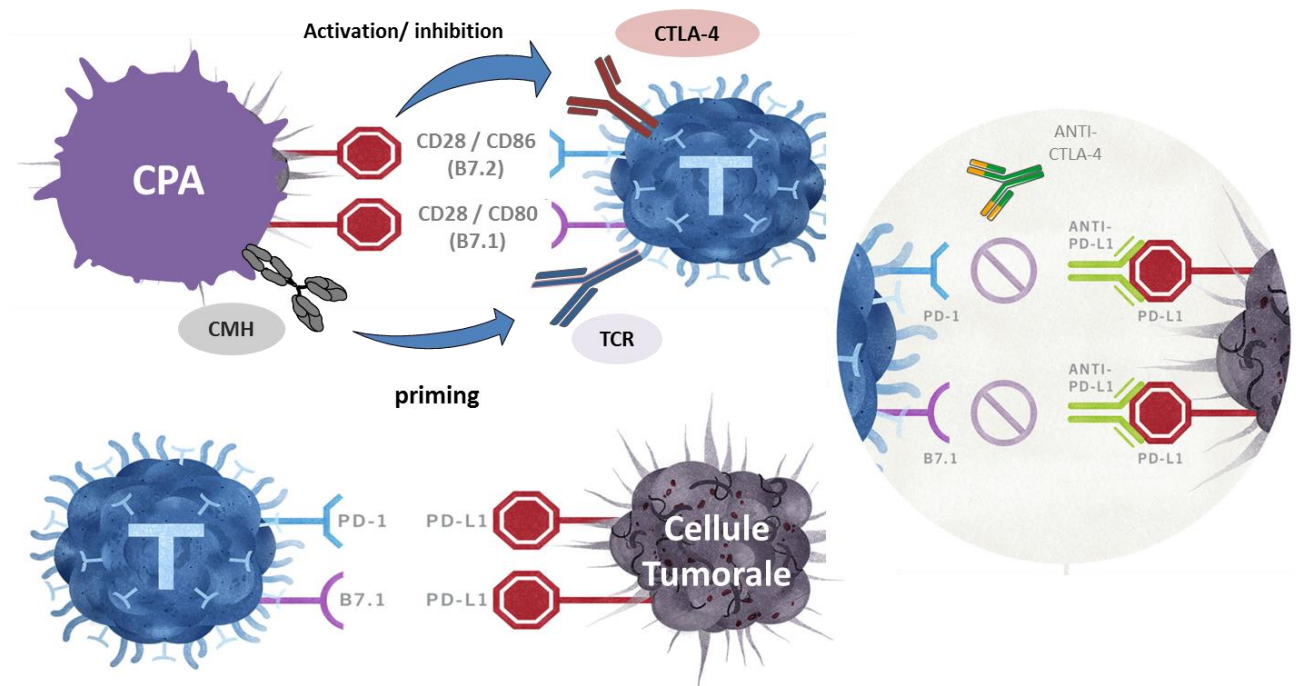


Figure 7 : Principales stratégies thérapeutiques dans le ciblage de l'immunoéchappement (adapté de Genentech™).

iii. Ciblage des cellules souches cancéreuses : les racines du mal

Plusieurs études ont mis en évidence l'existence et l'importance des cellules souches tumorales (CSC) dans l'initiation et le développement du processus de cancérisation. C'est le cas par exemple des glioblastomes (*Singh et al, 2004*), des carcinomes mammaires (*Al-Hajj et al, 2003*), des adénocarcinomes pancréatiques (*Li et al, 2007*) et des mélanomes (*Schatton et al, 2008*).

Ainsi il existerait une hétérogénéité et une hiérarchisation intra-tumorale (*Meacham et al, 2013*). Le principe des CSC repose sur le fait qu'une seule fraction cellulaire serait capable d'initier la croissance et la prolifération tumorale. Ces CSC donnent donc naissance à une large population de progéniteurs qui vont par la suite former un ensemble de cellules tumorales (*Ailles et al, 2007*) présentant une large diversité génétique et pouvant potentiellement être à l'origine de l'échappement aux mécanismes de sénescence, et entraînant de ce fait une résistance au traitement (*Colak et al, 2014 ; Fisher et al, 2013*).

Le ciblage de cette population constitue donc une alternative thérapeutique prometteuse dans le traitement et l'éradication du cancer (*Clevers et al, 2011 ; Bouvard et al, 2014a*).

B. Les principaux modèles utilisés dans le développement pharmaceutique en oncologie

Depuis longtemps, le modèle rongeur a constitué une part importante dans le développement préclinique. Le modèle souris est en effet indispensable au développement pharmaceutique car il est d'une utilité fondamentale dans la recherche contre le cancer. Ces modèles ont depuis longtemps aidé à la compréhension des mécanismes biologiques, moléculaires et génétiques, à l'origine de la transformation tumorale (*Pinho et al 2012*). Ils ont permis de mettre en évidence les principaux mécanismes impliqués dans l'initiation, le maintien, la promotion ainsi que la progression d'une masse tumorale. Ils sont donc essentiels dans le développement de thérapies anti-cancéreuses (*Ranieri et al, 2013*). Ils présentent un certain nombre d'avantages : de petite taille et de reproduction rapide ils sont facilement maniables, peuvent être manipulés génétiquement et ont un coût de génération relativement bas. Plusieurs autres modèles ont été rapportés et décrits dans la littérature. Grâce à l'essor du génie génétique et de la biologie moléculaire, plusieurs techniques sont aujourd'hui disponibles pour la génération de ces modèles.

1. Modèles de cancérogénèse chimique

Les premières expériences de carcinogénèse chimique remontent au début du XX^{ème} siècle, (*Yamagiwa, 1918*) et ont rapporté pour la première fois, le développement de carcinomes épidermoïdes sur des oreilles de lapin suite à une exposition chronique au goudron. Ces modèles reposent sur l'utilisation d'agents alkylants tel que le N-éthyl-N-nitrosourée (ENU) qui constitue un puissant mutagène. Cette molécule est capable d'induire des mutations ponctuelles

et est utilisé pour la génération de modèles de carcinome colorectal principalement (*Russel et al, 1979 ; Moser et al, 1990*). D'autres molécules ont été décrites, on cite l'exemple d'utilisation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques comme le benzo(a)pyrène, capable de produire des adduits à l'ADN induisant ainsi un défaut de réparation et des mutations ponctuelles (*Denissenko et al, 1996*). L'azoxyméthane (*Tanaka et al, 2003 ; Neufert et al, 2004*) est utilisé pour la génération de modèles spontanés de cancers colorectaux et l'uréthane (*Cekanova et al, 2009*) ainsi que le N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (*Zupancic et al, 2014*) connus pour le développement de carcinomes pulmonaires et urothéliaux respectivement. Enfin, le phénobarbital est utilisé pour la génération d'hepatocarcinomes par sélection expansion cellulaire de clones mutés pour la β -caténine (*Aydinlik et al, 2001*).

Même s'ils présentent l'avantage d'être spontanés, peu coûteux et relativement faciles d'accès, ces modèles nécessitent un système de séquençage à haut débit puissant et performant pour l'identification des mutations associés aux tumeurs, rendant le travail rapidement trop laborieux.

2. Modèles transgéniques (GEM: *Genetically Engineered Mouse*)

Ils peuvent exister sous la forme de systèmes conditionnels ou inductibles, ils sont tissu-spécifiques et leur manipulation peut se faire à plusieurs niveaux, allant de la cellule souche embryonnaire à l'organisme entier (*Adams et al, 1985 ; Thomas et Capecchi, 1987*). Deux principales méthodes ont été décrites pour leur génération : soit par activation d'oncogènes (*Kras, Nras*) ou par inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (*p53, p16^{Ink4a}*).

Ces techniques présentent l'avantage d'étudier, *in-vivo*, le potentiel oncogénique d'un gène cible d'intérêt (*Lois et al, 2002*). Elles reposent le plus souvent sur la délétion d'une partie chromosomique ou d'un locus spécifique d'un gène d'intérêt (KO : *knock-out*) ou sur l'intégration d'un transgène (KI : *knock-in*) (*Grisendi et al, 2004*), soit par infection à l'aide de lentivirus ou de vecteurs navettes (BAC : *Bacterial artificial chromosome*) ou à l'aide de systèmes inductibles tel que le système Cre-Lox, le plus communément utilisé, permettant un contrôle spatio-temporel des aberrations génétiques (*Sauer, 1987 ; Walrath et al, 2010*). Le principe de ce dernier repose sur la recombinaison homologue site spécifique au niveau de séquences ADN marquées loxP (séquences de 34 pb), par une recombinase (*Beard et al, 2006 ; Hoess et al, 1986*).

Plusieurs modèles générés grâce à cette stratégie sont décrits dans la littérature. On cite par exemple la délétion du gène *p53*^{-/-} qui conduit au développement de sarcomes chez la souris (*Donehower et al, 1992*) celle du gène *Brca1* pour l'étude des tumeurs mammaires (*Gowen et al, 1996 ; Hakem et al, 1996*) et enfin, l'activation conditionnelle de l'oncogène *Kras* (LSL-*Kras*^{G12D}) produisant des modèles de carcinome pulmonaire (*Jackson et al, 2001*).

Cependant, ces modèles présentent un certain nombre d'inconvénients. Parmi les plus communément cités, l'impossibilité de contrôle du site d'intégration ainsi que le nombre de copies insérées dans le génome qui peuvent parfois altérer le niveau d'expression du transgène, ou conduire à des phénotypes inattendus ou à des embryons non-viables (*Gowen et al, 1999*). Ce sont des systèmes irréversibles qui peuvent parfois produire des effets « *off-target* » dans les tissus avoisinants. Enfin, une activation prolongée de la recombinase Cre peut avoir des effets délétères sur l'organisme.

3. Modèles de xénogreffe

Ces modèles, de plus en plus utilisés sont faciles et rapides à mettre en œuvre. La méthode consiste à greffer des cellules issues de lignées préétablies ou isolées de prélèvement de patients. La nature des tumeurs à implanter peut provenir du même type que l'hôte qui les reçoit (greffe syngénique) tel que le modèle B16 (*Fidler et al, 1973*) ou xénogénique, on parle alors de xénogreffe (*Bibby et al, 2004 ; Ruggeri et al, 2014*). Plusieurs sites d'injection peuvent être envisagés, sous-cutané (*greffe hétérotopique*) ou site-spécifique (*greffe orthotopique*) (*Huynh et al, 2011*).

Le principal inconvénient de cet outil serait l'absence d'un système immunitaire intact et d'un microenvironnement tumoral adapté. En effet, c'est la souche de souris athymiques *SCID-Nude* qui est le plus souvent utilisée dans cette approche (*Severely compromised immunodeficient Forkhead box protein N1 [Foxn1^{nu}]*) (*Sharpless et al, 2006 ; Khaled et Liu, 2004*). Ils sont aussi peu prédictifs des paramètres pharmacocinétiques, du profil de réponse à un candidat thérapeutique ainsi que du comportement métastatique de la tumeur, avec quelques rares exceptions rapportées dans la littérature (*Quintana et al, 2012 ; Einarsdottir et al, 2014*).

4. L'utilisation du poisson zèbre

Le poisson zèbre ou *Danio rerio*, partage plus de 70% d'homologie de séquence avec le génome humain et plus de 80% des gènes associés aux différentes pathologies humaines (Howe et al, 2013). Bien que l'utilisation de ce modèle en cancérologie soit récente, son utilisation en recherche remonte aux années 1930 (Laale, 1977 ; MacRae et Petersson, 2015). Cet outil présente de nombreux avantages car il présente une signature moléculaire et un profil histopathologique conservés, identiques à son homologue humain (Lieschke et Currie, 2007). Il permet ainsi grâce à sa physiologie et son système hématopoïétique conservés (Tiso et al, 2009 ; Steinbicker et al, 2011 ; Ganis et al, 2012) de modéliser un certain nombre de tumeurs par plusieurs approches telles que la mutagenèse chimique, le génie génétique ou encore la greffe de cellules tumorales.

Plusieurs modèles ont été décrits, on cite l'exemple du mélanome par activation de l'oncogène *Braf^{V600E}* (Patton et al, 2005 ; Dovey et al, 2009) ou encore *Hras^{V12}* (Feng et al, 2010 et 2012). Ces systèmes permettent l'étude de l'interaction entre les cellules immunitaires et tumorales aux stades précoces de la transformation maligne. De plus, les embryons et les larves de ce poisson sont transparents et l'injection de cellules tumorales peut intervenir aux différents stades de développement. Ces propriétés permettent ainsi une visualisation en détail des processus biologiques et la mise en évidence de voies de signalisations importantes dans la mélanomagenèse (Lee et al, 2005 ; Haldi et al, 2006 ; Topczewska et al, 2006 ; Diez-Torre et al, 2009).

Parmi les autres avantages liés à l'utilisation de ce modèle, citons la visualisation des processus d'angiogenèse aux stades préliminaires (Lawson et Weinstein, 2002 ; Hoffman et al, 2012), le criblage et l'identification ainsi que l'optimisation de *lead* thérapeutiques (White et al, 2011 ; Zhou et al, 2012) et enfin le profil de réponse à un candidat thérapeutique (Jeong et al, 2008 ; Goldstone et al, 2010 ; Asnani et al, 2014) (Figure 8).

L'absence de certains organes tels que la glande mammaire et la prostate, limitant la modélisation des pathologies liées à ces tissus (MacRae et Petersson, 2015) ainsi que l'absence de système immunitaire mature avant 28 jours de développement constituent les principaux inconvénients liés à l'utilisation de ce modèle (Taylor et al, 2009).

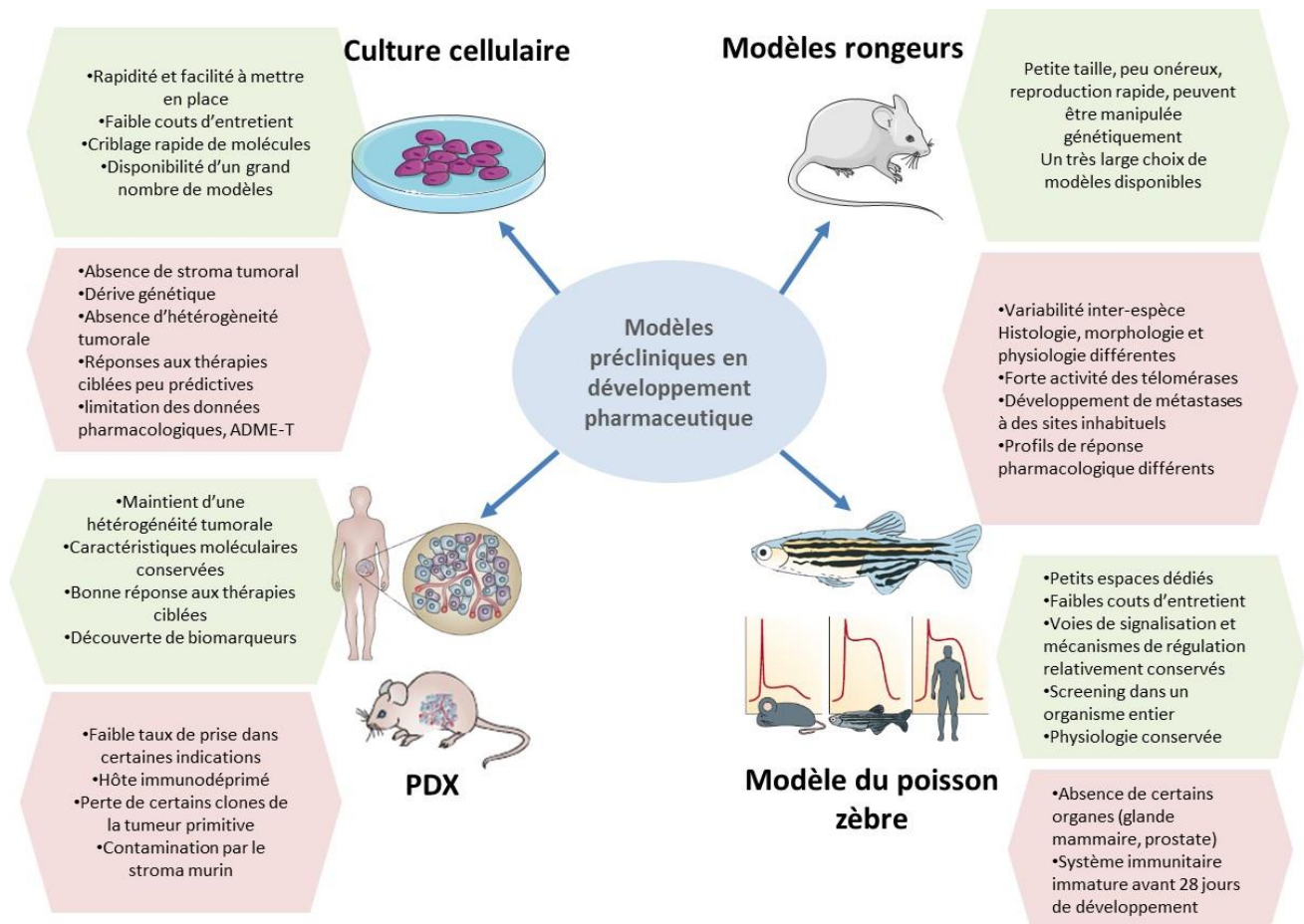


Figure 8 : Avantages et inconvénients des principaux modèles animaux utilisés dans le développement préclinique pharmaceutique. Les avantages sont énumérés dans les cadres verts et les inconvénients dans les cadres rouges, PDX (*Patient Derived Xenograft*), ADME-T (Absorption Distribution Métabolisme Élimination et Toxicité).

Les modèles animaux constituent un ensemble de plateformes intéressantes pour la compréhension des mécanismes à l'origine de l'initiation, du développement et de l'échappement tumoral. Malgré leur contribution à l'avancement de la recherche en cancérologie, la complexité et l'hétérogénéité tumorales rendent la modélisation de cette pathologie difficile. Ces modèles ont permis de répondre à un certain nombre de questions mais restent néanmoins peu prédictifs car ils ne tiennent pas compte du microenvironnement tumoral, rendant ainsi l'extrapolation des résultats à l'homme difficile. De plus, le profil pharmacocinétique de certains candidats thérapeutiques est très variable dans les modèles rongeurs en raison de leur activité métabolique importante, médiée par les cytochromes P450 (*Frijhoff et al, 2004*), conduisant ainsi à une réponse biaisée. C'est pourquoi il est intéressant d'explorer d'autres alternatives, plus prédictives, pour le développement de thérapeutiques plus efficaces et moins toxiques.

C. Les nouvelles approches dans le développement pharmaceutique en oncologie

1. Les nouveaux concepts émergents du développement pharmaceutique

Les données pharmacologiques obtenues chez la souris sont, la plupart du temps difficilement transposables à l'homme. Selon une étude récente, seulement 8% des molécules ayant prouvé une efficacité dans un modèle préclinique murin ont pu démontrer un effet en phase clinique chez l'homme (*Cekanova et Rathore, 2014 ; Mak et al, 2014*). D'autres rapports publiés ont également rapporté un constat alarmant sur le fort taux d'attrition des agents en développement en oncologie (*Kola et Landis, 2004*). En effet, seulement 5% des molécules testées chez l'homme obtiennent une AMM dans le domaine de la cancérologie contrairement à 20% pour les maladies cardiovasculaires (*Hutchinson et Kirk, 2011*). Une meilleure caractérisation du profil tumoral de chaque individu ainsi que l'amélioration des outils de prédiction permettent non seulement une meilleure prise en charge et un meilleur contrôle de la maladie, mais aussi de réduire considérablement les coûts de développement pharmaceutique associés. Les molécules inefficaces et toxiques sont rapidement éliminées et un choix thérapeutique adapté pourra être proposé aux patients atteints de cancers.

Parmi les approches les plus pertinentes, l'utilisation « *d'avatars de tumeurs* » et de modèles animaux de maladie spontanée ont permis une amélioration significative de l'arsenal thérapeutique en oncologie ces dernières années.

a) Le concept « d'avatars/ chimères » et d'essais « co-cliniques »

Les xénogreffes établies à partir de prélèvement de patient ou « PDX : *Patient derived xenograft* » constituent aujourd'hui un ensemble de modèles prédictifs de la réalité clinique. Ces outils ont l'avantage de présenter une morphologie cellulaire, des caractéristiques moléculaires et une hétérogénéité conservées et proches de la tumeur primitive. Ils constituent donc un atout important dans l'évaluation de nouveaux agents anticancéreux.

i. Les avatars ou chimères de tumeurs

Cette technique consiste à implanter la tumeur propre de chaque patient dans un organisme immunodéficient (Figure 9). Elle permet d'orienter le choix de la meilleure stratégie thérapeutique en fonction du paysage mutationnel de chaque tumeur ainsi que du profil génétique propre à chaque individu, éliminant ainsi les coûts de développement et toxicités associées aux molécules inefficaces chez certains patients (*Tentler et al, 2012*). Ces chimères constituent donc des modèles murins personnalisés, utilisés pour tester la balance bénéfice/risque d'un certain nombre de combinaisons thérapeutiques (*Fiebig et al, 2007 ; Nemati et al, 2010*).

Ces modèles ont par ailleurs permis la découverte de biomarqueurs de résistance au traitement liés à l'administration du candidat AZD6244. Un des mécanismes d'échappement à ces inhibiteurs des protéines MEK 1/2 intervenant dans la voie MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) serait l'activation de la voie Wnt/ β -caténine. Ces résultats ont donc permis de suggérer l'association d'inhibiteurs de MEK et de Wnt dans la prise en charge des cancers colorectaux *Kras* mutés (*Tentler et al, 2010*).

Les inconvénients les plus fréquemment rencontrés sont les temps nécessaires à la prise de greffe qui peuvent varier de 2 – 4 mois, les coûts considérables associés ainsi que les efficacités de xénogreffes qui varient considérablement en fonction des prélèvements obtenus (*Mueller et Reisfeld, 1991 ; Garber, 2009*). Certains patients ne peuvent bénéficier de ces thérapies et décèdent avant l'obtention de résultats (*Pollack, 2012*). Il est également impossible d'évaluer l'effet d'agents ciblant spécifiquement le système immunitaire en raison du microenvironnement tumoral peu adapté (*Tentler et al, 2012*).

ii. Les essais co-cliniques

Cette alternative fait appel à l'utilisation de souris génétiquement modifiée (GEM : *Genetically Engineered Mouse*) pour mimer le profil mutationnel de la tumeur du patient et guider le traitement. Les protocoles expérimentaux sont conduits simultanément chez l'homme et l'animal et les données obtenues à partir du modèle murin sont extrapolées et utilisées pour le traitement et le suivi clinique des patients (Figure 9). Ils permettent la stratification des patients en fonction de la base génétique de réponse au traitement ainsi qu'une intégration en temps réel et une orientation du choix thérapeutique, conjointement aux essais de phase I/ II (*Nardella et al, 2011*). Ces modèles ont permis de mettre évidence la synergie d'action entre *Selumetinib* (inhibiteur de la protéine RAS) et le docetaxel (alkaloïde perturbateur du fuseau mitotique) dans le traitement de carcinomes pulmonaires non à petites cellules, mutés pour l'oncogène *Kras* (*Chen et al, 2012*).

Le cancer est une maladie très complexe, très hétérogène et imprévisible. Chaque tumeur est unique par son profil génétique et moléculaire lui conférant un comportement biologique spécifique. Plusieurs mutations peuvent donc être rapportées au sein d'une même tumeur, rendant la modélisation de celle-ci difficile et peu fiable dans un modèle animal (*Fichtner et al, 2008 ; Cheon et Orsulic, 2011*). Le challenge principal associé à cette méthodologie réside ainsi dans la modélisation de l'hétérogénéité tumorale. Aussi, les modèles transgéniques utilisés sont souvent protégés par des brevets, les rendant difficilement accessibles pour la recherche (*Nardella et al, 2011*).

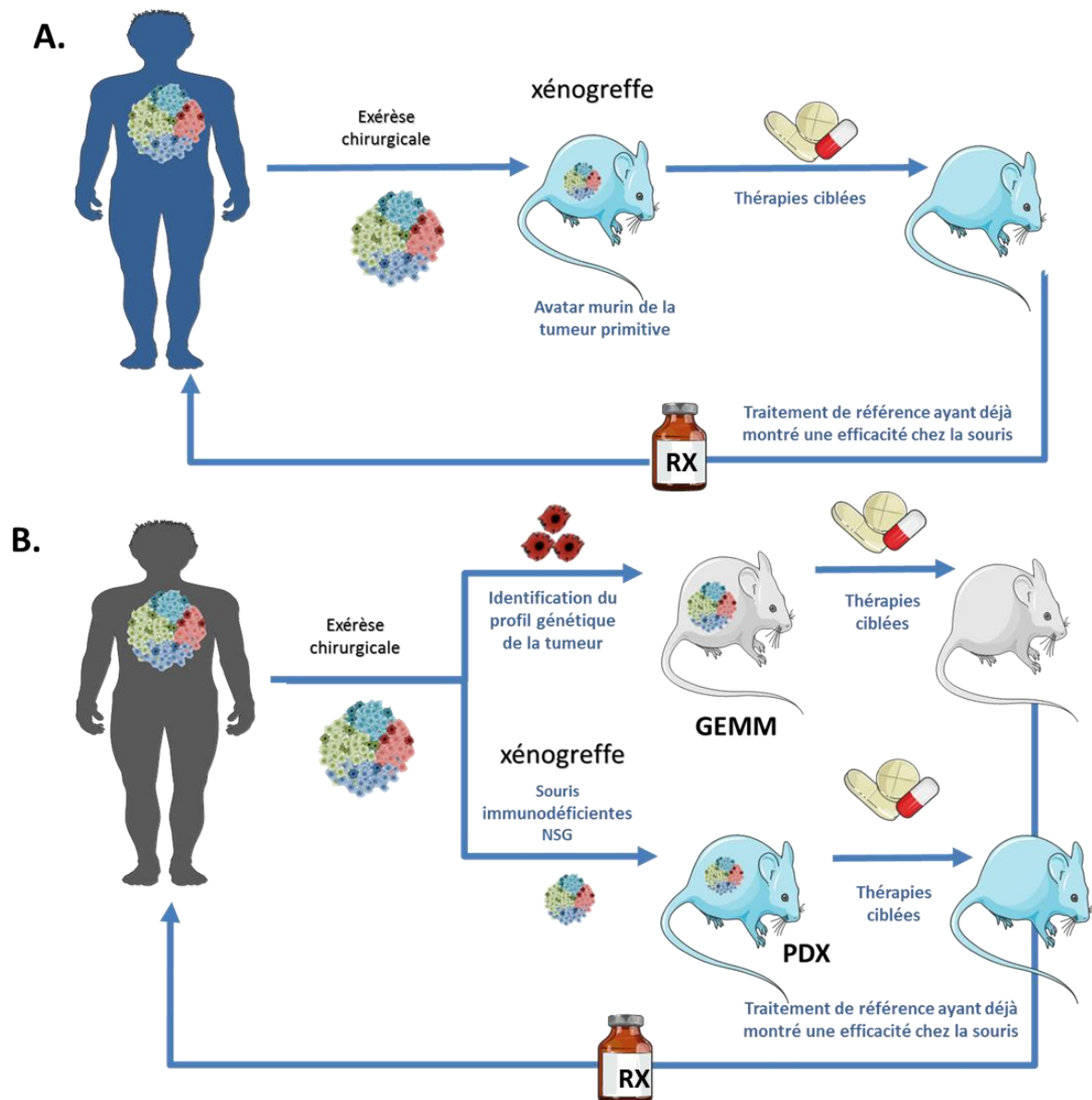


Figure 9 : Concepts émergents dans le développement et la prise en charge thérapeutique en cancérologie. (A) le concept « de chimères ou avatars murins » consiste en l'utilisation d'un fragment tumoral issu d'une biopsie ou d'une exérèse chirurgicale et de le greffer à un ensemble de souris immunodéficientes. Ces animaux seront par la suite utilisés pour tester une combinaison de molécules et les résultats obtenus seront utilisés pour guider la prise en charge thérapeutique individuelle de chaque patient. (B) En revanche, le concept d'essais « co-clinique » préconise la génération et l'utilisation de souris transgéniques parallèlement aux essais cliniques de phase I/ II chez l'homme, permettant ainsi le développement rapide et efficace d'un candidat médicament.

b) Intérêts de la médecine comparative : le modèle canin

Le cancer est une maladie complexe et multifactorielle, plusieurs paramètres entrent en jeu dans le processus de cancérogenèse. Différentes études ont rapporté l'importance du microenvironnement dans la survie et la prolifération des cellules tumorales (*Amé-Thomas et*

Tarte, 2014 ; Ruffel et al, 2012). Les modèles précliniques décrits précédemment ne sont pas assez prédictifs et ne tiennent pas compte de la niche tumorale car ils disposent le plus souvent d'un microenvironnement restreint et souvent non-adapté voire inexistant. Ces modèles développent des tumeurs induites, chimiquement et génétiquement par mutagenèse dirigée ou à l'aide de greffes hétérotopiques de cellules tumorales (*Hansen et al, 2004 ; Cheon et al, 2011*). C'est pourquoi il est donc nécessaire de travailler sur des modèles plus sensibles et mimant plus fidèlement la pathologie humaine afin d'obtenir des candidats thérapeutiques plus efficaces et moins toxiques, pour une meilleure prise en charge. L'utilisation du modèle canin de maladie spontanée comme approche prédictive en oncologie comparée a été rapportée par plusieurs équipes à travers le monde et est aujourd'hui un domaine en pleine expansion (*MacEwen et al, 1990 ; Pinho et al, 2012 ; Thamm et al, 2009 ; Rowell et al, 2011*). En effet, les fortes similitudes au niveau morphologique, histologique, biologique et génétique rapportées entre les tumeurs humaines et canines, mais aussi l'accès facilité aux tissus tumoraux et l'analyse de ces derniers seraient un atout considérable pour la recherche thérapeutique en cancérologie.

i. Intérêt dans la compréhension des mécanismes biologiques

Plusieurs points communs ont été rapportés entre les cancers canins et leurs homologues humains. Certaines mutations somatiques ont été rapportées dans les mélanomes buccaux canins, similaires aux mélanomes cutanés humains, c'est le cas des oncogènes NRAS et PTEN (*Gillard et al, 2014*). De plus, la sélection génétique des races canines a permis de réduire l'hétérogénéité au sein d'une même population, rendant ainsi l'identification des gènes de prédisposition à certaines maladies plus facile lors d'études de génomique comparative. C'est ainsi qu'a été mise en évidence l'implication de la mutation du gène PNPLA1 (*Patatin-like Phospholipase protein 1*), jouant un rôle dans le métabolisme des glycérophospholipides présents dans les kératinocytes, dans l'ichtyose congénitale autosomique récessive chez l'homme, après avoir été identifiée chez le *golden retriever* (*Grall et al, 2012*). Cet exemple, bien que non directement lié à l'oncologie, montre en quoi le chien a pu permettre d'élucider une pathologie de l'homme, illustrant bien le concept de pathologie comparée animale et humaine.

ii. Intérêt dans la compréhension de l'évolution clinique de la maladie

L'apport clinique du modèle canin dans l'amélioration des approches thérapeutiques pour la médecine humaine remonte à très longtemps. Les aspects anatomiques, génétiques, moléculaires et cliniques entre l'homme et le chien ont contribué grandement à l'amélioration du panel thérapeutique et interventionnel pour l'homme (*Paoloni & Khanna, 2008*).

Pendant plusieurs années, l'étude du modèle chien a en effet contribué au perfectionnement des techniques chirurgicales mais aussi à la mise en place de nouveaux protocoles de prise en charge en cancérologie ainsi qu'à l'amélioration des outils diagnostiques (*Axiak-Bechtel et al, 2015 ; Schiffman et al, 2015*). On cite par exemple l'ostéosarcome où le patient chien a grandement contribué à l'amélioration et au perfectionnement des procédures chirurgicales visant à préserver le membre atteint (*LaRue et al, 1989 ; Withrow et Wilkins, 2010*), ou à la mise en place de thérapies ciblées dans le traitement du mastocytome (*London et al, 2003*) ou encore de protocoles de greffes de moelle osseuse chez des patients atteints de leucémie aiguë (*Thomas et al, 1969*).

L'évaluation de l'activité biologique de composés d'intérêt dans les modèles vétérinaires de maladie spontanée constitue aujourd'hui une approche très intéressante dans le développement de thérapeutiques à visée humaine (*Khanna et al, 2009*). Bien que l'intérêt clinique de ce modèle ait été rapporté par plusieurs équipes, la validation de la pertinence clinique des pathologies spontanées chez l'animal reste nécessaire pour une intégration systématique dans le processus standard de développement du médicament. Dans le cadre d'une collaboration avec les laboratoires pharmaceutiques Pierre Fabre, nous avons évalué l'efficacité thérapeutique d'un candidat médicament, le F14512, à travers une étude clinique de phase I dans les lymphomes canins multicentriques, développant ou non une chimiorésistance aux thérapies conventionnelles (*Tierny et al, 2015*). Le candidat F14512 est un inhibiteur de topoisomérase II, de seconde génération et dont l'efficacité thérapeutique a été démontrée dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) chez l'homme au cours d'un essai clinique de phase I (*Annereau et al, 2010*). Les molécules appartenant à cette classe thérapeutique induisent l'arrêt de la réparation des cassures double-brin en se fixant au complexe clivable ADN-Topoisomérase, provoquant ainsi une instabilité génomique conduisant à la mort cellulaire par apoptose (*Ivashkevich et al, 2013*). La particularité de ce composé serait la présence d'une queue spermine lui permettant une assimilation suivie d'une métabolisation rapide et massive

par les cellules tumorales via le système de transfert polyamine (PTS) (*Casero, Marton et al, 2007 ; Mouawad et al, 2014*).

C'est au cours d'une étude de 8 semaines sur une cohorte de 23 chiens atteints de lymphomes multicentriques, au diagnostic ou en rechute, que nous avons pu démontrer que les taux de la protéine H2AX phosphorylée (*pH2AX-foci*), indicateurs des cassures double-brin (*Ivashkevich et al, 2013, Goutham et al, 2012*) constituaient un biomarqueur favorable de la réponse clinique au traitement chez le chien et pouvant être corrélés à la médecine humaine (*Gentry et al, 2011*).

iii. Intérêt dans l'évaluation de nouvelles entités chimiques

Les protéines ont toujours constitué une cible de choix dans le développement de thérapeutiques antinéoplasiques. C'est pourquoi l'intérêt s'est porté principalement sur la conception de petites molécules issues de la synthèse chimique et inhibant spécifiquement des facteurs intervenant dans le contrôle et la régulation du cycle cellulaire durant les premières phases d'expansion de la chimiothérapie au cours du siècle dernier. Et même si aujourd'hui le développement thérapeutique en oncologie s'est réorienté vers les thérapies ciblées et les immuno-modulateurs, plusieurs molécules intervenant dans la régulation du cycle cellulaire sont toujours en phase d'évaluation clinique (*Carlson et al, 2008*).

On note l'exemple de la molécule ABT-751, un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline développé par les laboratoires AbbotTM et actuellement en phase II de développement clinique dans le traitement des cancers par inhibition du cycle cellulaire en combinaison avec d'autres thérapies (*Hand et al, 2006*). L'étude de la relation structure-activité (RSA), montre que ce composé se fixe au niveau du dimère de tubuline, par interaction avec le site de liaison de la colchicine (Figure 10).

Principale sous-unité structurale des microtubules, la tubuline est retrouvée sous la forme de dimères $\alpha\beta$ de 100kDa, le plus souvent avec une homologie de séquences allant de 36 à 42% entre les isoformes α et β (*Ludueña et al, 1992*).

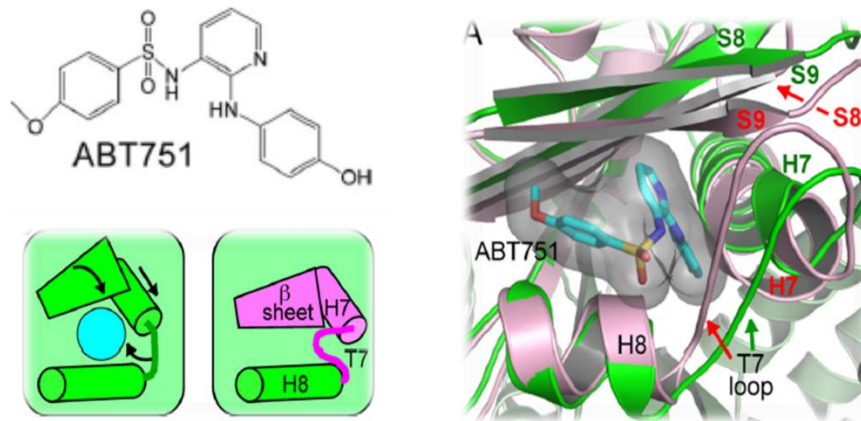


Figure 10 : Structure et modélisation du composé ABT-751. La structure de base est une quinazolinone, ces molécules constituent une classe thérapeutique possédant des propriétés hypnotiques et sédatives c'est un composé hétérocyclique dérivé de la quinazoline portant un groupe carbonyle dont la formule brute $C_8H_6N_2O$. Deux isomères connus, la 2-quinazolinone et la 4-quinazolinone (le plus commun) (*Dorléans et al, 2009*).

Cet agent antimitotique oral a été évalué dans une étude clinique de phase I incluant 30 chiens (19 au diagnostic et 11 en rechute) atteints de lymphome non-hodgkinien multicentriques (*Silver et al, 2012*). La dose maximum tolérée dans cette étude a été de 350 mg/m² PO (*per os*), tous les jours pendant 7 jours, associée principalement à des toxicités digestives (diarrhées, vomissements). Le taux de réponse obtenu était de 20% pour une durée de réponse allant de 21 à 111 jours.

2. Apports de la médecine translationnelle

Pendant plus de quarante ans, la recherche de marqueurs et outils pronostiques dans le suivi et l'évaluation clinique des cancers n'a cessé d'évoluer. En effet, les caractéristiques histopathologiques et cliniques constituent des facteurs décisifs importants dans la prise en charge du patient atteint de cancer.

Le développement et la progression du cancer sont associés à une dérégulation importante des voies de signalisation moléculaires de la cellule cancéreuse, ainsi qu'à un certain nombre de marqueurs sériques et tissulaires rapportés dans l'évolution et les réponses cliniques aux traitements, dans le mélanome, mais aussi dans d'autres néoplasies malignes (Figure 11) (*Karagiannis et al, 2015*). C'est le cas de la lactate déshydrogénase (LDH), indicateur

pronostique le plus fiable aujourd'hui permettant d'évaluer le stade de progression tumorale ainsi que la survie des patients atteints de mélanome.

D'autres facteurs ont également été mis en évidence, on cite l'exemple du facteur de croissance vasculaire (VEGF : *vascular endothelial growth factor*) ou encore récemment, la quantification d'ADN circulant tumoral (ctDNA) dans le suivi clinique des carcinomes mammaires (*Sundaresan & Haber, 2015*).

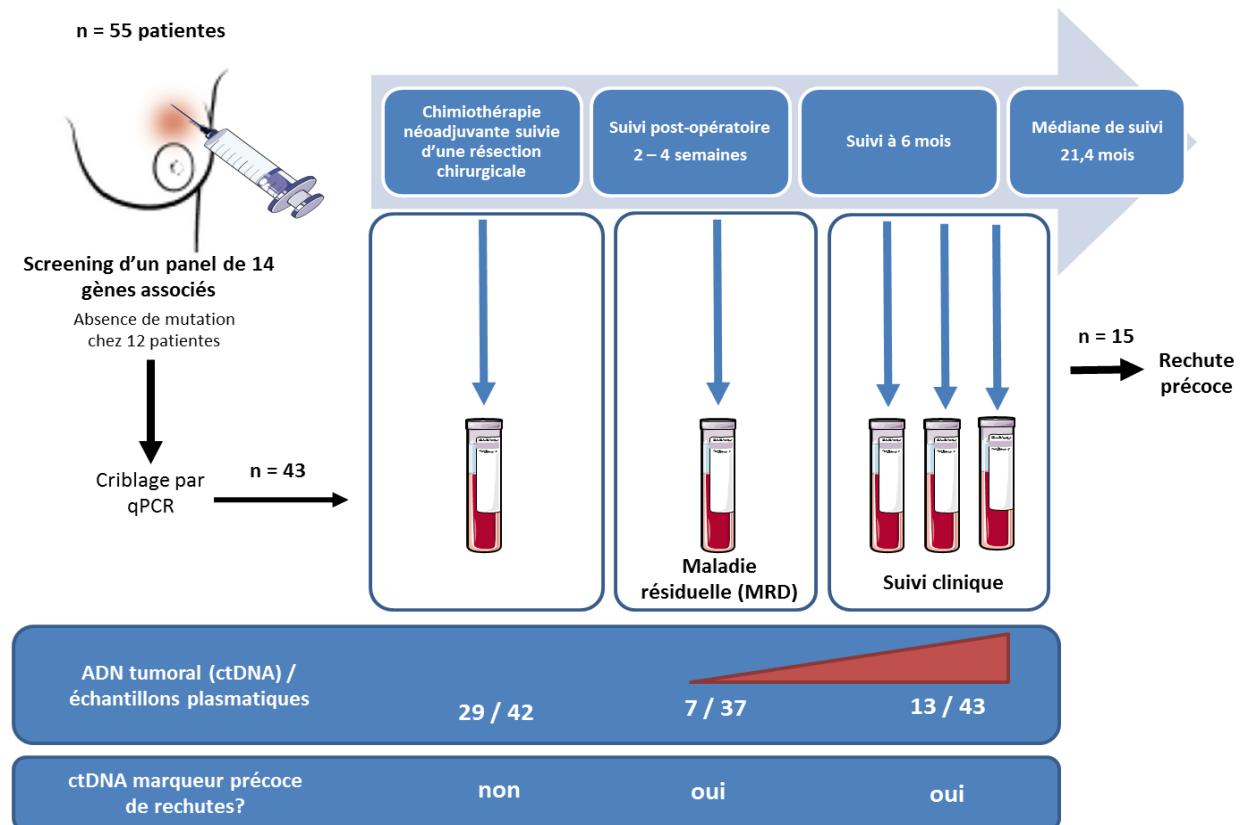


Figure 11 : Exemple de monitoring précoce des phases d'évolution et de réponse au traitement dans le cancer du sein (adapté de *Sundaresan & Harber, 2015*).

L'un des principaux buts de l'oncologie comparée est l'identification ainsi que la validation de nouveaux marqueurs biologiques ou biomarqueurs spécifiques. Un biomarqueur se définit comme étant toute entité chimique ou biomolécule (ADN circulant, protéine...etc.) anormalement surexprimée ou absente au sein d'un tissu tumoral et dont la fonction cellulaire est caractéristique du potentiel évolutif du processus tumoral (*Mobasheri et Cassidy, 2010*). Synthétisés par la tumeur ou les tissus environnants et secrétés dans le sang ils sont facilement dosables. Ils peuvent être de plusieurs types (biomarqueur de prédisposition, biomarqueur diagnostique, biomarqueur de surveillance), et leur utilisation constituerait un apport considérable dans le suivi de la maladie, l'évaluation de la réponse au traitement et la prévention des rechutes

dues à une résistance à ce même traitement (*Henry, 2010*). Cependant, pour être fiable, un marqueur doit être spécifique, facilement détectable et mesurable lors de tests cliniques reproductibles. L'augmentation des cohortes de patients et la diversité / hétérogénéité de la population, via des études multicentriques permettrait donc une identification et une validation rapides d'un nombre plus important de facteurs pouvant servir au suivi clinique.

Peu nombreuses sont les études qui mettent en évidence la recherche de nouveaux biomarqueurs en médecine vétérinaire. Parmi les exemples les plus cités, on trouve principalement des études dans le lymphome (*Henry, 2010 ; Tierny et al, 2015*), les carcinomes transitionnels de la vessie (CTV) (*Bracha et al, 2014*). Le modèle canin permet non seulement l'étude de biomarqueurs d'angiogènes tumorale (*Aresu et al, 2014*) mais a aussi pu permettre, grâce à l'établissement d'une classification moléculaire des lymphomes B par spectrométrie de masse, l'identification de quatre protéines dont la surexpression serait à l'origine de mauvais pronostic dans la maladie d'Ewing, une forme pédiatrique des sarcomes (*Zhuo et al, 2014*).

D. Importance du modèle canin en recherche préclinique

On constate aujourd'hui une augmentation de l'incidence des cancers canins due en partie à l'amélioration de l'offre de soin en médecine vétérinaire et à une sensibilisation de la population ces dernières années. Les animaux de compagnie sont susceptibles, comme l'homme, au développement spontané d'un certain nombre de cancers, constituant ainsi un bon modèle d'étude de la pathologie humaine. En effet, 20 – 25% de mortalité a été rapportée chez cette population en rapport avec cette pathologie, dont 45% chez les animaux de plus de 10 ans (*Karayannopoulou et al, 2001*). Plusieurs travaux ont permis de mettre en évidence un intérêt translationnel réel de ces modèles pour l'étude de la pathologie humaine (*Khanna et al, 2006 et 2008*). C'est le cas par exemple des mastocytomes, des carcinomes mammaires (*Porrello et al, 2006 ; Rowell et al, 2011*), des lymphomes (*Marconato et al, 2013*), des sarcomes histiocytaires (*Hédan et al, 2011*) mais aussi des mélanomes (*Simpson et al, 2014*) et des ostéosarcomes (*Mueller et al, 2007*).

Le génome canin partage plus de 650 mégabases (Mb) d'ADN génomique ancestral avec son homologue humain. Le décryptage de cette séquence, absente chez la souris est ainsi primordial dans la compréhension des régulations génétiques et épigénétiques d'un certain nombre de

pathologies. L'étude de la génétique du chien constitue aujourd'hui la base de la compréhension et l'identification des événements précoces à l'origine de la tumorigenèse. Elle permet l'identification de facteurs impliqués dans la dérégulation de l'homéostasie cellulaire et tissulaire mais aussi des gènes responsables de la transformation maligne.

Le chien domestique ou *Canis lupus familiaris* appartient à la famille des *Canidae* qui regroupe une trentaine d'espèces. Il est issu d'une évolution phylogénétique importante faisant suite à une sélection et un brassage génétique considérables depuis sa domestication, environ 14 000 ans av. J-C (*Ostrander et Wayne, 2005 et 2007*). On dénombre aujourd'hui pas moins de 350 races différentes, tout aussi bien sur les plans, phénotypique et génotypique et issues d'un même ancêtre commun. La création des races canines fait suite à un besoin spécifique de l'homme. En effet, l'objectif principal de la création de race était de disposer d'animaux ayant des compétences particulières (chasse, protection, attelage... etc.). La définition d'une telle ou telle race canine doit respecter un certain nombre de critères phénotypiques particuliers ainsi que des règles strictes de reproduction, ce qui explique le taux élevé de consanguinité et d'homozygotie rapportés parmi les chiens dits de race pure (*Shearin et Ostrander 2010*).

D'un point de vue global, une race représenterait un isolat de populations de faible hétérogénéité génétique. Cette définition en revanche se précise du point de vue génomique et se traduit comme un ensemble de gènes, ou plus spécifiquement d'allèles, responsables de la morphologie, de la taille, du pelage ainsi que du comportement de chaque race (*Parker et al, 2004*).

Le cancer touche globalement toutes les races canines sans exception. Cependant, des études épidémiologiques ont rapporté que certaines espèces sont plus ou moins prédisposées au développement de tel ou tel type de cancer (*Proschowsky et al, 2003 ; Bonnet et al, 2005 ; Adams et al, 2010*). Ainsi par exemple, les races géantes sont beaucoup plus prédisposées au développement d'ostéosarcomes contrairement aux terriers Ecossais qui sont plus susceptibles au développement de carcinomes transitionnels de la vessie (*Ostrander et Wayne, 2005*).

1. Le lymphome

Les lymphomes non-hodgkiniens sont les hémopathies malignes les plus fréquemment diagnostiquées chez le chien, ils représentent 15 à 20% des tumeurs et plus de 90% des cancers hématologiques dans cette espèce (*Rütgen et al, 2010*). C'est une atteinte du tissu lymphoïde

(rate, moelle osseuse et nœuds lymphatiques) caractérisée par une prolifération maligne de cellules d'origine lymphopoïétique (lymphocytes B ou T selon l'immunophénotype) (7 – 24% des néoplasies chez le chien) (*Ponce et al, 2011 ; Vail et al, 2012*). Contrairement à l'homme où son étiologie peut-être parfois associée, en plus des facteurs génétiques et environnementaux, au virus d'Epstein-Barr, le lymphome canin se développe de manière spontanée (*Vail et al, 2012*). Ce cancer se rapproche de son homologue humain sur le plan clinique et moléculaire et plusieurs travaux ont rapporté son utilité dans le développement et l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques (*MacEwen et al, 1992 ; Vail et al, 2009*) ainsi que dans l'étude des mécanismes d'immunoséistance (*Stein et al, 2011*).

2. L'ostéosarcome

Les ostéosarcomes représentent une classe de tumeurs très agressives du tissu osseux. Touchant principalement les populations pédiatriques et l'adolescent d'âge moyen de 14 ans, ils se développent particulièrement au niveau des os longs appendiculaires. Ces tumeurs sont classées parmi les atteintes malignes les plus fréquentes du système squelettique chez le chien (*Fenger et al, 2014*). Elles constituent 85 à 98% des tumeurs osseuses canines (*Morello et al, 2011*). Les races géantes comme le dogue allemand ou le Leonberg sont majoritairement prédisposées au développement de ce type de cancers (*Mueller et al, 2007*).

Ces tumeurs sont hautement métastatiques et le taux d'apparition des métastases a été évalué à environ 80 %, à deux ans post-opératoire chez l'homme (*Vail et MacEwen, 2000*) et autour de 90% (*Gorlick et Khanna, 2010*) chez le chien.

Le profil métastatique et la résistance à la chimiothérapie font de cette tumeur un modèle d'une grande importance dans le développement d'approches anti-métastatiques. De plus, les similarités aussi bien au niveau histologique qu'au niveau moléculaire (voies de signalisation impliquées), notamment les mutations de l'oncogène TP53 et de la voie mTOR font de ce type tumoral un partenaire essentiel pour le développement translationnel des traitements chez l'homme (*Ranieri et al, 2013*). Parmi les exemples réussis de la collaboration entre l'homme et l'animal domestique dans cette pathologie, un essai clinique incluant 27 chiens atteints de formes non métastatiques d'ostéosarcome a rapporté une amélioration de la survie globale des patients ayant bénéficié d'un traitement adjuvant à base de L-MTP-PE (*Liposome encapsulated Muramyl Tri-Peptide Phosphatidyl Ethanolamine*) après amputation (222 jours vs. 77 jours

pour le placebo) (*MacEwen et al, 1989*). Cette étude a permis de guider le design de deux essais de phase 2 et 3 chez des enfants atteints d'ostéosarcomes (*Meyers et al, 2005 et 2008*). Les résultats de ces études ont permis l'obtention d'une AMM européenne en 2008 dans le traitement des ostéosarcomes pédiatriques non-métastatiques de haut grade (*Meyers, 2009*).

3. Les cancers cutanés

a) La peau : rappels anatomo-physiopathologiques

La peau constitue la première barrière de défense de l'organisme contre les agressions externes (physiques, chimiques et biologiques). C'est l'organe le plus volumineux et le plus important du corps humain. Avec une surface moyenne de 1,75m². Il forme, avec les annexes cutanées (glandes sudoripares, follicules pilo-sébacés, ongles, cheveux) le système tégumentaire, responsable du maintien de l'homéostasie corporelle.

La peau est composée de trois couches principales superposées, de la couche la plus superficielle vers la couche la plus profonde comme suit : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Cinq fonctions principales lui sont attribuées :

1. Protection (rayonnements, brûlures, infections microbiennes...etc.)
2. Équilibre hydrique (20% des réserves en eau de l'organisme)
3. Fonction de thermorégulation (thermostat)
4. Perception, organe sensitif
5. Expression des émotions

i. L'épiderme

L'épiderme constitue la couche la plus externe, c'est un épithélium mince, pavimenteux et stratifié, constitué à 95% de kératinocytes disposés en monocouche et à 5% de mélanocytes (production de mélanine), de cellules de *Langerhans* (cellules défensives) et de cellules de *Merkel* (Figure 12). Cette couche superficielle est non vascularisée, aucun vaisseau sanguin ni

réseau lymphatique n'a été rapporté jusqu'ici, on y trouve uniquement des terminaisons nerveuses libres.

- **Les kératinocytes** : ils sont en perpétuel renouvellement, c'est à dire en remodelage morphologique permanent, et ce afin d'assurer une protection permanente de l'organisme. L'évolution de l'épiderme se fait donc de la profondeur à la superficie, permettant ainsi de distinguer quatre à cinq sous-couches, superposées.
- **Stratum basale** : couche germinative ou couche basale, composée d'une monocouche cubique au contact de la membrane basale, caractérisée par l'occurrence de plusieurs mitoses et la présence de mélanocytes, conférant ainsi à l'épiderme son rôle de barrière protectrice contre les rayonnements nocifs.
- **Stratum Spinosum** : couche à épines où l'on distingue plusieurs couches cellulaires à noyaux localement aplatis et centrés, larges ou ovales, avec une disposition en faisceaux denses des filaments intermédiaires de kératine, donnant l'aspect de processus épineux. La mitose est cependant limitée.
- **Stratum Granulosum** : couche granuleuse en une ou plusieurs strates de cellules aplaties, contenant des fibres de kératines, des *kératinosomes* et des grains de *kératohyaline*.
- **Stratum Lucidum** : couche claire qui n'est présente que dans l'épithélium muqueux, la main ainsi que la voûte plantaire.
- **Stratum Corneum** : couche cornée aussi connue sous le nom de *cornéocyte*, c'est la couche la plus superficielle, sa structure est constituée de plusieurs couches de cellules complètement aplaties, énucléées et dépourvues d'organites cytoplasmiques. On y trouve un nombre important de cellules kératinisées aux membranes plasmiques denses et épaisses qui deviennent desquamantes et migrent en surface (les *cornéocytes*) après lyse du ciment intercellulaire par la stéroïde-sulfatase.
- **Les mélanocytes** : ils ont un aspect étoilé grâce à leurs prolongements qui leur confèrent la capacité de s'insinuer entre les kératinocytes, les mélanocytes sont des cellules ovoïdes de 0,2 à 0,6µm de diamètre. Ces cellules sont identifiables en microscopie optique grâce à des marquages par immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines S100 ou HMB45. Ces cellules dérivent

de la crête neurale/ ectoderme et sont à l'origine de la couleur de la peau. Elles ont pour fonction principale la synthèse de mélanine, constituant principal de la pigmentation de la peau, de l'iris et des phanères. Les mélanocytes sont aussi capables de synthétiser de nombreuses cytokines (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , GM-CSF...etc.). Situés au niveau du pôle apical de la membrane basale de l'épiderme, ils s'intercalent en général entre les cellules de la couche basale (*stratum basale*) avec de longs prolongements s'insinuant entre les cellules de la lame basale et de l'épiderme (*Delevoye et al, 2011*).

- **Les cellules de Merkel** : d'origine inconnue, dispersées dans la couche germinative entre les kératinocytes basaux, au contact d'une terminaison nerveuse, elles sont caractérisées par de très nombreuses vésicules à centre dense entouré de halo clair. Ce sont des cellules neuroendocrines, exprimant des marqueurs neuronaux, également des mécanorécepteurs (perception).
- **Les Cellules de Langerhans** : du groupe des cellules dendritiques, elles dérivent des cellules souches hématopoïétiques et sont retrouvées dans tous les épithéliums pavimenteux stratifiés des mammifères. Dispersées entre les kératinocytes de la couche à épine de l'épiderme, elles sont caractérisées par la présence dans leur cytoplasme d'organites discoïdes ou « granules de *Birbek* » et l'expression à leur surface d'un certain nombre de marqueurs dont le CD1a, CMH I et II, des intégrines transmembranaires ainsi que le récepteur C3b. Cellules présentatrices d'antigène aux lymphocytes T, elles initient et propagent les réponses immunitaires dirigées contre les antigènes appliqués sur la peau.

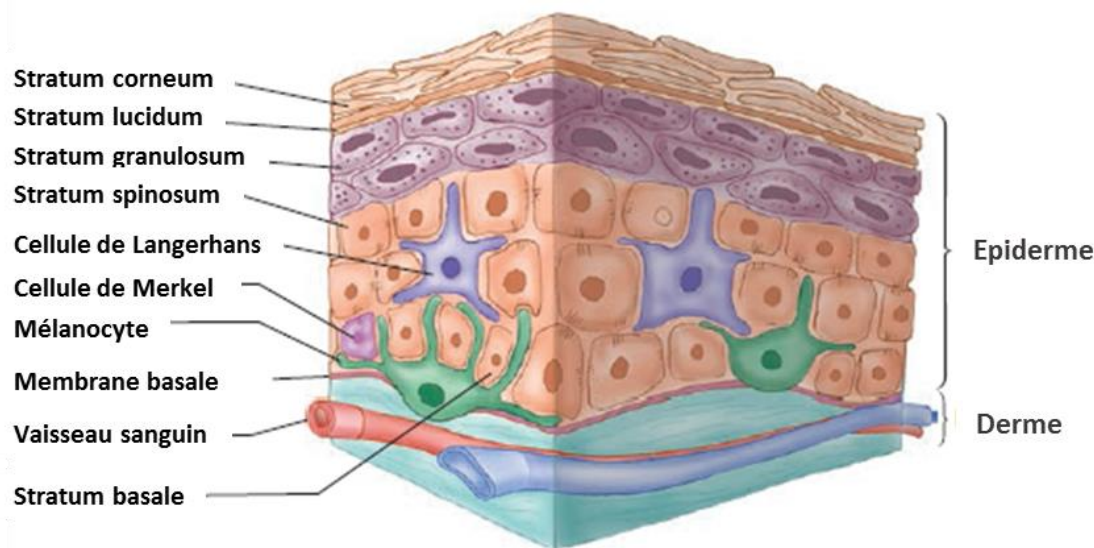


Figure 12 : Organisation histologique de la peau (*Van De Graaff et al, 1998*).

ii. Le Derme

C'est une couche intermédiaire, constituée de vaisseaux sanguins et lymphatiques avec des terminaisons nerveuses abondantes, réceptrices des sensations tactiles (corpuscules de Meissner), de froid (Kraus) et de la pression (*Pacini*). Le derme est riche en cellules immunitaires (mastocytes, histiocytes), cellules de soutien (fibroblastes) et fibres de collagène, lui conférant ainsi sa souplesse.

iii. L'Hypoderme

Il s'agit de la couche la plus profonde, riche en cellules adipeuses, en dessous de laquelle se trouve le tissu sous-cutané, la limite interne de la peau.

iv. Les muqueuses

Elles constituent une fine couche cellulaire. C'est un épithélium malpighien non-kératinisé soutenu par un chorion sous-jacent. En fonction de la spécialisation fonctionnelle du tissu,

plusieurs types ont été rapportés. Ainsi, on distingue les muqueuses labiales et jugales, contenant les glandes salivaires et richement innervées, les muqueuses linguales qui comportent les bourgeons du goût et les nombreux lobules glandulaires, salivaires, séreux et muqueux (*Gartner et al, 2013*).

b) Mécanismes de régulation de la mélanogenèse

La peau constitue un réseau d'unités épidermiques responsables de la synthèse de la mélanine, pigment principal de celle-ci, produite dans les mélanocytes et stockées dans de petites vésicules spécialisées appelées mélanosomes (*Costin et al, 2007 ; Lin et Fisher, 2007*). Cette pigmentation est soumise à une régulation complexe faisant intervenir plusieurs facteurs, intrinsèques et extrinsèques (*Park et al, 2009*). La dérégulation de ces mécanismes peut conduire à des dermatoses associées à des défauts de pigmentation (*Plensdorf et Martinez, 2009*). C'est pourquoi il est important de comprendre ces mécanismes afin de proposer des alternatives thérapeutiques aux pathologies qui y sont associées.

Les mélanocytes dérivent des mélanoblastes, ils prennent naissance au niveau de la crête neurale lors de l'embryogenèse et migrent ensuite à différents endroits dont la couche basale de l'épiderme, le follicule pileux ou encore certaines muqueuses (*Park et al, 2007*). Au niveau épidermique, chaque mélanocyte interagit avec 30 à 40 kératinocytes environ, conduisant ainsi au transfert de mélanosomes matures à ces derniers (*Park et al, 2009*). Le nombre de mélanocytes est relativement constant dans chaque groupe ethnique et n'a pas d'impact sur la couleur de la peau d'un individu. En effet, la diversité phénotypique dans la pigmentation est due au nombre de mélanosomes, leur distribution ainsi que la quantité et le type de mélanine qu'ils peuvent contenir (*Slominski et al, 2004 ; Schallreuter et al, 2008*). Il existe deux isoformes principales de mélanine, l'eumélanine et la phéomélanine. Alors que la première est un polymère insoluble de couleur sombre et brunâtre, la seconde est constituée d'une chaîne polymérique, jaune orangée, soluble, formée par conjugaison à une cystéine ou un glutathion (*Slominski et al, 2004*). L'eumélanine est présente principalement chez les individus de phototype III – VI et joue un rôle photoprotecteur efficace contre les rayonnements UV. En revanche, la phéomélanine est présente chez les individus de phototype claire, principalement I et II, et est peu efficace face aux protections UV conduisant à un risque élevé de développement de tumeurs cutanées (*Slominski et al, 2004*).

La synthèse des mélanines fait appel à un système monoenzymatique régulé par un ensemble de facteurs et cofacteurs enzymatiques. La tyrosine hydroxylase, glycoprotéine membranaire présente au niveau des mélanosomes en est le catalyseur principal. Cette enzyme est responsable de la transformation d'un substrat, le L-Tyrosine en L-DOPA (3,4 di-hydroxyphénylalanine) par hydroxylation suivie de l'oxydation de ce dernier en DOPA-quinone et enfin l'oxydation en dihydroxyindole en indole quinone (Park et al, 2009) (Figure 13). Parmi les facteurs jouant un rôle important dans la régulation de cette voie, l' α -MSH (*melanocyte stimulating hormone*) est essentielle à l'activité mélanotropique et peut augmenter le degré de pigmentation. C'est l'antagoniste principal du récepteur à la mélanocortine (MC1-R) dont le polymorphisme génétique est responsable des différences constitutives pigmentaires relatives à chaque groupe ethnique ainsi que la variabilité de réponse suite à l'exposition aux rayonnements UV (Lin et Fisher, 2007).

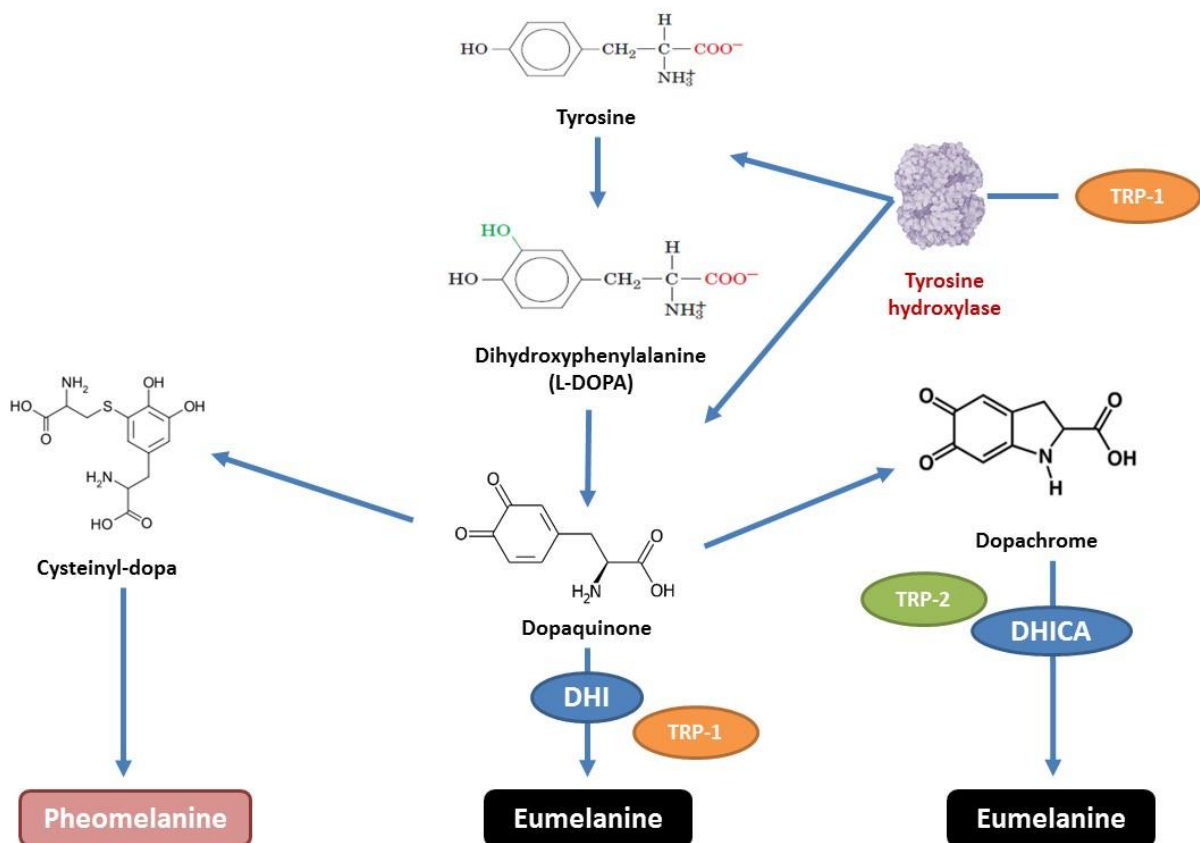


Figure 13 : Voies de biosynthèse de la mélanine. La tyrosine hydroxylase est responsable de la catalyse de la tyrosine en mélanine, qui sera, à l'issue de cette cascade métabolique stockée dans les mélanomes. Ces petites vésicules seront par la suite phagocytées par les kératinocytes au niveau de l'épiderme. La dopamine, intermédiaire de cette voie de biosynthèse, sera oxydée en *dopaquinone* puis en *dopachrome* qui sera polymérisé pour donner la mélanine. L'augmentation de l'exposition au soleil augmente cette biosynthèse (DHI : 5,6 dihydroxy-indole, DHIC : 5,6 dihydroxy-indole 2-carboxylique acid, TRP : Tyrosine Related Peptide) (adapté de Park et al, 2007).

c) Classification des cancers de la peau

Bien que le mélanome malin soit la forme la plus redoutable des carcinomes cutanés, ayant le pronostic vital le plus sombre et recensant le plus de cas d'échecs thérapeutiques et de récurrences lorsqu'il est pris au stade métastatique, il existe d'autres types de tumeurs cutanées.

Ces tumeurs peuvent être bénignes ou malignes, et présentent des types histologiques, des profils cliniques et de réponse au traitement différents et de pronostic bien plus favorable que le mélanome malin. C'est le cas par exemple de la kératose actinique, des carcinomes basocellulaires, spinocellulaires ainsi que des formes rares de carcinome cutané. L'incidence est bien plus importante chez les hommes (par rapport aux femmes) et l'âge moyen d'apparition se situe aux alentours de 50 ans. On dénombre beaucoup plus de carcinomes basocellulaires avec un ratio basocellulaire/ spinocellulaire de $\frac{3}{4}$, aussi, il est à noter qu'un traitement adapté en assure la guérison la plupart du temps.

i. Tumeurs bénignes

a. Carcinome épidermoïde *in-situ*

Aussi connu sous le nom de kératose actinique, ces tumeurs sont le plus souvent inoffensives. Ces lésions sont fréquentes et correspondent à un épaissement de la couche cornée de l'épiderme, formant ainsi un enduit kératosique adhérent. Le facteur de risque principal serait l'exposition prolongée et cumulée aux rayons UV-B nocifs (soleil, cabines de bronzage...), mais aussi le vieillissement. Le diagnostic histologique révèle une hyperkératose, une hyperélastose ainsi qu'une désorganisation des couches basales de l'épiderme, présentant des atypies nucléaires et un nombre important de mitoses.

En l'absence de traitement, ces atteintes dermatologiques peuvent évoluer rapidement en carcinome spinocellulaire dans 12 à 25% des cas.

β. Maladie de Bowen

C'est une forme peu différenciée du carcinome spinocellulaire *in-situ*, ce type histologique est sensible d'évoluer vers un carcinome infiltrant plus agressif. Elle survient principalement au

niveau des muqueuses génitales, bucco-pharyngées et conjonctives du sujet âgé, entre 60 et 65 ans en général. Elle prédisposerait selon certains auteurs au développement de cancers pulmonaires, digestifs et uro-génitaux.

Les manifestations cliniques se traduisent par des *taches lenticulaires, peu saillantes, confluentes, formant une plaque ovale ou polylobée, à limites nettes avec collerette et desquamation en périphérie. La surface est recouverte de squames jaunâtres ou grisâtres*. Les facteurs de prédisposition prouvent être d'origine toxique, iatrogène ou héréditaires. Parmi les facteurs toxiques on note l'arsenic et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) d'origine environnementale, alimentaire, médicamenteuse (*Liqueur de Fowler* dans le traitement du psoriasis) ou d'exposition professionnelle.

La PUVA-thérapie (Psoralène *per-os* + exposition aux UV-A) et les immunosuppresseurs (azathioprine dans les traitements pos-greffe) constituent les principaux facteurs iatrogènes.

Il existe plusieurs facteurs de prédisposition génétique parmi lesquels :

1. L'albinisme

C'est une affection rare provoquant un déficit congénital majeur en mélanine se traduisant par une dermosensibilité plus importante aux rayons UV.

2. L'épidermolyse verruciforme

Cette affection chromosomique récessive est une forme rare, d'origine virale (*Papilloma virus*) se manifestant cliniquement par des lésions cutanées, planes ou verruqueuses pouvant évoluer en carcinome cutané.

3. Xeroderma pigmentosum

C'est un vieillissement cutané précoce lié à une photosensibilisation importante due à un défaut de réparation de l'ADN. C'est une affection héréditaire rare, autosomique récessive, dont le diagnostic peut être établi au stade prénatal et dont les lésions précancéreuses peuvent apparaître dès le plus jeune âge (>10 ans).

4. Verrues vulgaires

Ces lésions virales sont induites par le *papilloma virus* (HPV) de type 6 le plus souvent. Elles sont auto et hétérocontagieuses et peuvent être traitées par cryothérapie à l'azote ou à l'aide de traitements kératolytiques tel que le Collodion Salicylé (association d'acide lactique, acide salicylique et de collodion élastique). Elles peuvent également disparaître en cas d'abstention thérapeutique, dans 60% des cas de 6 mois à un an après leur apparition (*Perlemuter et al, 2010*).

γ. Nævus dysplasiques ou mélanocytaires

Plus communément connus sous le terme de « grains de beauté », ils se présentent sous la forme de taches brunâtres ou noires d'un diamètre inférieur à 5mm et à bordure régulière. Ce sont des taches de naissance et pouvant apparaître jusqu'à l'âge de 30 ans, sont susceptibles d'évoluer, constituant ainsi un facteur de risque au développement de cancer cutanés (Figure 14).

Plusieurs types histologiques sont connus et ont été rapportés, c'est le cas par exemple du nævus congénital, du nævus de *Becker* ou encore du nævus de *Spitz*.

Récemment, une étude a mis en évidence le lien entre l'augmentation du nombre de nævi et une prédisposition génétique au développement d'un mélanome malin. Ainsi les personnes présentant un phénotype AMS (*Atypical Mole Syndrome* ou Syndrome du Nævus Atypique) auraient 5 à 20 fois plus de chance de développer un mélanome malin (*Gandini, Sera et al 2005 ; Bataille & Vries, 2008*).

L'autosurveillance de ces nævi est donc nécessaire. Un abécédaire a été mis en place où cinq critères principaux sont distingués :

- **A** : asymétrie
- **B** : bordure irrégulière, en carte géographique
- **C** : couleur hétérogène, polychromie
- **D** : diamètre supérieur à 6 mm de grand axe
- **E** : évolutivité

L'apparition de l'un de ces critères nécessite une consultation dermatologique et une surveillance médicale afin de prendre les précautions nécessaires au plus vite.

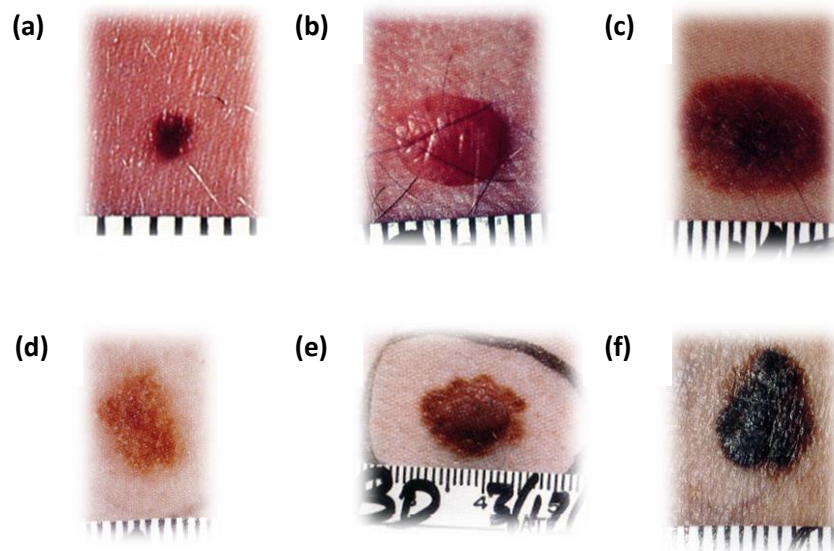


Figure 14 : Stades d'évolution d'un grain de beauté. (a) Nævus ordinaire, (b) Nævus ordinaire non pigmenté, (c) Nævus congénital (d) Nævus polychrome (e) Nævus dysplasique (f) Mélanome primitif (asymétrie, bordure irrégulière, diamètre >6 mm) (graduation en millimètres) (Poole et Guerry, 2006).

ii. Tumeurs Malignes

a. Le carcinome basocellulaire (CBC)

Cette forme est localisée le plus souvent sur le nez, ne donne jamais de métastase et survient le plus souvent sans lésions préexistantes. Sans traitement, il peut évoluer dramatiquement. Le CBC a pour origine la prolifération des cellules basales de l'épiderme, formant des lobules et des travées infiltrant le derme et reliées ou non à l'épiderme qui est souvent excorié. On observe un agencement palissadique des cellules en périphérie des lobules tumoraux et la présence d'une solution de continuité entre les lobules et le stroma.

Les lésions du carcinome basocellulaire sont peu caractéristiques, polymorphes et persistantes, d'aspect érythémateux squameux, en forme d'ébauches de perles, et pouvant évoluer vers des formes plus atypiques :

- CBC plan à bordure perlée
- CBC superficiel ou pagetoïde
- CBC nodulaire (de type solide et kystique)

- CBC pigmenté (tatoué)
- CBC ulcéreux (*uclus rodens*, *uclus terebans*)
- CBC sclerodermiforme

β. Carcinome Spinocellulaire (CSPC)

Il se développe souvent sur les demi-muqueuses (lèvres) et habituellement sur des lésions préexistantes (kératose actinique, brûlure, ulcération chronique, maladie de Bowen, radiodermite). Il peut induire des métastases ganglionnaires et/ ou viscérales, plusieurs formes :

- Ulcéro-végétant
- Bourgeonnant
- Superficiel

Le CSC est caractérisé par une prolifération des kératinocytes formant des lobules travées, infiltrant le derme et parfois les tissus sous-jacents. On remarque la présence d'ulcérations fréquentes, et le développement d'embolies vasculaires est possible. Parmi les caractéristiques histologiques les plus fréquentes, on note la présence de simples dyskératoses à l'enroulement des cellules malpighiennes mais aussi la formation de boules de kératine (globes cornés).

γ. Le Mélanome

Le mélanome malin représente la forme la plus agressive des tumeurs de la peau. Bien que rare, il ne représente qu'environ 4 à 11% des cancers dermatologiques et seulement 2% des cancers de l'épiderme, il est responsable de plus de 80% des décès par cancer cutané. Malgré l'amélioration de 50 à 80% de la survie globale à 5 ans ces vingt dernières années, son incidence ne cesse d'augmenter. C'est en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Europe occidentale et en Amérique du nord qu'elle est la plus significative, en raison de la forte densité de population à phototype clair.

Environ 7000 cas ont été rapportés en 2006 contre 11000 en 2012 en France métropolitaine avec plus de 1600 de décès liés à ces tumeurs (*American Cancer Society, 2006 ; Données épidémiologiques de l'INCA, 2014*). Le mélanome malin est une tumeur très hétérogène. De potentiel métastatique très élevé, son pronostic vital est très sombre aux stades avancés de la

maladie et une médiane de survie est observée de 6 à 12 mois. C'est pourquoi il est nécessaire de développer des outils diagnostic pour une détection et une prise en charge plus précoce.

L'origine du mot mélanome vient du grec μέλας (mélas) qui veut dire noir et κύτος (kytos), cellule. C'est une prolifération anormale des mélanocytes, cellules responsables de la synthèse de la mélanine, pigment principal de la peau.

La première référence au mélanome remonte au V^{ème} siècle av. J-C et décrit par Hippocrate. Son origine serait hypothétiquement bien plus ancienne, depuis l'Égypte antique, période à laquelle le papyrus d'*Ebers* décrit une atteinte de la peau, caractérisée par des lésions sombres et fatales au niveau de l'épiderme. Ce document constitue avec les momies Inca précolombiennes les traces les plus anciennes de la maladie (*Urteaga et al, 1996*).

La première description revient à *René Théophile Laënnec*, qui utilise le terme « mélanose » en 1806 suivie de *Robert Carswell* en 1838, qui utilise pour la première fois le terme « mélanome » (*Roguin et al, 2006 ; Rebecca et al, 2012*).

Le mélanome passe par plusieurs stades lors de son développement (Figure 15), et plusieurs sous-types histologiques ont été décrits (Tableau 2, Figure 16), c'est une classification histologique basée sur la localisation, le profil d'évolution clinique et la malignité (potentiel métastatique) est établie (*Braud et al, 2003*).

On distingue ainsi

- **Mélanome malin extensif superficiel** : caractérisée par une phase de croissance horizontale, les mélanocytes sont disposés au sein de niches, ou éparpillés de manière isolés, formant de plages pagetoïdes
- **Mélanome nodulaire** : à croissance verticale
- **Mélanome Lentigo-malin** : cellules dispersées au niveau de la jonction dermo-épidermique, les rayonnements UV jouent un rôle important dans son développement
- **Mélanome Acro-lentigineux** : cellules solitaires ou formant des foci confluents au niveau de la jonction dermo-épidermique.

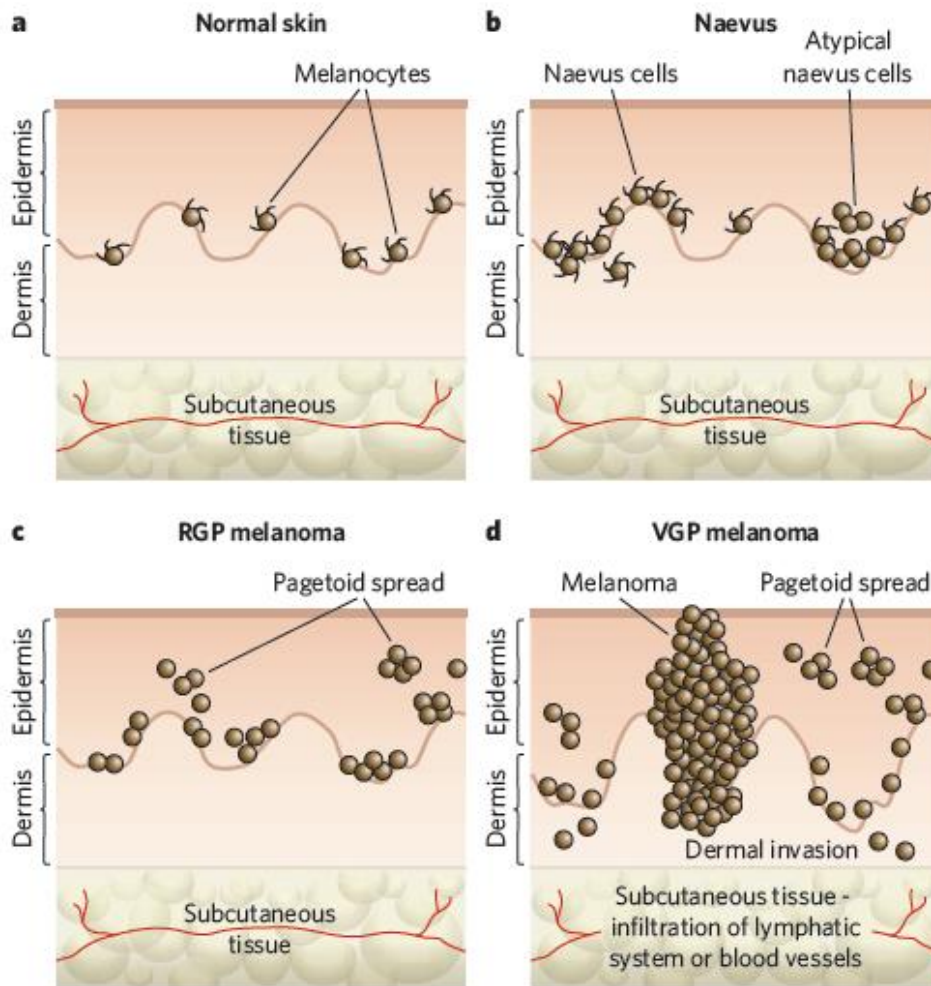


Figure 15 : Différentes étapes de la mélanomagenèse : (a) mélanocytes non-malins à la jonction dermo-épidermique (b) Nævus bénin (c) phase de croissance horizontale ou radiale (d) phase de croissance verticale (*Gray-Schopfer et al, 2007*).

Sous-type	Abréviation	Fréquence
Mélanome Malin Extensif superficiel	SSM	50 – 70%
Mélanome Nodulaire	NM	10 – 30 %
Mélanome Acrolentigineux	ALM	5%
Mélanome Lentigo Malin	LMM	< 5%
Cas non classifiables, types particuliers	-	< 5%

Tableau 2 : Les différents sous-types de mélanome selon l'organisation mondiale de la santé (OMS).

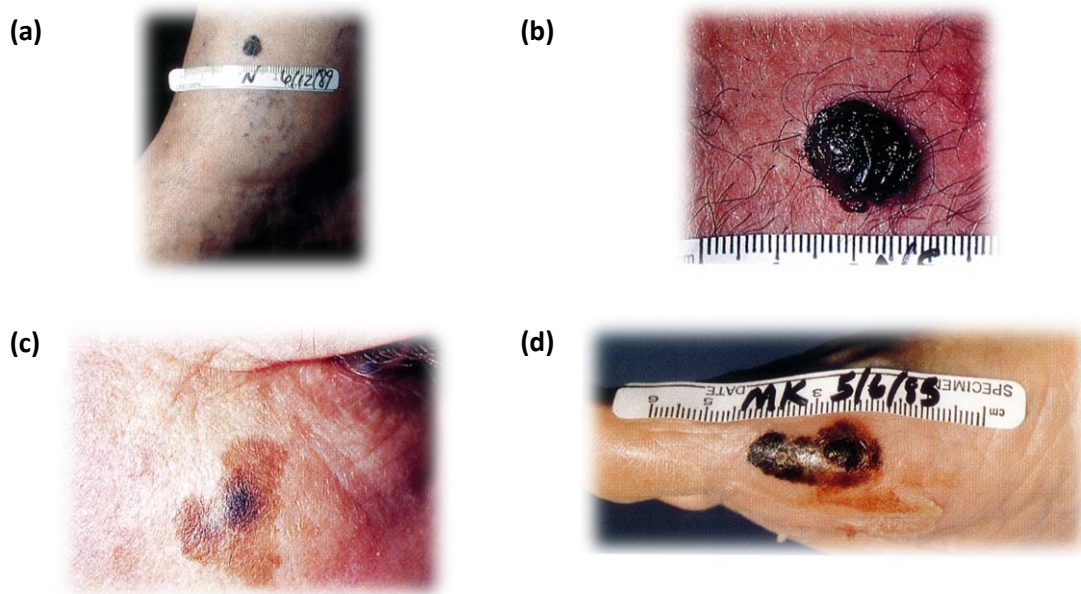


Figure 16 : Illustration des différentes formes de mélanomes (a) Mélanome malin extensif superficiel à croissance radiale (SSM) ; (b) Mélanome nodulaire à croissance verticale (NM) ; (c) Mélanome Lentigo-Malin à croissance radiale ; (d) Mélanome acro-lentigineux à croissances radiale et verticale (graduation en centimètres) (Poole et Guerry, 2006).

Différents outils moléculaires et cytologiques ont été développés afin de permettre l'évaluation et la classification de la maladie ; stades TNM (*Tumor, Node, Metastasis*), indice de **Breslow** et indice de **Clark**, permettent ainsi de déterminer de manière plus précise le stade évolutif du cancer (Figure 17, Tableau 3) (Schadendorf et al, 2015).

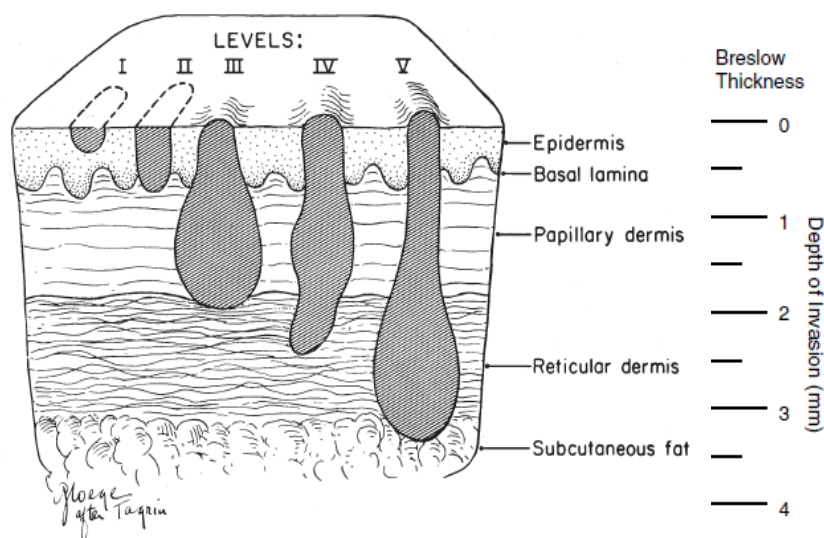


Figure 17 : Coupe verticale d'une section de la peau illustrant les outils diagnostiques et pronostiques dans la classification du mélanome malin ; indice de Breslow, sur le côté, mesurant l'épaisseur tumorale maximale et indice de Clark (I, II, III et IV) en haut, mettant en évidence le niveau d'invasion anatomique (d'après Morton et al, 2000 ; Miller et al 2006).

Stade	TNM	Critères d'évaluation
I	pT1, N0, M0	Mélanome primitif, Breslow < 0,75mm et ou Clark niv. II Primitif, Breslow entre 0,76 et 1,5 mm, Clark niv. III
	pT2, N0, M0	Absence de métastases
II	pT3, N0, M0	Mélanome primitif, Breslow > 1,5 – 4mm, Clark niv. IV Absence de métastases
III	pT4, N0, M0	Mélanome primitif, Breslow > 4mm, Clark niv. V et/ ou présence de lésions satellites à 2 cm de la tumeur primitive
	pT, N1, M0	Présence de métastases ganglionnaires, ≤ 3cm Présence de métastases ganglionnaires > 3cm
IV	pT, N, M1	Présence de métastases distantes

Tableau 3 : Classification TNM des mélanomes (D'après *Morton et al, 2000*).

δ. Modélisation du mélanome chez la souris

Le modèle syngénique B16 est parmi les outils les plus communément utilisés. Apparu dans les années 1970 suite au développement spontané de métastases de mélanome chez des souris de souches C57BL/6 (*Fidler et al, 1973*), il est largement utilisé dans l'évaluation de l'activité anti-tumorale et anti-angiogènes de certaines molécules (*Bouvard et al, 2014b ; Segoula et al, 2016*). Des modèles de xéno greffe ont également été établis et rapportés et ont guidé le développement d'un certain nombre de médicaments (*Kerbel et al, 2003 ; Quintana et al, 2012, Einarsdottir et al, 2014*). Cependant le manque de microenvironnement tumoral adapté les rendent peu fiables, c'est pourquoi il a été nécessaire de développer des stratégies alternatives afin de palier à ce problème (*Tanaka et al, 2012*).

La génération de modèles transgéniques se base sur la reproduction des lésions génétiques identifiées dans les mélanomes humains, comme par exemple l'activation d'oncogènes (modèles *Braf^{V600E}, Nras^{Q61R}, Hras^{G12V}*) (*Dankort et al, 2009 ; Dhomen et al, 2009 ; Perna et al, 2015*) ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur (*Cdkn2a/p16^{Ink4a}^{-/-}, Pten^{-/-}*) (*Chin et al, 1997 ; Sharpless et al, 2001*). Bien qu'ils présentent l'avantage d'être spontanés, dans un

système possédant un microenvironnement tumoral intact, les périodes de latence pouvant s'étendre de 9 à 12 mois constitue le frein principal lié à l'utilisation de ces modèles.

Ces modèles sont donc malheureusement peu prédictifs de la réponse d'un candidat thérapeutique chez l'homme. Ils ne peuvent apporter qu'une aide, tout au plus, pour l'amélioration de l'efficacité des candidats sélectionnés.

ε. Le Mélanome canin

Ces tumeurs représentent 3 à 4% des tumeurs cutanées et jusqu'à 7% des tumeurs malignes diagnostiquées chez le chien (*Smith et al, 2002, Dobson et al, 2013*). Hétérogènes et hautement agressives, elles sont principalement localisées au niveau de la cavité buccale. C'est une multiplication incontrôlée et anarchique des mélanocytes, cellules d'origine ectodermique et responsables de la pigmentation de la peau. Des études ont montré que les chiens présentant une pigmentation importante du pelage avaient une prédisposition beaucoup plus importante à ce type de tumeur (*Goldschmidt et al, 1985 et 1994 ; Bolon et al, 1990*).

Le site anatomique est prédictif de l'invasion locale. En effet, plusieurs localisations ont été rapportées, différenciant ainsi plusieurs formes histologiques extrêmement variables sur le plan thérapeutique et clinique. On retrouve par exemple des mélanomes oculaires (2%) et cutanés, qui sont le plus souvent bénins, ce sont des mélanocytomes qui s'apparentent au nævus chez l'homme et présentent environ 11% des cas chez le chien (*Nishiya et al, 2016*). Les mélanomes digités (8% des cas) s'apparentent aux formes accro-lentigineuses chez l'homme et présentent une survie moyenne de 42 à 57% à 12 mois et de 11 à 13% à deux ans avec des métastases rapportées dans 30 à 40% des cas au diagnostic (*Henry et al, 2005*). Enfin, les mélanomes muqueux de la cavité buccale (56%) et de la lèvre (23%) représentent les formes les plus dominantes et les plus agressives (*Smith et al, 2002 ; Gillard et al, 2014*) (Figure 18).

Malgré la différence du site de localisation avec l'homme, des similarités entre les mélanomes métastatiques canin et humain ont été rapportées, aussi bien sur le plan de l'évolution biologique que sur les plans histopathologique et clinique. Une malignité élevée et un fort potentiel métastatique sont observés dans les deux espèces (*MacEwen, 1990 ; Hicls & Flaitz, 2000 ; Porrello et al, 2006 ; Simpson et al, 2014*).

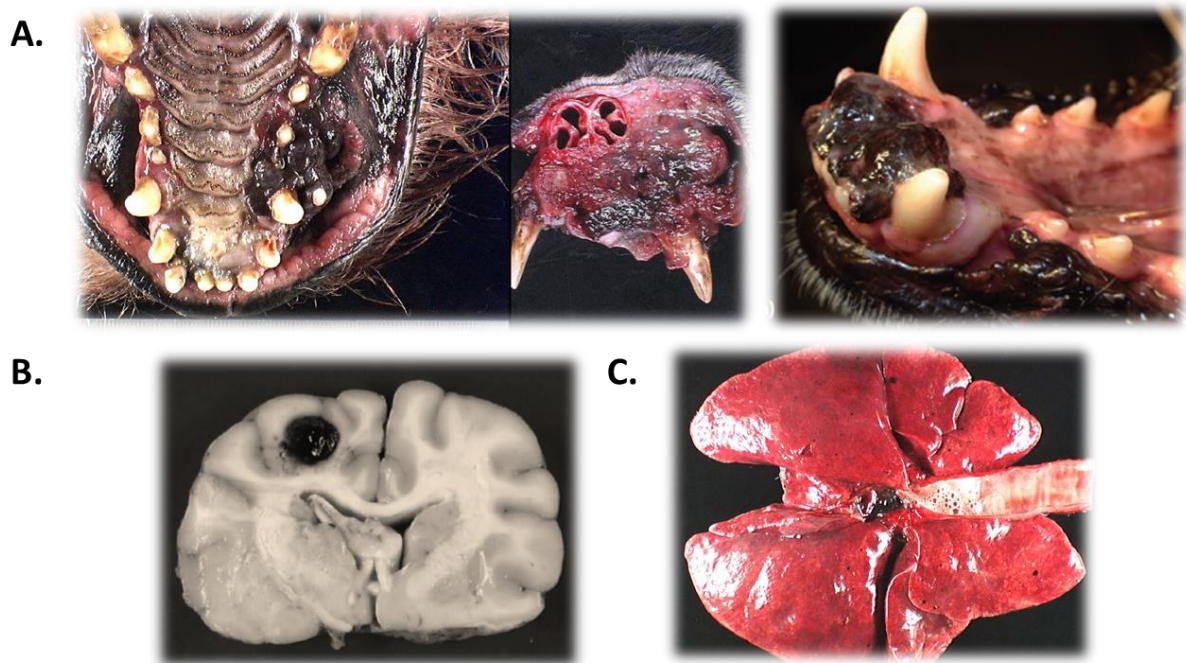


Figure 18 : Observations macroscopiques des masses buccales de mélanome canin (A) ainsi que des métastases cérébrales (B) et pulmonaires (C) (d'après *Liptak et al, 2012*).

Le mélanome muqueux constitue une forme rare mais en forte incidence chez l'homme (*Marcus et al, 2012*). Localisé principalement dans le sinus nasal (plus de 73% des cas), il a un comportement agressif, avec des rechutes fréquentes et variables selon le traitement préconisé (26 – 58%) (*Gavriel et al, 2011*) et des métastases ganglionnaires (21 – 58%) et à distance (53% des cas) (*Meleti et al, 2008*). L'altération du gène *Cdkn2a* constitue chez l'homme comme chez le chien un facteur de prédisposition important (*Gillard et al, 2014 ; Haass et al, 2010*). Alors que les mutations BRAF et NRAS sont parmi les altérations les plus fréquentes dans la forme cutanée du mélanome métastatique chez l'homme (*Goel et al, 2006*), elles sont peu fréquentes et n'ont toujours pas été mises en évidence dans le mélanome canin (*Mochizuki et al, 2015a ; Shelly et al, 2005*). Grâce à sa proximité à l'homme et la conservation des paramètres biologiques des tumeurs qu'il développe, le chien constitue aujourd'hui un des meilleurs modèles pour l'étude des formes non-uv dépendantes du mélanome métastatique (*Modiano et al, 1999 ; Starkey et al, 2005 ; Gillard et al, 2014*).

d) Moyens préventifs et traitements du mélanome

De pronostic vital très sombre, le mélanome métastatique est une tumeur radiorésistante, et bien que 45% des patients atteints reçoivent un traitement à base de rayonnement ionisant, cette

stratégie ne constitue pas l'alternative thérapeutique de choix dans le traitement du mélanome (*Barker et al, 2013*). La chirurgie reste la meilleure option pour les formes localisées, souvent précédée ou suivie d'une radiothérapie et/ ou d'une chimiothérapie. La *Dacarbazine* (DTIC) est le premier agent de chimiothérapie bien qu'aucune efficacité n'ait été démontrée sur la survie globale des patients. Le *Temozolomide* (MTIC) est lui utilisé pour les formes présentant des métastases cérébrales en raison de sa perméabilité aux barrières hémato-encéphaliques.

Ces traitements sont souvent associés à des molécules ciblant spécifiquement une voie de signalisation particulière, comme le *Vémurafenib* par exemple, dont l'efficacité a été démontrée pour les forme BRAF mutées (V600E) ou les inhibiteurs de MEK (*Garraway et al 2014*) (Figure 19).

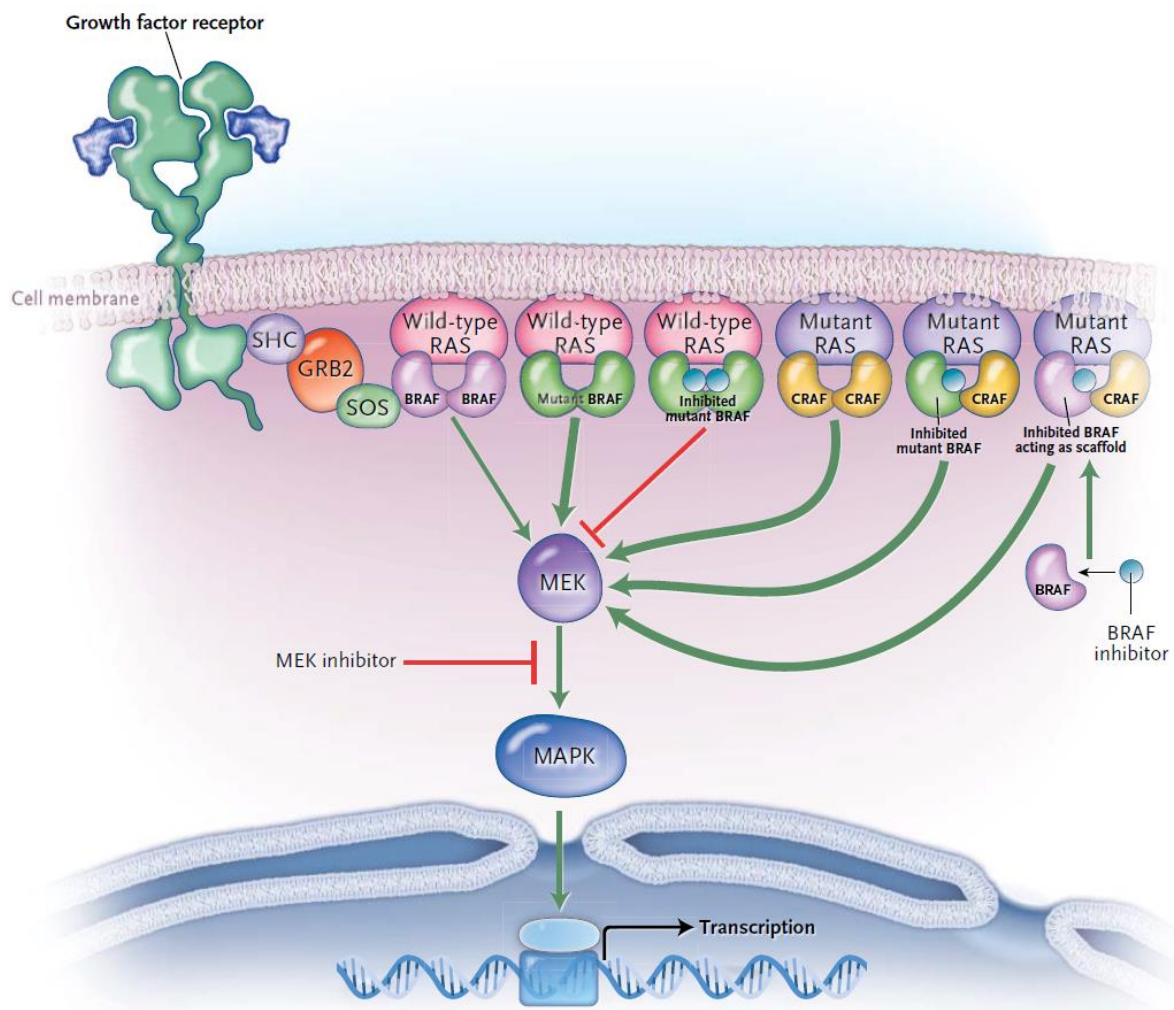


Figure 19 : Voies de signalisations et cibles thérapeutiques impliquées dans le mélanome (*Weeraratna, 2012*).

Le développement d'immunomodulateurs a permis d'améliorer considérablement la survie des patients. Parmi ces molécules on trouve les inhibiteurs de l'axe CTLA-4 (*Ipilimumab*) (*Schadendorf et al, 2015*) ou récemment les agents jouant sur la restauration de la voie de signalisation PD-1/ PD-L1 (*Nivolumab, Pembrolizumab...*) (*Gogas et al, 2013 ; Hao et al, 2014 ; Robert et al, 2014*).

Chez le chien, la chirurgie constitue le traitement le plus préconisé quand la tumeur est localisée et résectable. Le contrôle local de la tumeur est possible grâce la radiothérapie associée ou non à la chimiothérapie (*Cancedda et al, 2016*). Et même si les méthodes de fractionnement optimales n'ont pas encore été établies, l'hypofractionnement permet l'obtention de meilleurs résultats (*Bergman et al, 2013 ; Khan et al, 2011*). Ainsi, des études ont pu démontrer l'effet bénéfique de l'administration d'une dose de 6 Gy, 5 fois suivie de 60 mg/ m² de temozolomide ou du schéma 6 x 6 Gy suivies de 10 – 30 mg/ m² de cisplatine ou 90 mg/ m² de carboplatine sur la survie de chien atteint de mélanome (6,8 et 11,9 mois respectivement) (*Cancedda et al, 2016 ; Freeman et al, 2003*). En revanche, la nature agressive de ces tumeurs et leur fort taux de dissémination à distance les rendent hautement chimioresistants. Peu de bénéfices ont été rapporté quant à l'administration d'agents de chimiothérapie adjuvante à un traitement chirurgical (*Boria et al, 2004 ; Rassnick et al, 2001 ; Tuohy et al, 2014*).

Plusieurs axes de recherche se consacrent à l'étude et l'activation du système immunitaire de l'hôte dans le but d'établir une réponse anti-tumorale effective. Plusieurs études ont été rapportées chez le chien, visant principalement à activer les mécanismes de l'hôte pour une réponse anti-tumorale effective. On note l'exemple de la vaccinothérapie à base d'interféron- α (INF- α), d'interleukine-2 (IL-2) (*MacEwen et al, 1999*), d'administration intralésionnelle de BCG (*Moff et al, 1999*) ou encore l'injection de Fas-Ligand (*Bianco et al, 2003*), conduisant ainsi à une régression tumorale. Une étude récente a aussi permis l'obtention de la commercialisation d'un vaccin à base d'ADN xénogénique codant pour la tyrosinase humaine (ONCEPTTM), dans la prise en charge et l'amélioration de la survie globale des mélanomes de stades II et III chez le chien (*Bergman et al, 2008 ; Grosenbaugh et al, 2011*). Enfin, aucun essai clinique évaluant des candidats thérapeutiques visant l'axe PD-1/ PD-L1 n'a été rapporté jusqu'à ce jour en médecine vétérinaire. Une étude *in-vitro* sur des lignées de mélanome canin a cependant démontré le blocage efficace de cette interaction, à l'aide d'un anticorps monoclonal bovin, de manière dose-dépendante (*Maekawa et al, 2014 et 2016*).

Malgré ces avancées majeures, la prévention reste la meilleure option dans la lutte contre le mélanome. Des contrôles et un suivi régulier et rigoureux des nævus atypiques doivent être

systematiques en plus d'une protection contre les rayonnements solaires notamment à l'aide de crèmes et d'écrans solaires, adaptés à chaque phototype.

E. Validation clinique du modèle canin

1. Cadre éthique et réglementaire

Bien souvent distinguées, la recherche fondamentale, visant à décrypter les mécanismes d'une pathologie donnée, et la recherche appliquée qu'elle soit translationnelle ou préclinique, restent étroitement liées. En effet, elles font appel à des modèles animaux pour répondre aux questions posées.

Ces modèles tiennent une place importante en recherche et développement (R&D) car ils sont nécessaires pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques, permettant ainsi la mise en place de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques. Ils constituent ainsi le dernier rempart avant la première administration et la phase de développement clinique chez l'homme.

La R&D pharmaceutique fait appel à un grand nombre d'acteurs. C'est un secteur interdisciplinaire regroupant un large réseau de connaissances visant à déterminer les mécanismes impliqués dans la genèse de chaque pathologie, l'identification de nouvelles cibles, la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques, la formulation de nouveaux principes actifs mais aussi l'amélioration du profil pharmacocinétique de chaque candidat médicament. Elle nécessite donc des modèles d'études *in-vitro* mais aussi *in-vivo*, imposés par les instances réglementaires (Déclaration d'Helsinki) avant toute administration à l'homme d'un nouveau candidat thérapeutique. On ne peut donc s'affranchir de la recherche préclinique sur animaux avant toute administration à l'homme car elle constitue un prérequis éthique et moral, justifiable si justifiée par de fortes motivations médicales.

Le paysage éthique et réglementaire de la recherche préclinique a évolué ces dernières années. Différents concepts et courants de pensée ont façonné notre réflexion et notre regard sur la place morale de l'animal dans notre société (Figure 20).

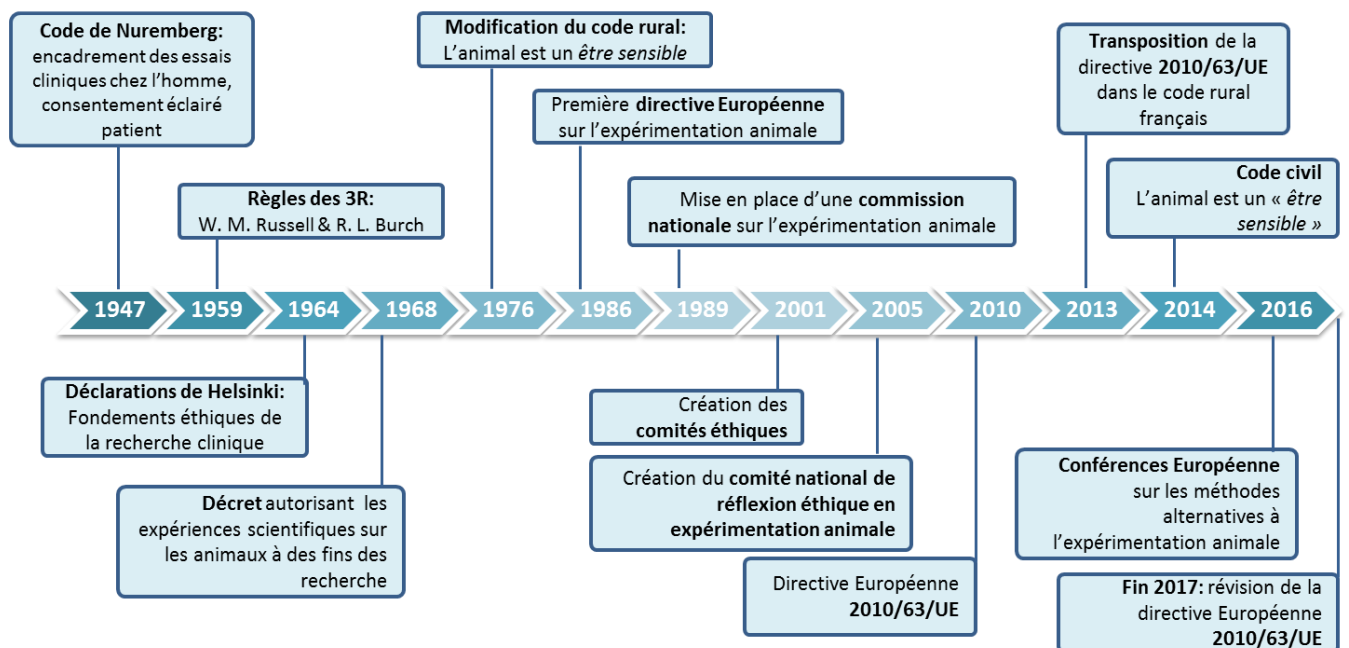


Figure 20: Etapes majeures de l'évolution du paysage réglementaire de la recherche préclinique

2. Méthodes alternatives

L'expérimentation animale fait continuellement l'objet de débats publiques et moraux depuis l'apparition du premier texte sur le bien-être animal (*Martin's Act, 1822*). Elle est aujourd'hui de plus en plus réglementée par un certain nombre de lois visant à réduire au maximum la souffrance et l'inconfort infligés aux individus (**Directive européenne 2010/63/EU**).

L'utilisation des animaux à des fins expérimentales est constamment remise en question, parmi les arguments en cette faveur, l'anatomie, la physiologie ainsi que la taille peu conservées des animaux utilisés. En effet, il a souvent été rapporté que l'homme n'est pas une souris de 70 kg et inversement. Les données ne sont donc pas assez pertinentes et significatives avec les modèles animaux standards et la valeur prédictive des résultats de la recherche sur les modèles animaux est constamment remise en question.

Les méthodes prédictives *in-silico* ne sont pas encore assez développées et complètes pour remplacer systématiquement l'expérimentation animale et la modélisation des conditions physiologiques *in-vivo* reste encore très imparfaite. De plus, la grande variabilité interindividuelle entre les différentes ethnies est impossible à évaluer dans un modèle animal de laboratoire. C'est pourquoi plusieurs équipes et consortium internationaux se sont penchés

sur l'utilisation du modèle spontané vétérinaire comme approche alternative, pouvant apporter un réel bénéfice au développement thérapeutique humain (*Khanna et al, 2009 ; Gupta et al, 2011 ; Kanna et al, 2014*) (Figure 21).

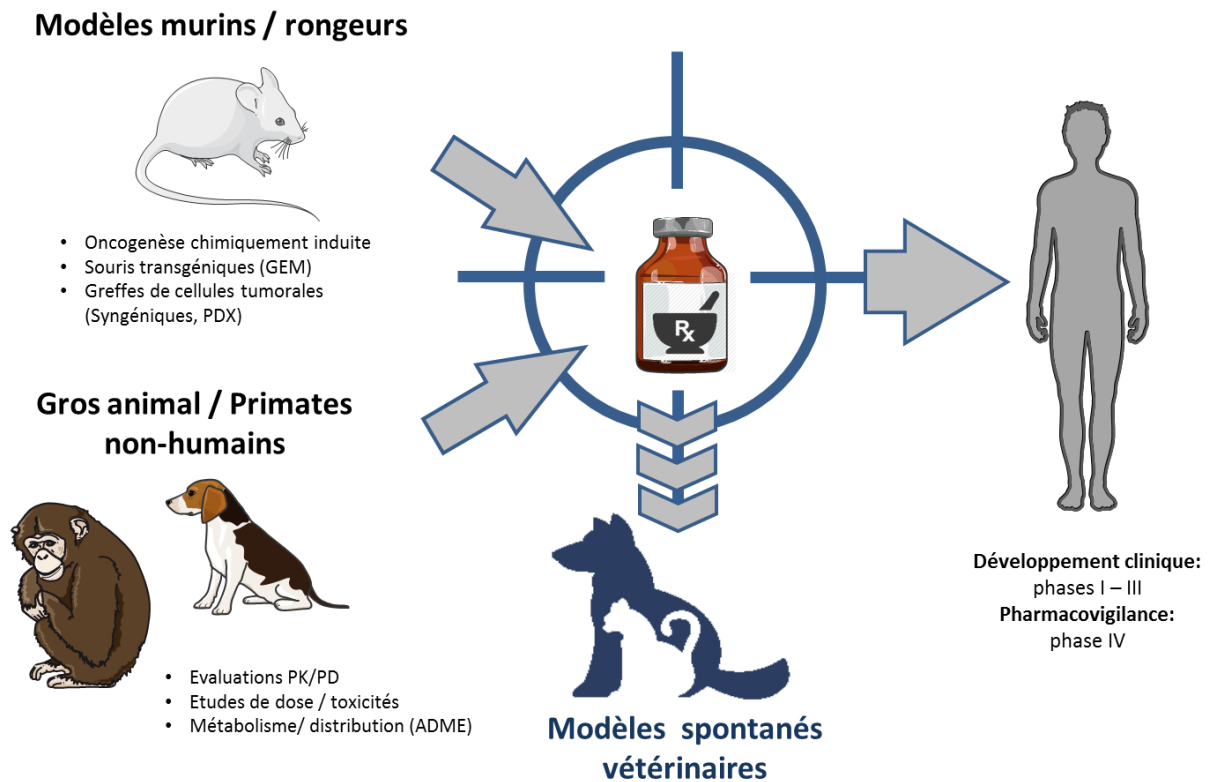


Figure 21 : Approche intégrée du modèle vétérinaire de maladie spontanée dans le développement thérapeutique standard

3. Mise en place d'essais cliniques

Le terme « essai clinique » n'a connu le jour qu'à partir de la seconde moitié du XX^{ème} siècle, quand le conseil de recherches biomédicales du Royaume-Uni (*UK Medical Research Council*) publie en 1948 un rapport d'une étude clinique sur le traitement de la tuberculose par la streptomycine. Cependant, la notion, l'idée d'une comparaison entre deux traitements en évaluant leur efficacité thérapeutique remonte à la nuit des temps. Dans son article paru en 1980, *Lilienfeld et al*, citent un exemple extrait du vieux testament de la bible, du livre de Daniel plus précisément où il est décrit une expérience comparant deux régimes alimentaires et incluant un groupe contrôle. Le célèbre chirurgien Ambroise Paré utilisait un traitement standard à base d'huile bouillante sur les plaies des soldats pendant la conquête du château de

Villaines. Alors qu'il manquait d'huile, il s'est résigné à utiliser une préparation à base de jaunes d'œufs, d'huile de rose et d'essence de térébenthine. L'efficacité du nouveau traitement est devenue évidente dès le lendemain (*Packard FR, 1921*).

Plusieurs essais cliniques sur animaux de compagnie ont permis d'apporter des informations essentielles au développement clinique humain. C'est le cas par exemple du *Masitinib* (Massivet®) et du *Toceranib* (Palladia®), deux inhibiteurs spécifiques du récepteur de tyrosine kinase ayant obtenu une AMM vétérinaire en 2008 et 2009 respectivement, pour le mastocytome canin (*London et al, 2003 et 2009 ; Mendel et al, 2003 ; Pryer et al, 2003*). Ces tumeurs surexpriment le gène KIT (*London et al, 1999*) et peuvent être, par leur profil moléculaire, apparentées aux tumeurs stromales gastro-intestinales chez l'homme (GIST : *Gastro Intestinal Stromal Tumors*) (*Gregory-Bryson et al, 2010*). Le développement de ces molécules chez le chien a donc permis la découverte de l'activité biologique des inhibiteurs de kinase dans un modèle de cancer spontané aboutissant au développement d'un équivalent pharmaceutique chez l'homme : le *Sunitinib* (Sutent®) (*Goodman et al, 2007*).

4. Challenges associés

La réglementation des essais sur animaux de compagnie reste aujourd'hui mal encadrée. Bien que l'accord préalable d'un comité d'éthique (*Baneux et al 2014*) et le consentement éclairé, écrit du propriétaire restent une obligation morale et éthique, indispensables à chaque protocole clinique, peu de textes règlementaires existent au jour d'aujourd'hui.

Même si ce domaine peine à se développer en Europe, aux Etats-Unis un ensemble de réseaux et consortiums (*COTC ou Comparative Oncology Trial Consortium*) vise à regrouper et harmoniser les pratiques de cette nouvelle discipline. En effet, les autorités compétentes américaines ont établi un ensemble de règles (**FDA Food and Drug Administration animal rule (21 CFR 314.600 et 21 CFR 601.90)**) autorisant l'utilisation de tests sur animaux comme substitut aux essais cliniques. Ces règles permettent l'évaluation de l'efficacité d'un composé chez l'animal domestique quand les investigations chez l'homme ne sont pas possibles pour des raisons éthiques ou des problèmes de faisabilité et uniquement si la molécule a démontré un apport clinique potentiel lors de tests précliniques *in vitro* et sur modèles murins. La FDA peut alors donner son accord pour démarrer les essais.

F. But de la thèse

Avant l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché de tout candidat thérapeutique en développement, les laboratoires pharmaceutiques doivent prouver à la fois son efficacité et la sécurité liée à son utilisation ou plus précisément sa balance bénéfice/ risque. Suite aux incidents thérapeutiques liés à l'utilisation du Thalidomide chez les patientes enceintes en 1968, notamment les effets fœto-toxiques et tératogènes, les lois et considérations relatives aux essais cliniques et à l'enregistrement des médicaments se sont durcis dans plusieurs pays (conférence internationale relative à l'harmonisation des essais cliniques : **Texte ICH E9**).

Les essais cliniques sont longs, coûteux et parfois sans résultats positifs pour les industriels. Et même s'ils ont permis des avancées majeures dans l'amélioration des chimiothérapies anticancéreuses (*Frei et al, 1958*), une part importante d'échecs tardifs (60%), notamment en phase II/ III est souvent rapportée. Ces résultats peuvent être expliqués par la toxicité importante des molécules utilisées en cancérologie mais aussi par le manque de prédictivité des modèles utilisés en phase de développement préclinique. C'est pourquoi un nombre important de travaux de recherche sont aujourd'hui en faveur de l'utilisation des modèles de cancers d'apparition spontanée comme nouvelle approche dans l'amélioration du développement thérapeutique à visée humaine.

Le but de ce travail de thèse a donc été dans un premier temps, la validation préclinique de cette approche par la mise en place de modèles *in-vitro* cellulaires et *in-vivo* murins, ainsi que par la caractérisation phénotypique, pharmacologique, et génomique de ces derniers. Nous avons donc mis en place, à partir de prélèvements tumoraux issus de chiens atteints de mélanomes spontanés, deux modèles cellulaires canins de mélanome et des modèles de xéno greffes associés. Ces modèles ont par la suite été caractérisés sur les plans histologique, génétique et pharmacologique. L'identification de cellules souches tumorales ainsi que des marqueurs associés à l'immuno-échappement ont également été mis en évidence, permettant par la suite l'étude de molécules ciblant spécifiquement ces axes dans le développement et la progression du mélanome métastatique.

Souvent toxiques et peu efficaces, les approches thérapeutiques faisant appel à des agents alkylants, génotoxiques et autres poisons du fuseau présentent toujours un intérêt clinique potentiel (*Penna et al, 2017*). Une des caractéristiques principales d'une cellule cancéreuse est la perte du contrôle du cycle cellulaire, mais aussi la résistance et l'échappement au traitement

par l'acquisition de mutation au cours des cycles de chimiothérapie. C'est pourquoi il est nécessaire de recourir à la combinaison de traitements pour augmenter les chances d'éradication de la maladie. Nous nous sommes donc intéressés dans la deuxième partie de ce travail à l'évaluation d'inhibiteurs de polymérisation de la tubuline dans les modèles cellulaires de mélanomes canins préalablement établis. Une série de molécules a été synthétisée au laboratoire de chimie organique de l'équipe *Onco et Neurochimie* de l'UMR-S 1172, à partir du composé ABT-751 (Annexe F). A la suite d'un criblage moléculaire sur un ensemble de lignées cellulaires, deux composés ont été sélectionnés dont l'un présentant une activité inhibitrice importante sur la croissance et la prolifération cellulaires (Figure 22).

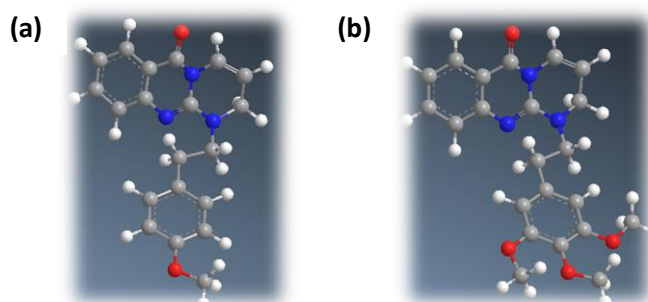


Figure 22: Structures chimiques des composés 16a (a) et 16c (b)

L'activité pharmacologique des candidats sélectionnés a ensuite été évaluée grâce à une batterie de tests *in-vitro* et *in-vivo*, sur un ensemble de modèles cellulaires ainsi que des modèles animaux. Les molécules ont été testées sur la lignée de mélanome humain Sk-Mel28, les lignées établies de mélanomes canins ainsi qu'un modèle syngénique murin de mélanome (modèle B16). Les résultats obtenus montrent un effet significatif du composé 16a par rapport à la molécule ABT-751 sur le cycle, la croissance et la prolifération cellulaire *in-vitro* ainsi que la tumorigenèse *in-vivo* (Segoula *et al*, 2016). L'évaluation préalable de l'activité biologique de ces composés et les résultats obtenus permettront par la suite la mise en place d'une étude clinique sur des animaux atteints de cancers spontanés. Ces études chez le chien devraient permettre de guider le développement clinique de ces candidats chez l'homme en établissant préalablement le profil pharmacocinétique, l'efficacité thérapeutique ainsi que des éventuelles toxicités liés à l'utilisation de ces molécules.

MATERIEL ET METHODES

A. Modèles d'étude

1. Modèles cellulaires

a. Lignées cellulaires de mélanome

En plus des lignées mélanocytaires malignes humaines *Sk-Mel 28* (ATCC® HTB-72) et *A375* (ATCC® CRL-1619) (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia, USA), des lignées canines de mélanome ont été utilisées. Tous les modèles ainsi mis en place au cours de ce projet de recherche dérivent principalement de deux prélèvements d'exérèse chirurgicale de mélanome malin. Le premier échantillon a été obtenu à partir d'une masse buccale d'un yorkshire de 14 ans, Dolly (lignées *cMeX*). A l'examen clinique, le chien présentait une lésion mandibulaire débutant sur la face palatine, non-ulcérée, fortement pigmentée et sans envahissement. L'examen radiologique n'a montré aucune lésion métastatique distante et le compte rendu anatomopathologique a conclu à un mélanome malin buccal avec métastase ganglionnaire (**Annexe A**). La deuxième biopsie est issue d'un berger allemand de 11 ans, Tania (lignées *cDuP* et *cDuX*) présentant une masse gingivale et labiale sur la commissure gingivale gauche. Le diagnostic d'un mélanome malin labial a été validé par une analyse anatomopathologique (**Annexe B**) et l'examen radiologique a permis de mettre en évidence une adénopathie mandibulaire volumineuse ainsi que la présence de nodules au niveau du thorax ayant évolué et envahi le système nerveux central six mois après l'initiation du traitement (Figure 23).

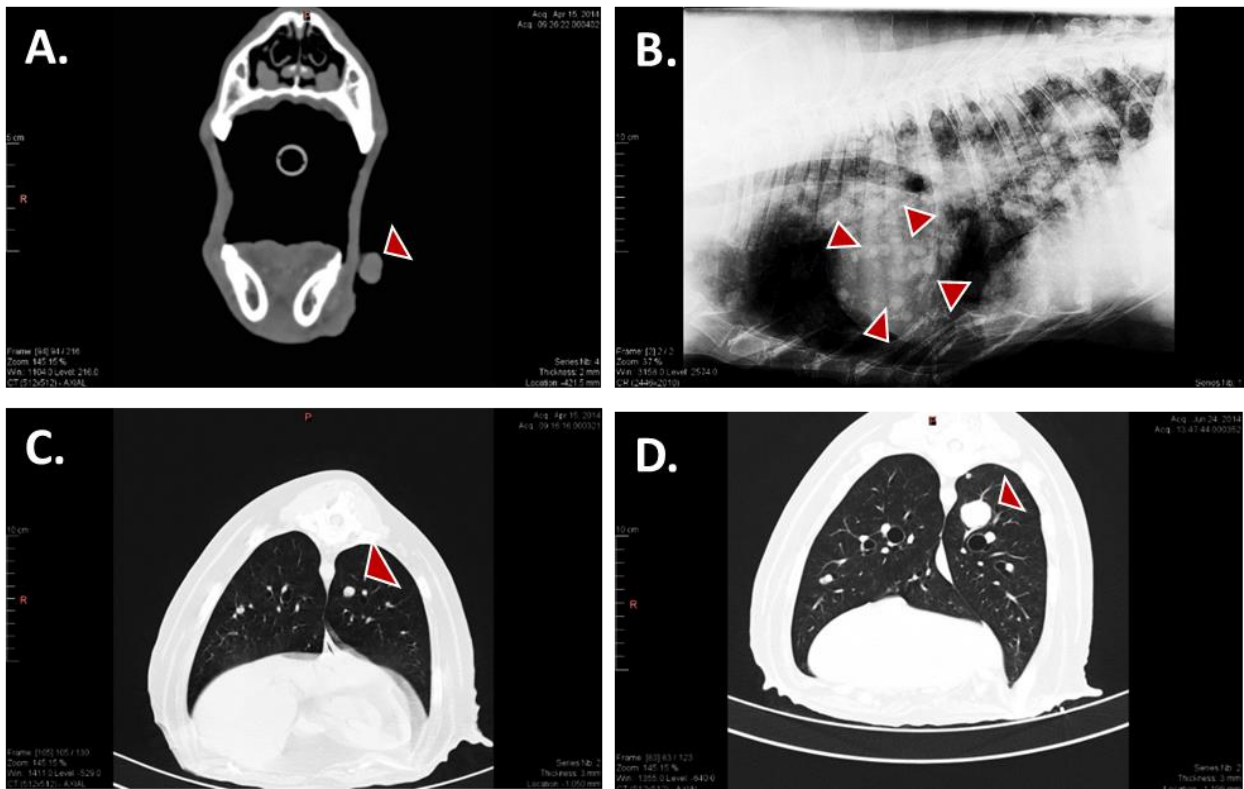


Figure 23 : Bilan radiographique et tomodensitométrique montrant un nodule gingival à la commissure labiale gauche (flèche rouge) (A) et une radiographie latérale indiquant la présence de lésions métastatiques au niveau du thorax (B) ainsi que leurs évolution trois (C) et six mois (D) après le diagnostic.

b. Lignée cellulaire NK92

Cette lignée a été établie à partir d'un prélèvement humain d'un patient d'une cinquantaine d'année atteint d'un lymphome non-hodgkinien (*Gong et al, 1994*). Elle présente des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles spécifiques des cellules *natural killer* (NK) activées, et a servi de contrôle positif dans ce projet pour la mise en place d'un test fonctionnel de lyse cellulaire médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL).

2. Modèles animaux

Ce travail a été réalisé sur des souris immunodéficientes, de souche *Scid Hairless Outbred* (SHO-nude mice). Les animaux sont maintenus en isolateurs, obtenus par décontamination indemnes d'agents pathogènes spécifiques et de micro-organismes opportunistes (SOPF : *Specific Opportunistic and Pathogen Free*). Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec la directive du parlement Européen relative à la protection animale (*European parliament directive 2010/63/EU*).

Basé sur des modèles de xénogreffes, établis et validés en médecine humaine, le principe consiste à greffer à partir d'un prélèvement sanguin ou tissulaire issu de patient atteint de mélanome, par voie sous-cutanée, les cellules tumorales après purification.

Afin de purifier les cellules tumorales, les prélèvements de mélanome métastatique canin issus de l'exérèse chirurgicale sont dilacérés mécaniquement à l'aide de ciseaux et de scalpels puis digérés pendant 2h à la collagénase I (2mg/ mL) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) à 37°C. Une suspension cellulaire est préparée à une concentration de 10^7 cellules/ mL dans du PBS sans calcium ni magnésium, filtrée sur une membrane en nylon de 70 μ m (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) avant d'être conservée à 4°C jusqu'à l'injection. A l'aide d'une seringue à insuline et d'une aiguille 25G (Terumo, Shibuya, Tokyo, Japon), 200 μ L de cette suspension sont ensuite administrés par voie sous-cutanée et au niveau du site inter-scapulaire de souris femelles âgées de 12 semaines (20-25 g) (n=5 dans chaque groupe). La croissance tumorale est évaluée tous les 3 à 4 jours par la technique de mesure de Vernier à l'aide d'un pied à coulisse. Le volume tumoral est obtenu grâce à la formule d'approximation : $0,5 \times L \times l^2$ (L : longueur, l : largeur).

Lorsque les tumeurs atteignent un volume d'environ 2000 mm³, les souris sont mises à mort et les tumeurs prélevées, dilacérées mécaniquement et enzymatiquement à la collagénase et les cellules sont mises en culture dans du milieu complet (RPMI 1640) supplémenté en facteurs de croissance (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Une partie de ces tumeurs est conservée dans du formol et/ ou dans une solution de *RNA later*® (Ambion, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) puis conservées à -80°C, pour les analyses ultérieures.

B. Méthodes d'étude et d'analyse

1. Culture cellulaire

a. Culture des lignées de mélanome

Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplémenté en glutamine 2mM et complété avec 10% de SVF (sérum de veau foetal), 1mM de pyruvate de sodium (Gibco®) et 1% d'antibiotiques (Pénicilline : 50 UI/mL /Streptomycine : 50 µg/mL) dans une étuve à 37°C enrichie en CO₂ (5%) et sous atmosphère humide. Lorsqu'elles sont à confluence, les cellules sont décollées à la trypsine (0,05% Trypsin-EDTA, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) puisensemencées dans des nouvelles flasques ou conservées à -130°C en azote liquide dans une solution composée de 95% de milieu complet et 5% de DMSO (v/v) (95/5).

b. Culture des lignées NK92

Ces cellules issues de la banque ATCC® (CRL2407) ont été cultivées selon les recommandations du fournisseur. Les ampoules ont été décongelées à 37°C au bain marie pendant 2 minutes puis rapidement transférées dans un tube Falcon 15 mL (Corning, Corning, NY, USA) et lavées deux fois avec 9 mL de milieu complet, composé de MEM-alpha (minimum essential medium – alpha, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) additionné de 2 mM en glutamine, 1,5 g de bicarbonate de sodium, 0,1 mM de β-mercaptoethanol et 25% de sérum (12,5% de SVF et 12,5% de Sérum de cheval,). Les cellules sont ensuite reprises à une concentration finale de 4×10^5 unités/ mL et cultivées dans des flasques de 25 cm² (Corning, Corning, NY, USA) et incubées à 37°C à l'étuve, sous atmosphère humide et 5% de CO₂.

c. Expansion et purification de lymphocytes T cytotoxiques

Afin de prévenir tout phénomène de coagulation, les prélèvements sanguins issus de donneurs sains sont réalisés sur tube EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) (Vacutainer™, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). A partir de ces échantillons, les cellules périphériques mononucléées (PBMC) sont isolées en fonction de leur densité par un gradient

de Ficoll (densité = 1,073) (Pancoll). Brièvement, le sang récupéré est dilué à un volume final de 30 mL avec du PBS puis ajouté délicatement le long de la paroi d'un tube de 50 mL auquel ont été préalablement ajoutés 15 mL de Ficoll. Après 30 minutes de centrifugation à 400g, sans accélération ni frein, la couche supérieure correspondant au plasma est éliminée et l'anneau cellulaire d'intérêt est récupéré et transféré dans des tubes de 15 mL.

Les cellules sont lavées plusieurs fois au PBS et les érythrocytes sont lysés à l'aide d'un tampon spécifique à un pH de 7,4 composé de de NH_4Cl (1,5 M), de KHCO_3 (100 mM), de Na_2EDTA (10 mM), d'HCl et d'hydroxyde de soude (NaOH) à 1N.

Après comptage, les cellules sontensemencées à une concentration finale de 1×10^6 cellules par mL en plaques 24 (P24) puits dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) supplémenté avec 20% de SVF, 2,5% d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) et 1% d'antibiotiques (Pénicilline : 50 UI/mL /Streptomycine : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) puis stimulées sur la nuit à l'étuve (37°C et 5% de CO_2 sous atmosphère contrôlée humide) en présence d'interféron gamma recombinant canin (*INF γ* , R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA).

Les monocytes sont éliminés par adhésion à la plaque et les surnageants sont récupérés, centrifugés à 130 g pendant 5 minutes puis rincés plusieurs fois au PBS avant d'être resuspendus dans du milieu complet dans lequel sont ajoutés 200 à 300 Unités / mL d'interleukine 2 recombinante de chien (*IL-2*, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA *1815-CL*) et 50 mM de β -mercaptoethanol ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Enfin, les cellules sont ajoutées à une concentration allant de 10^6 à $2,5 \times 10^6$ cellules par puit en P24 et incubées à 37°C et 5% de CO_2 .

Le milieu est changé tous les 2 à 3 jours et les cellules sont caractérisées phénotypiquement par cytométrie en flux pour une liste d'antigènes définie dans la littérature ([Dudley et al, 2003](#) ; [Lamers et al, 2002](#) ; [Gauthier et al, 2005](#) ; [Graves et al, 2011](#) ; [Rütgen et al, 2010](#)). Les marquages sont effectués ainsi : 1 à 5×10^5 cellules sont culotées et lavées deux fois au PBS additionné de 1% de BSA. Les culots sont ensuite repris dans 100 μL d'une solution de saturation composée d'un mélange de Fc-block humain, murin et de sérum canin ; l'ensemble est incubé 15 min à 4°C afin de s'affranchir de toute réaction non-spécifique.

Après un rinçage au PBS, 1% BSA, les cellules sont incubées en présence de l'anticorps primaire ou de l'isotype contrôle (Tableau 4) 30 minutes à 4°C puis lavées, centrifugées,

resuspendues dans 500 μ L de PBS et analysées au cytomètre (Cyan ADP, Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Marqueur	Clone	Isotype	Couplage	dilution
CD3	CA17.2A12	mIgG1 (souris)	FITC	1/ 25
CD4	YKIX302.9	rIgG2a (rat)	APC	1/ 10
CD8	YCATE 55.9	rIgG1 (rat)	PE	1/ 5
CD45RA	YKIX753.22.2	rIgG2a (rat)	RPE	1/ 25
Thy-1 (CD90)	YKIX337.217	rIgG2b (rat)	PE	1/ 50
CMH-II (HLA-DR)	YKIX334.2	rIgG2a (rat)	FITC	1/ 50
CD25	P4A10	mIgG1 (souris)	FITC	1/ 10
CD161	B199.2	mIgG1 (souris)	FITC	1/ 10
CD57	TB01	mIgM (souris)	FITC	1/ 10

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour la caractérisation des PBMCs

2. Mesure de la croissance cellulaire

A t_0 , 10^5 cellules ont été cultivées dans 4 mL de milieu complet dans des boîtes de pétri de 60 mm de diamètre. Les cellules ont ensuite été décollées à la trypsine (0.25% EDTA) puis comptées en cellules de Kova (Kova, Garden Grove, CA, USA) et en duplicats. Le point de doublement pour chaque lignée établie a été déterminé comme suit : $1 / [3.32 (\log_{10} NH - \log_{10} NI) / (t_2 - t_1)]$ (t_1 = temps en heures à l'ensemencement ; t_2 = temps en heures à la trypsinisation ; NI = nombre de cellules ensemencées ; NH = nombre de cellules récupérées après trypsinisation) (Rütgen *et al* 2010 et 2012).

3. Analyse du cycle cellulaire

Les cellules sont ensemencées à J_{-1} dans des plaques 6 puits à une concentration de 10^5 cellules/puits et les drogues sont appliquées à J_0 . Les cellules sont décollées à la trypsine, 0,25% EDTA et rincées deux fois au PBS avant d'être suspendues dans de l'éthanol froid 70% et conservées à -20°C jusqu'à l'analyse. L'étude du cycle cellulaire est réalisée par le biais d'un marquage à l'iodure de propidium (IP). Les cellules sont incubées 30 minutes à température ambiante dans une solution de PBS contenant 50 $\mu\text{g/mL}$ d'IP et 5 $\mu\text{g/mL}$ de RNase, puis conservées dans la glace jusqu'à leur passage au cytomètre (CyAN ADP, Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

4. Etude de la viabilité, de la prolifération cellulaire et de la cytotoxicité

a. Test Annexine V / IP

Le principe de cette méthode repose sur les propriétés membranaires et la notion de mosaïque fluide. Ainsi, les phosphatidylsérines, protéines entrant dans la composition de la barrière cytoplasmique, normalement localisées au niveau de la face interne d'une cellule non-apoptotique, se retrouvent délocalisées et exprimées des deux côtés de la membrane dès lors que la cellule bascule vers un état apoptotique, suite à la perte de l'asymétrie membranaire. Ayant une forte affinité pour ces protéines, l'annexine va donc lier les phosphatidylsérine et ainsi marquer les cellules apoptotiques (Figure 24).

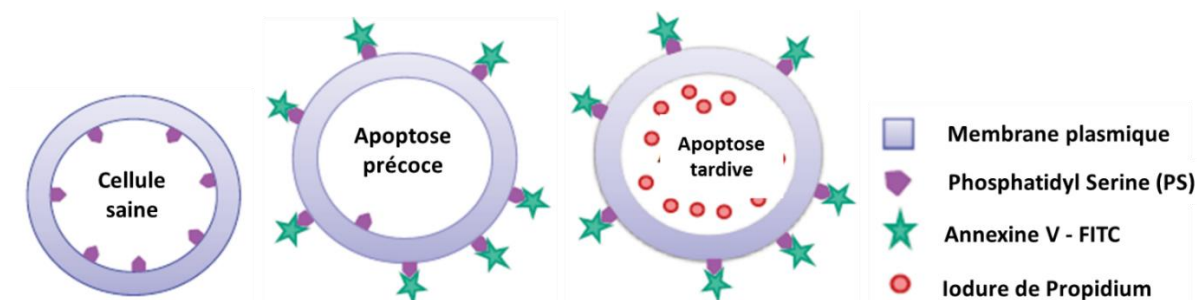


Figure 24 : Les différentes étapes de la mort cellulaire

Les cellules nécrotiques sont également marquées par l'annexine, c'est pourquoi il est nécessaire de les différencier des cellules en apoptose. Pour cela il nous a suffi de réaliser un double marquage à l'aide d'iodure de propidium (IP), molécule ayant la capacité de ne pénétrer que les cellules nécrotiques en raison de la rupture membranaire.

Le marquage a été réalisé dans le respect des recommandations fournies par le fabricant (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Les cellules sont rincées deux fois au PBS et 10^6 cellules sont reprises dans 1 mL de tampon de liaison (*binding buffer*). De cette solution, 100 μ L soit 105 cellules sont transférés dans quatre tubes de cytométrie différents

- **Tube 1** : aucun marquage, auto-fluorescence cellulaire
- **Tube 2** : cellules marquées avec 5 μ L d'annexine V seule
- **Tube 3** : cellules marquées avec 0,5 μ g d'IP
- **Tube 4** : double marquage Annexine V /IP

L'ensemble des tubes est incubé 15 min à l'obscurité et à température ambiante. Enfin, 400 μ L de PBS, 1% BSA sont ajoutés à chaque tube et les cellules sont passées au cytomètre (CyAN ADP, Beckman Coulter®).

b. Test MTS

Le test MTS, avec le test MTT, représentent les dosages colorimétriques les plus utilisés en criblage moléculaire de nouvelles substances pharmacologiquement actives. Cette technique se base sur la bioréduction d'un substrat [S] photosensible par les cellules vivantes, catalysant ainsi un produit [P] qui va émettre une fluorescence à 490 nm. Contrairement au MTT, le MTS a l'avantage de ne pas produire des cristaux de formazan aboutissant à un précipité en fond de plaque, évitant ainsi une étape de suspension (Figure 25).

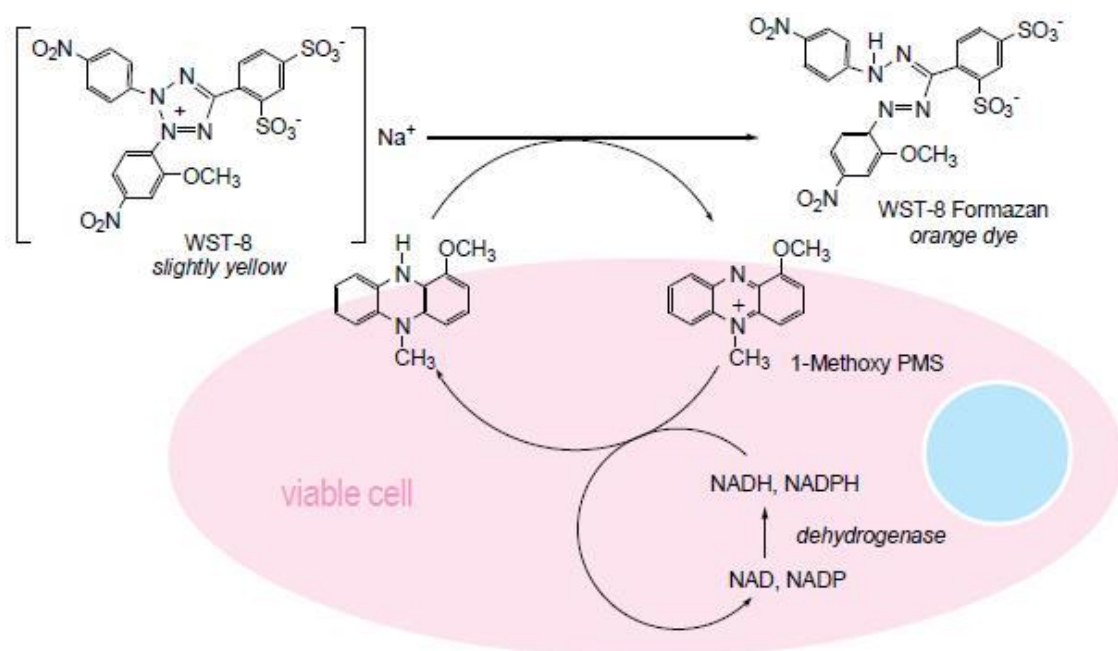


Figure 25 : Structure et biotransformation du MTS

Les cellules sontensemencées en plaques 96-puits, à une concentration de 5 à 15000 cellules par puits dans un volume final de 80 μ L. Elles sont ensuite incubées pendant 24 à 72h en présence et en absence des molécules à tester, et à une gamme de concentration allant de 10⁻⁹ à 10⁻⁴ M.

Les effets antiprolifératifs et toxiques sont évalués par l'ajout de sels de tetrazolium ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium ; MTS, CellTiter 96® AQueous One, Promega, Madison, WI, USA), molécule qui a la capacité d'être réduite au niveau de la chaîne mitochondriale des cellules vivantes, et dont la biotransformation émet une fluorescence à 490 nm, qui sera quantifiée au spectrophotomètre (Spectramax i3, Molecular Devices™, Sunnyvale, CA, USA).

c. Etude de la mort cellulaire

Le processus de mort cellulaire programmée, aussi connu sous le terme d'apoptose, tient une place importante dans la régulation de l'homéostasie cellulaire et tissulaire.

Les cellules immunitaires (*Cellules T et Cellules NK*) ont la capacité d'induire, par l'intermédiaire de récepteurs ou de voies d'exocytoses granulaires (*granzymes B, perforines...*) la mort des cellules malignes.

L'évaluation de la mort cellulaire médiée par les cellules effectrices (NK92, CTL...) a été réalisée par cytométrie de flux à l'aide du test *Phiphilux G1D2* (OncoImmunin, Gaithersbury, MD, USA).

Cette méthode rapide à mettre en place permet l'évaluation quantitative des phases précoces du processus de mort cellulaire via le clivage d'un substrat fluorescent par les caspases.

Ces protéines constituent une classe importante de protéases à cystéine, acide aminé nucléophile permettant la cassure des liaisons peptidiques après un résidu aspartate. Plusieurs membres ayant des structures et des fonctions distinctes ont été identifiés (Figure 26).

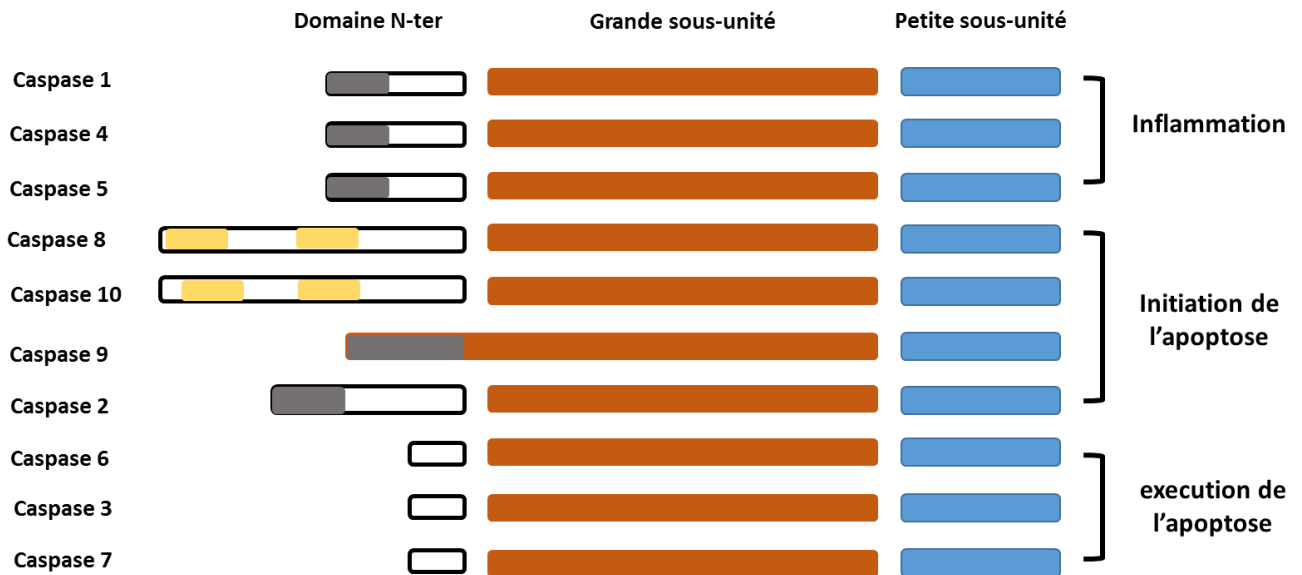


Figure 26 : Représentation schématique et fonctions des protéines caspases. La structure de base est composée de deux sous-unités et un domaine N-terminal. Deux motifs pro-peptidiques ont été identifiés, de même qu'un motif responsable du recrutement (CARD, en gris) et un effecteur de mort (DED, en jaune) (adapté de *Stennicke et al, 1998*).

Nous nous sommes intéressés principalement à l'évaluation de l'activité de l'isoforme 3, responsable de l'exécution du processus apoptotique. C'est grâce à un substrat fluorescent composé de 18 acides aminés et au sein duquel la séquence peptidique signal **DEVDGI** a été intégrée, permet un ciblage spécifique de l'activité de cette enzyme.

L'évaluation dans les cellules vivantes de l'activité intracellulaire des caspases 3 et des activités caspase-3 like a été réalisée par cytométrie en flux. Le substrat clivable est couplé via une liaison covalente à un fluorochrome, situé en amont du site de coupure afin d'éviter toute interférence de ce dernier avec l'activité protéolytique de l'enzyme.

d. Etude de la migration cellulaire par la technique de blessure ou « wound healing »

Cette technique vise à évaluer la capacité des cellules à proliférer et envahir un tissu ou réparer une zone lésée. Les cellules sontensemencées sur plaque 24 puits à une concentration de 10^5 cellules/puits et mises en culture dans du milieu complet (RPMI, 10% SVF, pénicilline/streptomycine) à l'étuve à 37°C et 5% de CO₂. La blessure est réalisée à sec, le long d'un repère tracé sur la boîte, à l'aide d'un cône de 200 µL lorsque les cellules sont à confluence. Un millilitre de milieu de culture avec et sans molécule à tester est ajouté à chaque puits et les cellules sont remises à l'étuve. A 3, 6 et 9 heures post blessure, des photos de chaque puits sont

prises au microscope, en triplicats et la réparation de la blessure est évaluée par la mesure de la surface lésée à l'aide du logiciel Image J. Les résultats sont exprimés en % de surface réparée et normalisés par rapport au niveau basal, correspondant à la surface lésée au moment de la blessure (*Moreno-Bueno et al, 2009*).

e. Mesure ex-vivo de la protéine γ H2AX par cytométrie

L'évaluation *ex-vivo* des niveaux de phosphorylation de l'histone H2AX (γ H2AX) permet la mesure du processus de réparation de l'ADN induit par les cassures doubles brin, produites par les topoisomérases de type II. Les niveaux d'isoformes H2AX phosphorylées ont été quantifiés par cytométrie de flux e en suivant un protocole adapté à partir des travaux de *Huang et al (2006)*. Des ponctions à l'aiguille fine ont été réalisées avant, 2h et 4h après induction du traitement. Après purification, les cellules ont été fixées en présence d'une solution de formaline 2% avant d'être perméabilisées avec de l'éthanol 70° froid, 2h à -20°C. Les échantillons sont ensuite réhydratés dans une solution de PBS additionné de 4% de SVF et 0,1% de triton X-100 puis rincés au PBS, 1% BSA. Le marquage nucléaire de la protéine H2AX a été réalisé à l'aide de l'anticorps anti-gamma H2AX (*rabbit anti-canine, NB100-384 ; Novus biologicals*) suivi d'un marquage secondaire (*Cy5-goat anti-rabbit IgG, A10931 ; Invitrogen Life Technologies*).

5. Analyses microscopiques

a. Analyse Cytologique

Les caractéristiques morphologiques de chaque lignée établie ont été évaluées par un anatomopathologiste vétérinaire. A partir d'une suspension cellulaire, les échantillons sont transférés sur des lames de microscope par centrifugation, 10 minutes à une vitesse de 1000 rpm. Les échantillons ont ensuite été colorés à l'aide d'une solution MGG (*May-Grünwald Giemsa*) par vaporisation dans un colorateur automatique (*Aerospray® Haematology prostainer, ELITech Group, France*).

b. Par Immunohistochimie (IHC)

Après fixation dans une solution de 10% de formol, les échantillons sont inclus en bloc de paraffine pour les études histologiques. Les marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur des coupes de 4 à 6 μ m d'épaisseur dans un automate Disxcovery XT (*Ventana Medical*

Systems, Inc.). Un panel d'anticorps a été utilisé pour l'identification des mélanocytes tumoraux : Melan-A (*Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1*) (*ThermoFisher, Waltham, MA, USA*), S-100 protein (*Dako, Agilent Technologies, Danemark*), Vimentine, and Cytokeratine (*Biogenex laboratories, San Ramon, CA*) (*table 1*). Les lames ont été déparaffinées puis incubées pendant 1h avec l'anticorps primaire puis en présence de l'anticorps secondaire Discovery UltraMap anti-lapin (760-4315, Roche) ou anti-souris couplé à la peroxydase HRP (*Horseradish Peroxydase*) (760-4313) avant d'être révélées par ajout du substrat chromogène Discovery ChromoMap DAB kit (760- 159, Roche) (Tableau 5).

Anticorps	Clone	Hôte	Fournisseur	Référence	dilution
Pan Cytokeratin (pCK)	AE1/ AE3	Souris	DAKO	M3515	1/50
Vimentine	Clone V9	Souris	Roche	790-2917	Protocole fournisseur
Melan-A (MART-1)	A103	Souris	ThermoFisher	MA5-14168	1/100
Protéine S-100	--	Lapin	DAKO	Z031129-2	1/100

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour le phénotypage des lignées

c. Par immunofluorescence (IF)

Les cellules sontensemencées sur des lames traitées à la poly-L-lysine (chambre Lab-Teck, Nunc®, Roskilde, Danemark) dans du milieu complet et à une concentration finale de $2,5 \times 10^4$ cellules par puits.

24h après ensemencement, les cellules sont lavées deux fois au PBS contenant 1% de BSA puis fixées 15 min dans de l'acétone froid et à température ambiante. Elles sont ensuite perméabilisées 15 min dans une solution à base de 0.025% de Triton X-100 dilué dans la solution de PBS supplémenté avec 1% BSA. Afin d'éliminer toute fixation aspécifique, les lames sont traitées avec un milieu de saturation (PBS additionné de 3% BSA et 7% SVF) pendant 1h. Enfin, après une série de trois lavages, les lames sont incubées 1h en présence d'anticorps primaire puis 1h avec l'anticorps secondaire couplé à la FITC et enfin 20 min en présence de Hoechst (1 mM, dilution au 1 :5000, Sigma-Aldrich) pour la coloration des noyaux, à température ambiante.

Les lames sont observées au microscope à fluorescence Leica DMRB et les images sont acquises à l'objectif PL Plan-Leica Fluotar 20×/ 1.00 (Leica Microsystems®, Wetzlar,

Allemagne). Les images sont traitées à l'aide du logiciel associé *Leica Application Suite* (LAS v 3.7 software) (Leica Microsystems) et image J[®] (National Institute of Health, Bethesda, MA, USA).

6. Analyse protéique

a. Dosage et extraction

L'analyse du contenu protéique cellulaire est réalisée par western-blot. Les cellules sont incubées en présence et en absence des composés à tester pendant 24h à 72h. Elles sont ensuite décollées à la trypsine puis lavées deux fois au PBS avant d'être centrifugées et conservées à -20°C jusqu'à l'extraction des protéines.

Les culots secs sont suspendus dans 200 µL de tampon de lyse (RIPA buffer : 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.25% Na-deoxycholate and 1 mM PMSF) additionné d'inhibiteurs de protéase (Sigma-Aldrich®, St Louis, MI, USA) à une concentration finale de 1X. L'ensemble est incubé 15 min à 4°C à l'issue desquelles les lysats sont purifiés par centrifugation, 30 min à 13000 rpm et à 4 °C. La concentration de chaque extrait est déterminée par la méthode de dosage à l'acide *bicinchronique* (acide 2,2'-biquinoline-4,4'-dicarboxylique ; BCA, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) et qui repose sur les propriétés spectroscopiques d'absorbance des noyaux aromatiques en présence d'ions de cuivre (Cu). En effet, en milieu alcalin, les protéines ont tendance à réduire les ions cuivriques (Cu²⁺) en ions cuivreux (Cu⁺), ces derniers vont ainsi former des neocomplexes avec les molécules d'acide binchronique pour lesquelles elles présentent une grande affinité, aboutissant à la synthèse de complexes pourpres absorbants à des longueurs d'ondes aux alentours de 562 nm.

Les valeurs d'absorbance ainsi obtenues sont normalisées par rapport à une gamme étalon élaborée à partir de mesures de concentrations croissantes de BSA.

b. Migration

Les échantillons sont séparés en fonction de leur masse moléculaire par électrophorèse, pendant 45 minutes à 1h à 200 Volts et 400 mA. Après ajout de 15µL d'un tampon de charge LDS-(4X), 25 µg de chaque échantillons sont portés à ébullition pendant 10min à 95°C, la migration est réalisée sur des gels pré-coulés de polyacrylamide Bis-Tris 10% SDS-PAGE et dans du tampon MES (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Enfin, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide du système *iBlot transfert* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) et saturée pendant une heure, à température ambiante et sous agitation avec une solution TBS-Tween (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,2% Tween 20) supplémenté avec 5% de lait (Santa-Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) afin d'éviter toute liaison non-spécifique. Les membranes sont incubées à 4°C sur la nuit en présence de l'anticorps primaire.

Après plusieurs rinçages au TBS-Tween 1%, les membranes sont exposées 1h à température ambiante en présence d'anticorps secondaire, couplé à la HRP (*horse radish peroxydase*), permettant ainsi de détecter les bandes par bioluminescence. (Kit ECL, Les membranes sont révélées grâce au système de révélation Amersham ECL Prime Western Blotting System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) à l'aide du scanner *Las-4000 Biomolecular Imager* et l'analyse d'image est réalisée à l'aide du logiciel ImageQuant™ (GE Healthcare®, Little Chalfont, Royaume-Uni).

Protéine ciblée	Clone	Hôte	Dilution	Fournisseur
MEK	9122	Lapin	1/1000	Cell Signaling
Phospho-MEK (Ser217/221)	9121	Lapin	1/1000	Cell Signaling
Akt	9272	Lapin	1/1000	Cell Signaling
Phospho-Akt (Ser473)	9271	Lapin	1/1000	Cell Signaling
β -Tubuline	TUB 2.1	Souris	1/1000	Sigma Aldrich
Cycline D1	H-295	Lapin	1/500	Santa-Cruz
Cdk4	H-22	Lapin	1/500	Santa-Cruz
HSC-70	B-6	Souris	1/2000	Santa-Cruz
Secondaire anti-souris	-	-	1/2000	Cell Signaling
Secondaire anti-lapin	-	-	1/2000	Cell signaling

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés en Western blot

7. Caractérisation d'une population de cellules souches cancéreuses

a. Formation de sphéroïdes

Les mélanosphères ont été générées dans des plaques 24-puits (P24) prétraitées à une solution constituée de 0,5 mg/ mL poly-2-hydroxyethylmetacrylate (PolyHema, Sigma Aldrich®, St Louis, MI, USA) dilué dans de l'éthanol, empêchant ainsi tout phénomène d'adhésion cellulaire. Environ 5×10^3 cellules par puits ont étéensemencées après avoir été reprises dans du milieu SFU (*sphere forming unit*), composé principalement de milieu DMEM/ F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) appauvri en sérum, additionné du supplément B-27 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) et complété en facteurs de croissance tels que le bFGF recombinant humain et l'EGF à une concentration finale de 20 ng/mL (Stem Cells biotechnologies®, Vancouver, Canada). L'ensemble est incubé pendant 7 jours à l'abri de la lumière, dans une étuve thermostatée, à 37°C et 5% de CO₂.

Afin de s'assurer de la quiescence et l'authenticité des sphéroïdes, un certain nombre de tests fonctionnels a été réalisé (Rhodamine 123, DiI label retaining cells) détaillés ci-après.

b. Test de rétention du marqueur DiI

1 μ M de marqueur DiI est ajouté à une suspension cellulaire dans du PBS et l'ensemble est incubé 10 min à l'étuve, à 37°C. Après centrifugation, les cellules sont rincées au PBS, 1% BSA puis cultivées comme décrit plus haut. Le milieu de culture est renouvelé tous les cinq jours et le nombre de SFU est estimé après 7 (génération 1 : **g1**), 14 (**g2**) et 21 (**g3**) jours selon la formule d'approximation suivante : nombre de sphères x 100 / nombre de cellulesensemencées.

Lors de chaque passage (g1, g2, g3), 1000 cellules sont récupérées, trypsinisées rapidement etensemencées dans des nouvelles plaques.

c. Test d'exclusion à la Rhodamine 123

La concentration cellulaire est ajustée à 10^6 cellules par millilitre dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF. Après ajout de 0,1 μ g/ mL de rhodamine 123 (Rh123), les cellules sont incubées pendant 20 minutes à 37°C pour la phase de marquage à l'issue de laquelle deux rinçages avec du milieu complet sont effectués, puis une nouvelle incubation de

1h à 37°C permet la phase d'efflux. Enfin, les cellules sont conservées à 4°C dans de la glace avant d'être analysées au cytomètre (CyAN ADP, Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

8. Caractérisation génomique

a. Extraction d'ADN

L'ADN génomique total a été extrait et purifié à partir de culots cellulaires à l'aide du kit DNeasy et selon les recommandations du fabricant (Qiagen™). La concentration et l'intégrité de chaque échantillon a ensuite été déterminée au spectrophotomètre (NanoDrop®) par la mesure d'absorbance des noyaux aromatiques à 260 nm et par électrophorèse sur gel d'agarose. La pureté de chaque échantillon a pu être appréciée grâce aux rapports A_{260} / A_{280} nm et les échantillons ayant un rapport inférieur à 1,8 ont été éliminés afin de s'affranchir de toute contamination protéique pouvant interférer avec l'analyse.

b. Analyse CGH

Dans le but de déterminer le nombre de variations de copies de gènes et des altérations géniques présentes dans nos échantillons, des études ont été réalisées par puces oaCGH (oligonucleotide array Comparative Genome Hybridization). Ces puces à ADN pangénomiques sont constituées d'oligonucléotides d'une longueur de 60-mer comprenant un total de 180.000 sondes (*Canine Genome 4x180K SurePrint G3 Canine CGH Microarray 025522_D_F_20130822*, Agilent technologies). Après hybridation des échantillons, les images ont été acquises consécutivement suite à une lecture au scanner (G2505C, Agilent), quantifiées à l'aide du logiciel Agilent Feature Extraction Software (vA.8.5.1.1) et enfin analysées sur la plateforme Agilent Genomic Workbench software V7.0.4.0. L'analyse des données recueillies a été réalisée à posteriori en se basant sur la construction génomique CanFam 3.1 (Hoeppner et al 2014). Le profil de variation du nombre de copies (CNV) de chaque échantillon a été établi grâce à la méthode de segmentation ADM2 (*Aberration Detection Method 2*). Une variation est définie tel qu'une délétion ou un gain de fonction selon le \log_2 du ratio de distribution. Les régions présentant un \log_2 ratio $> +0.25$ correspondent à un gain hétérozygote (amplification) alors que les pertes de fonction (délétion) ont été assimilées à un \log_2 ratio < -0.25 (une valeur seuil a été fixée à 6.0

pour l'ensemble des aberrations). L'ensemble des données génomiques présentées dans ce manuscrit ont été mises à disposition sur la plateforme GEO (*Gene Expression Omnibus*) sous le numéro GSE88724 (*Plateforme de génomique structurale et fonctionnelle, IRCL*).

9. Analyses statistiques

Les valeurs obtenues sont étudiées par un test statistique d'analyse de variance (ANOVA) et par un test de différence significative minimale de Fisher (*PLSD : Protected Least Significant Different Method*) sur mesures répétées, grâce à un logiciel informatique, basé sur un langage de programmation et environnement statistique (R). Les symboles utilisés dans les figures sont : ns : non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

RESULTATS

I. Validation Préclinique

**Etablissement et caractérisation du modèle
préclinique de mélanome canin**

Partie A : Mise en place du modèle

A partir de prélèvements de patients, nous avons isolé et mis en culture des cellules tumorales que nous avons ensuite caractérisées histologiquement, pharmacologiquement et génétiquement. Plusieurs stratégies ont donc été envisagées pour l'établissement d'une lignée cellulaire de mélanome canin à partir d'un échantillon de tissu initial. Soit à partir de cultures primaires, établies directement après purification et mise en culture directe des cellules issues du prélèvement initial, ou alors par l'intermédiaire de xénogreffe après croissance *in-vivo* dans un modèle animal. Deux lignées cellulaires de mélanome canin (*cMeX* et *cDuX*) ont ainsi pu être obtenues.

En raison de la faible quantité de cellules purifiées à partir du tissu tumoral de *Dolly*, nous avons privilégié la xénogreffe pour l'obtention des lignées *cMeX*. Lors du premier passage en xénogreffe, cinq souris ont été injectées. Une masse palpable d'environ $56,1 \pm 21,1 \text{ mm}^3$ a été observée 45 jours après inoculation des cellules tumorales (Figure 27). Le seuil éthique de 2000 mm^3 est atteint 110 jours après l'injection, en effet, trois souris sur l'ensemble des cinq animaux injectés ont développé une tumeur d'un volume de $2000 \pm 288,7 \text{ mm}^3$. Après euthanasie, les tumeurs ont été récupérées et les cellules tumorales ont été « extraites » comme décrit plus haut (cf. Matériel et Méthodes).

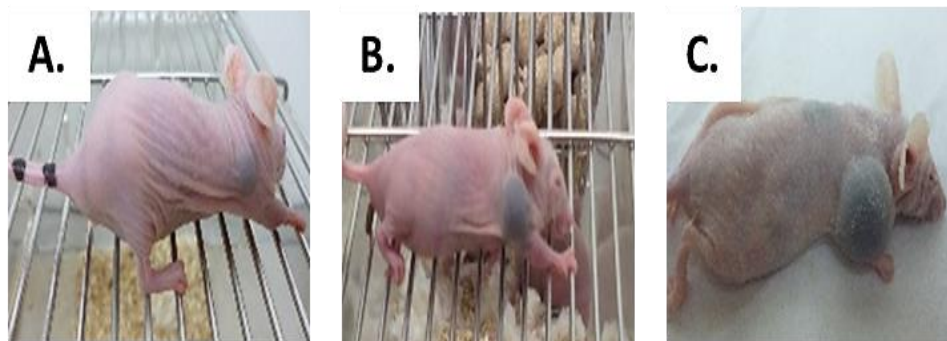


Figure 27 : Evolution in-situ de la croissance tumorale 45 (A), 65 (B) et 110 (C) jours post-injection.

A l'inverse, le prélèvement issu de Tania a permis une croissance tumorale *in-vivo* significativement plus rapide. En effet, l'ensemble des souris ayant été injectées ont développé

une masse sous-cutanée d'un volume moyen de $1600 \pm 295 \text{ mm}^3$ entre 50 et 65 jours post-injection. Les examens macroscopique et anatomopathologique n'ont permis de mettre en évidence aucune lésion métastatique (Figure 28).

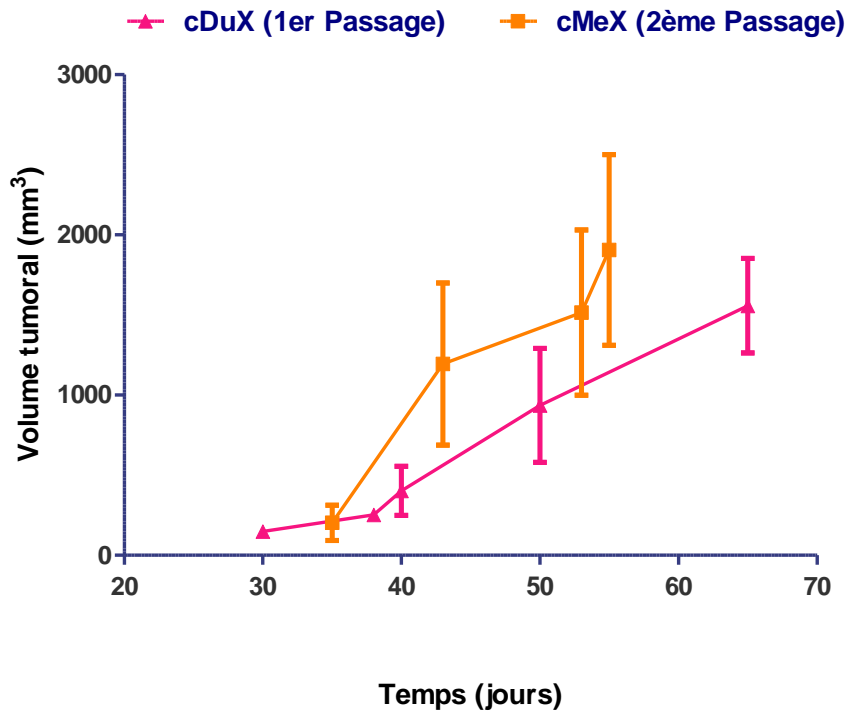


Figure 28 : Courbes de croissance tumorales des lignées de mélanome canin *cMeX* et *cDuX*

Après plusieurs passages en culture, les lignées établies *cMeX* et *cDuX* ont été réinjectées aux souris afin de confirmer leur pouvoir tumorigène. Les courbes de croissance tumorales montrent une induction du processus de tumorigénèse significativement plus rapide, dès le deuxième passage pour les cellules *cMeX* avec un volume moyen de $1905 \pm 595 \text{ mm}^3$, 55 jours post-induction. Aucune différence importante pour la lignée *cDuX* n'a été rapportée au cours des différents passages. Aussi, l'examen macroscopique a permis de mettre en évidence la présence de lésions métastatiques au niveau hépatiques, pulmonaire et splénique (Figure 29).

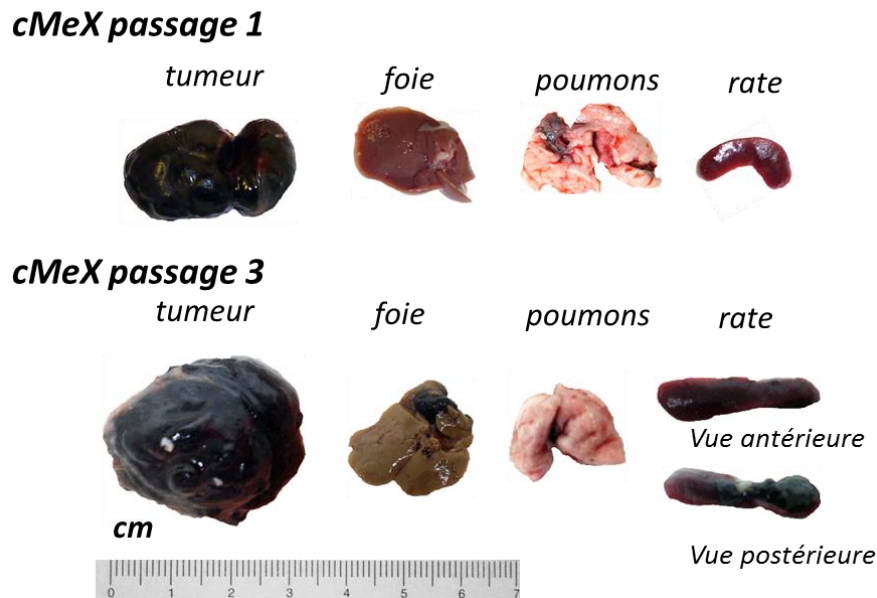


Figure 29 : Caractérisation macroscopique des tumeurs greffées et mise en évidence de lésions métastatiques

Contrairement à *Dolly*, la pièce opératoire récupérée sur *Tania* a permis d'isoler un nombre important de cellules, nous offrant ainsi la possibilité d'explorer les deux méthodes de culture évoquées précédemment.

Une lignée primaire (*cDuP*) a ainsi pu être obtenue après une mise en culture directe, en boîte de pétri de 60 mm des cellules tumorales isolées. Aucune différence entre la lignée primaire et la lignée dérivée du premier passage en xéno greffe (*cDuX*) n'a pu être établie sur le plan morphologie, phénotypique et génomique (cf. analyse CGH, plus loin).

Ainsi, à partir des prélèvements initiaux traités, deux lignées cellulaires principales de mélanome canin ont pu être établies (*cMeX* et *cDUX*). Après un minimum de 5 passages en culture, les temps de doublement cellulaire ont pu être évalués et correspondent à $59,9\text{h} \pm 6$ et $61,6\text{h} \pm 4$ ($n=3$, \pm sem) pour les lignées *cMeX1* et *cDuX1* respectivement. Les différents passages en xéno greffe ont permis de réduire significativement ces temps de doublement (Tableau 1 Tableau 7).

Nature du Prélèvement				Données cliniques				Lignées cellulaires			
Race	Age	Sexe	Origine	Classification TNM	Stade clinique	Caractéristiques histologiques	Métastases distantes	Nom	Origine	Nombre de passages	Nombre de doublement (h)
Yorkshire Terrier	14	Femelle	Muqueux	T2N1M0	III	Cellules polygonales	Non	cMeX1	Mélanome malin de la cavité buccale	36	59,9 ± 6
								cMeX2		25	41,8 ± 8
								cMeX3		32	43,2 ± 3
								cMeX4		5	39,1 ± 4
Berger Allemand	11	Femelle	Labial	T2N1M1	IV	Cellules polygonales et fusiformes	Oui	cDuP	Mélanome malin de la cavité buccale	20	75,1 ± 8
								cDuX1		38	61,6 ± 4
								cDuX2		9	37,5 ± 3

Tableau 7 : Caractéristiques cliniques, morphologiques et cellulaires des lignées isolées.

Partie B : Caractérisation des deux modèles cellulaires canins

1. Caractérisation histologique

Dans le but de caractériser ces deux modèles cellulaires sur les plans histologique, phénotypique, et cytochimique, une série de marquages par immunohisto- et immunocytochimie a été réalisée.

En plus des colorations *hematoxylin-éosin* (H&E) et *May-Grünwald Giemsa* (MGG), un panel spécifique de marqueurs de différenciation adapté au mélanome a été utilisé. Les tumeurs récupérées des xénogreffes ainsi que les cellules isolées ont été marquées à la cytokératine, la vimentine, l'antigène melan-A ainsi que la protéine S-100.

La cytokératine et la vimentine constituent des marqueurs des filaments intermédiaires, tissu-spécifiques, importants mais cependant insuffisants pour la classification des tumeurs. En effet, alors que les kératines sont spécifiques des cellules épithéliales, la vimentine elle marque préférentiellement les cellules du neurectoderme ainsi que les cellules mésenchymateuses (*Koenig et al, 2001*).

La majorité des mélanomes sont spécifiquement vimentine positives (*Smith et al, 2002*). Dans une étude rétrospective de 338 cas de mélanomes muqueux, Ramos-Vara et al ont rapporté un marquage cytoplasmique vimentine (+) et cytokératine (-) dans 100% des tissus marqués (*Ramos-Vara et al, 2000*) concordant ainsi avec les résultats obtenus dans notre modèle.

Ces marqueurs ne permettant pas d'établir un diagnostic définitif en raison de leur réactivité avec un très grand nombre de cellules, nous avons donc réalisé des marquages melan-A et S-100 consécutivement.

Melan-A ou MART-1 constitue un antigène de surface des mélanocytes. Codée par le gène MLANA, c'est une protéine d'une taille de 18 kDa, présentant des fragments intracellulaire, cytoplasmique et extracellulaire. Sa fonction n'est pas encore bien définie (*Koenig et al, 2001*), elle aurait un rôle potentiel dans les mécanismes de reconnaissance des mélanocytes tumoraux

par les cellules immunitaires lors de la réponse médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (Smith *et al*, 2002).

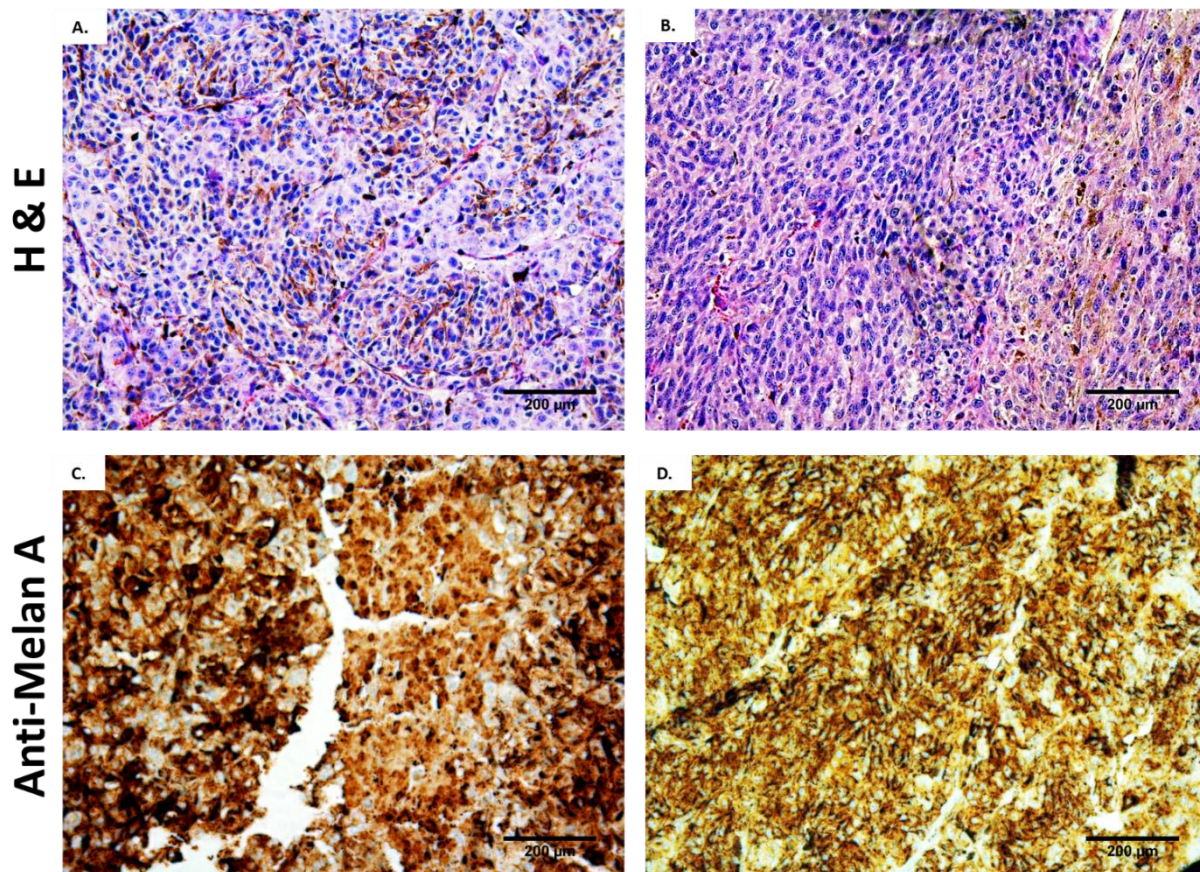


Figure 30 : Marquage par immunohistochimie (IHC) anti-Melan-A des coupes tumorales de xénogreffe des lignées *cMeX* (A et C) et *cDuX* (B et D) : marquage diffus et hétérogène au sein de la masse tumorale, dilution au 1/50. Observation au microscope optique (x200).

Les lames ont été analysées par un pathologiste et le compte-rendu (**annexe C**) a été en faveur d'un mélanome faiblement pigmenté formant des plages epithélioïdes de cellules mixtes, polygonales et fusiformes et d'une taille $> 30\mu\text{m}$ et présentant des atypies cytonucléaires (Figure 30, A & B).

Les marquages par IHC (Figure 30, C & D), immunocytochimie (ICC) (Figure 31) ainsi que par immunofluorescence (IF) (Figure 32) indiquent que les cellules expriment fortement l'antigène melan-A, aussi bien dans les tumeurs développées à partir des modèles murins établis qu'au niveau des lignées cellulaires isolées à partir de celles-ci.

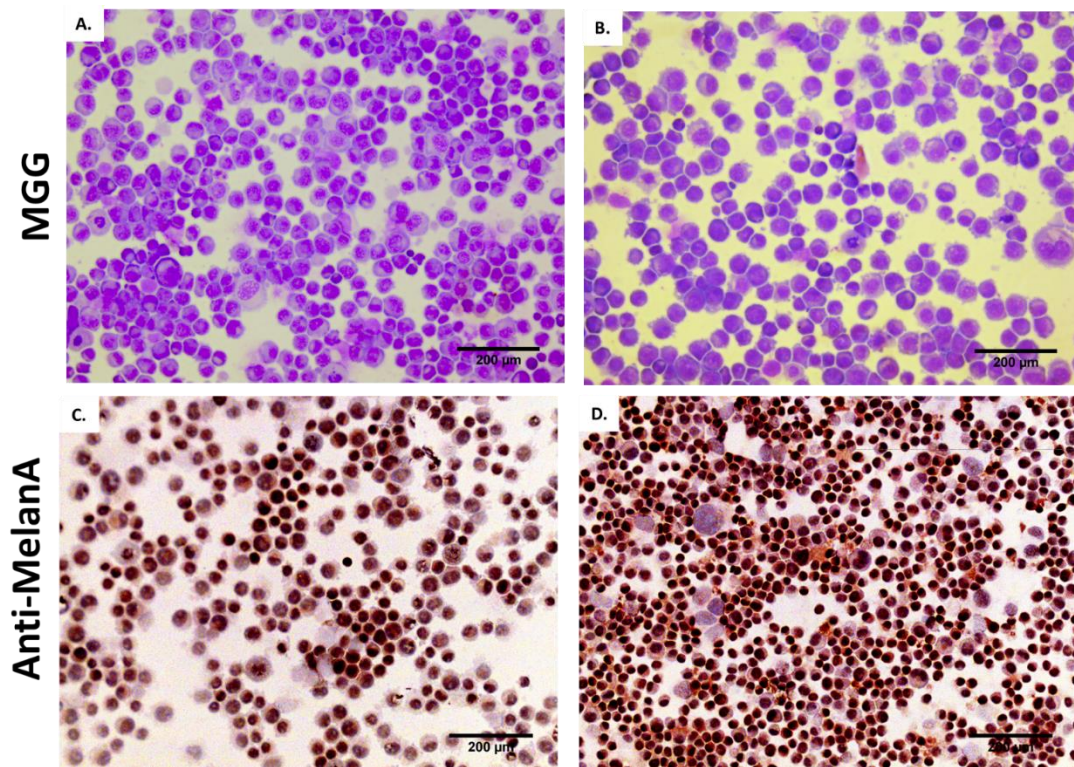


Figure 31 : Coloration MGG et marquage anti-MelanA par ICC des lignées cellulaires établies. Les lignées *cMeX* (A & C) et *cDuX* (B & D) présentent une population cellulaire mixte, marquant fortement et de manière hétérogène l'antigène MelanA. Observation au microscope optique, grossissement (x200).

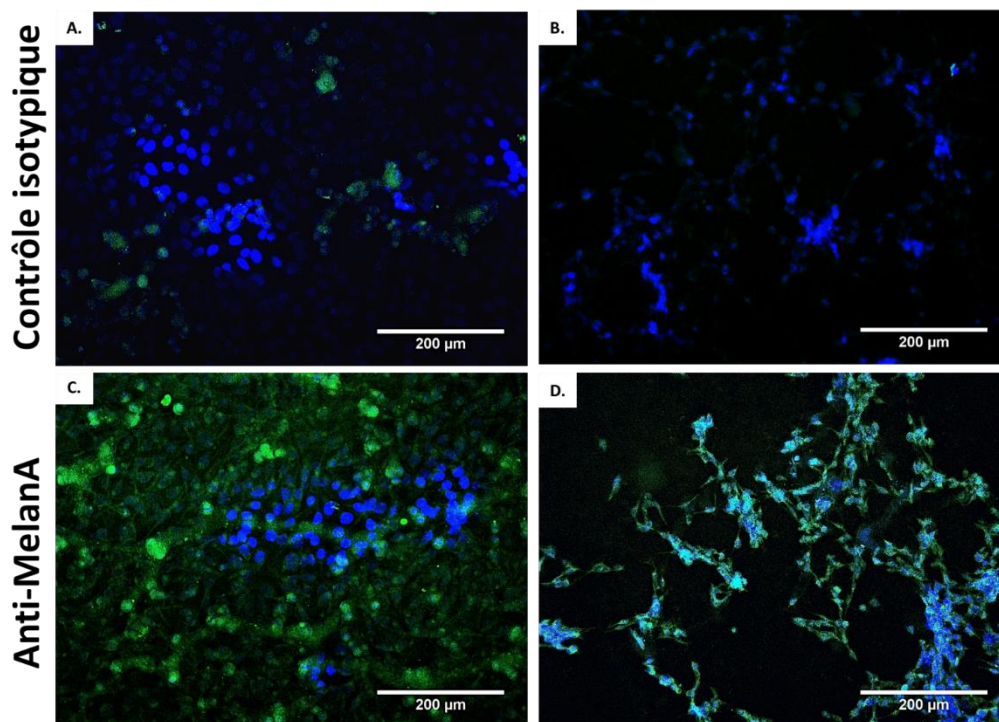


Figure 32 : Marquage anti-melanA par IF des lignées cellulaires *cMeX* (A & C) et *cDuX* (B & D) établies. Observation au microscope à fluorescence Leica DMRB et à l'objectif x20.

Nous nous sommes ensuite intéressés au marquage de la protéine S100, qui constitue un marqueur spécifique des mélanocytes. En effet, ces protéines d'une taille avoisinant les 21 kDa constituent une famille d'holoprotéines dimériques composées de sous-unités α et β et dont les principales fonctions seraient la liaison intracellulaire et intranucléaire des ions calcium Ca^{2+} , la régulation de la phosphorylation d'un certain nombre de protéines mais aussi de la prolifération cellulaire (*Smith et al, 2002*).

Plusieurs isoformes ont été rapportées et sont exprimées de manière différentielle dans un très grand nombre de tissus. On note par exemple l'isoforme S100a spécifique des cellules neuréctodermiques (*Koenig et al, 2001*) mais surtout l'isoforme S100b spécifique du tissu cérébral et également des tissus tumoraux notamment les mélanocytes malins (*Höinghaus et al, 2002*), la rendant ainsi nécessaire pour le diagnostic de mélanomes achromiques (*Koenig et al, 2001*).

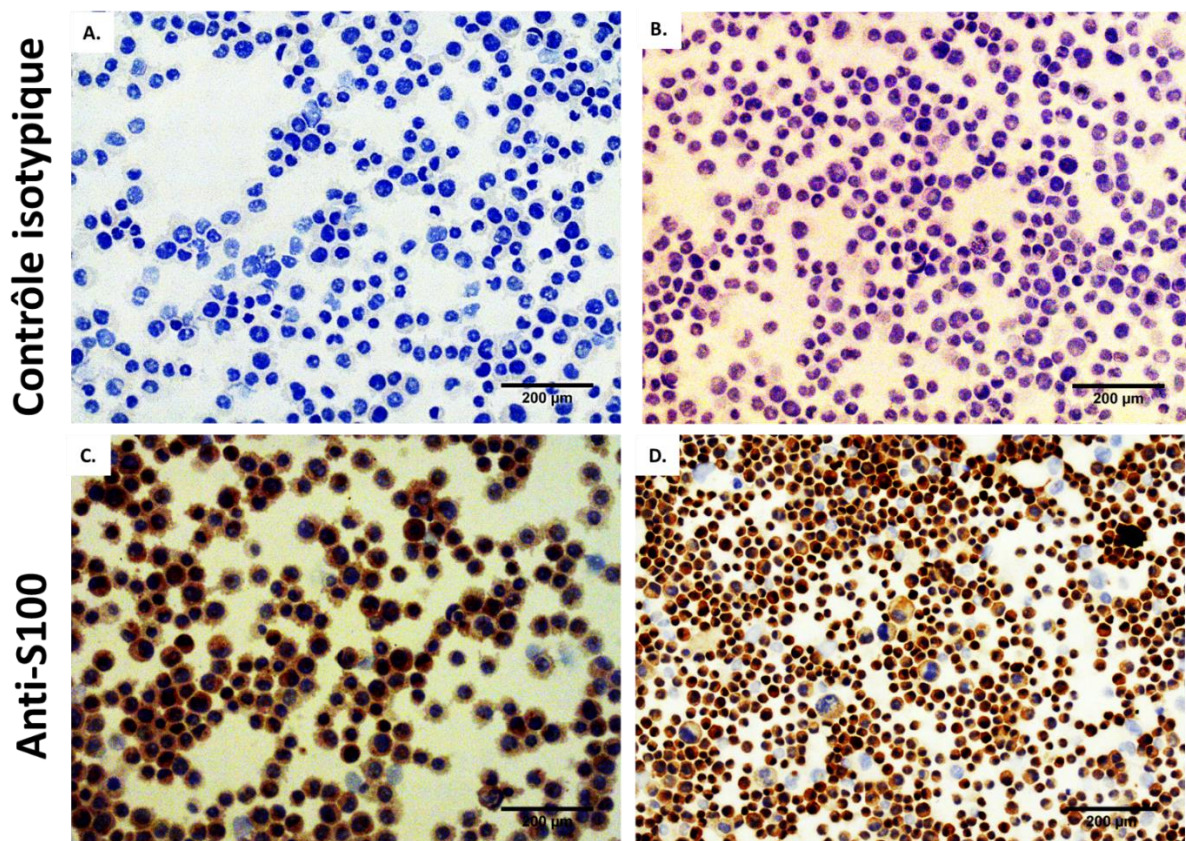


Figure 33 : Marquage IHC de la protéine S100 dans les lignées établies *cMeX* (A & C) et *cDuX* (B & D). Révélation à l'immunoperoxydase HRP et au chromogène DAB, observation au microscope optique, grossissement (x200).

Les marquages IHC (Figure 33) et IF (Figure 34) indiquent une expression forte et spécifique de cette protéine dans nos lignées cellulaires, en faveur d'un mélanome.

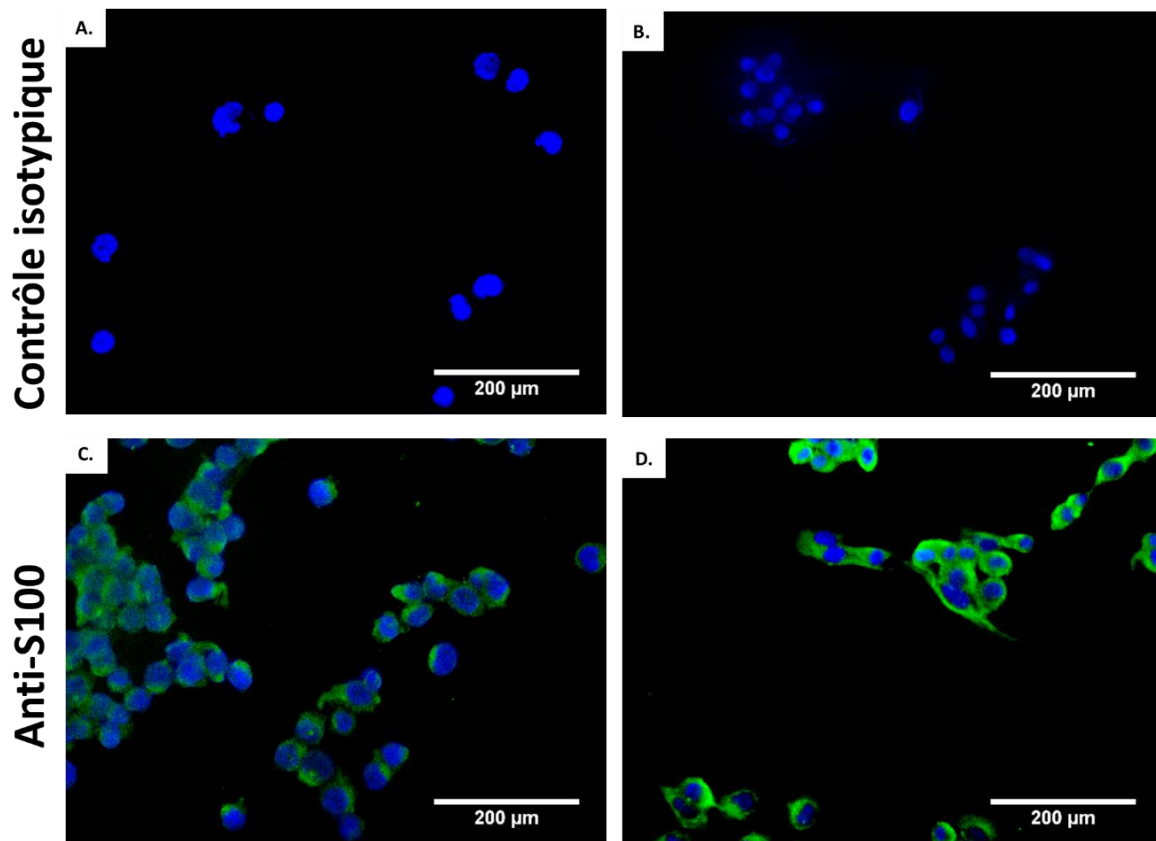


Figure 34 : Marquage anti-melanA par IF des lignées cellulaires *cMeX* (A & C) et *cDuX* (B & D) établies. Observation au microscope à fluorescence Leica DMRB et à l'objectif x20.

2. Caractérisation génomique

Les mélanomes constituent un ensemble de tumeurs très complexes. En effet, elles dérivent des mélanocytes qui n'acquièrent cette capacité de cancérisation et de croissance autonome qu'à la suite d'une série de transformations, aboutissant à des mutations et conduisant à la tumorigénèse.

Contrairement à l'homme où la forme cutanée est largement prédominante, les mélanomes canins sont principalement muqueux et non-UV dépendants. Ce type de tumeur peut se développer chez n'importe quelle race mais avec des prédispositions beaucoup plus importantes chez certaines comme les *scottish terriers*, les *golden retrievers*, les caniches ou encore les schnauzers (*Modiano et al, 1999*). S'appuyant sur ces observations, l'hypothèse d'un fondement génétique à l'origine de ces tumeurs est fort probable.

Ces prédispositions héréditaires ont été mises en évidence chez l'homme, notamment par la découverte des mutations somatiques du gène *Cdkn2a* (*Hussussian et al, 1994*) mais aussi des altérations chromosomiques au niveau des 6^e et 7^e paires chromosomiques (*Tsao et al, 2012*).

Ces altérations génétiques au cours des premières phases de la tumorigénèse sont donc importantes à connaître pour la compréhension de ces mécanismes et la mise en place de thérapeutiques efficaces.

Nous avons cherché à établir le profil génétique de nos deux modèles cellulaires *cMeX* et *cDuX*. Des études d'hybridation génomique comparative par puces pangénomiques CGH ont été réalisées. Les données obtenues ont été analysées pour chaque échantillon sous le logiciel R et ont permis de mettre en évidence un certain nombre d'altérations (amplifications ou délétions pour les deux lignées (Tableau 8).

Les profils chromosomiques établis permettent de différencier les deux lignées cellulaires (Figure 35, Annexe D). Une perte hypothétique du gène *Cdkn2a* au niveau du chromosome 11 a été rapportée chez *cDuX* et en raison d'un important bruit de fond, reste difficilement identifiable dans *cMeX*.

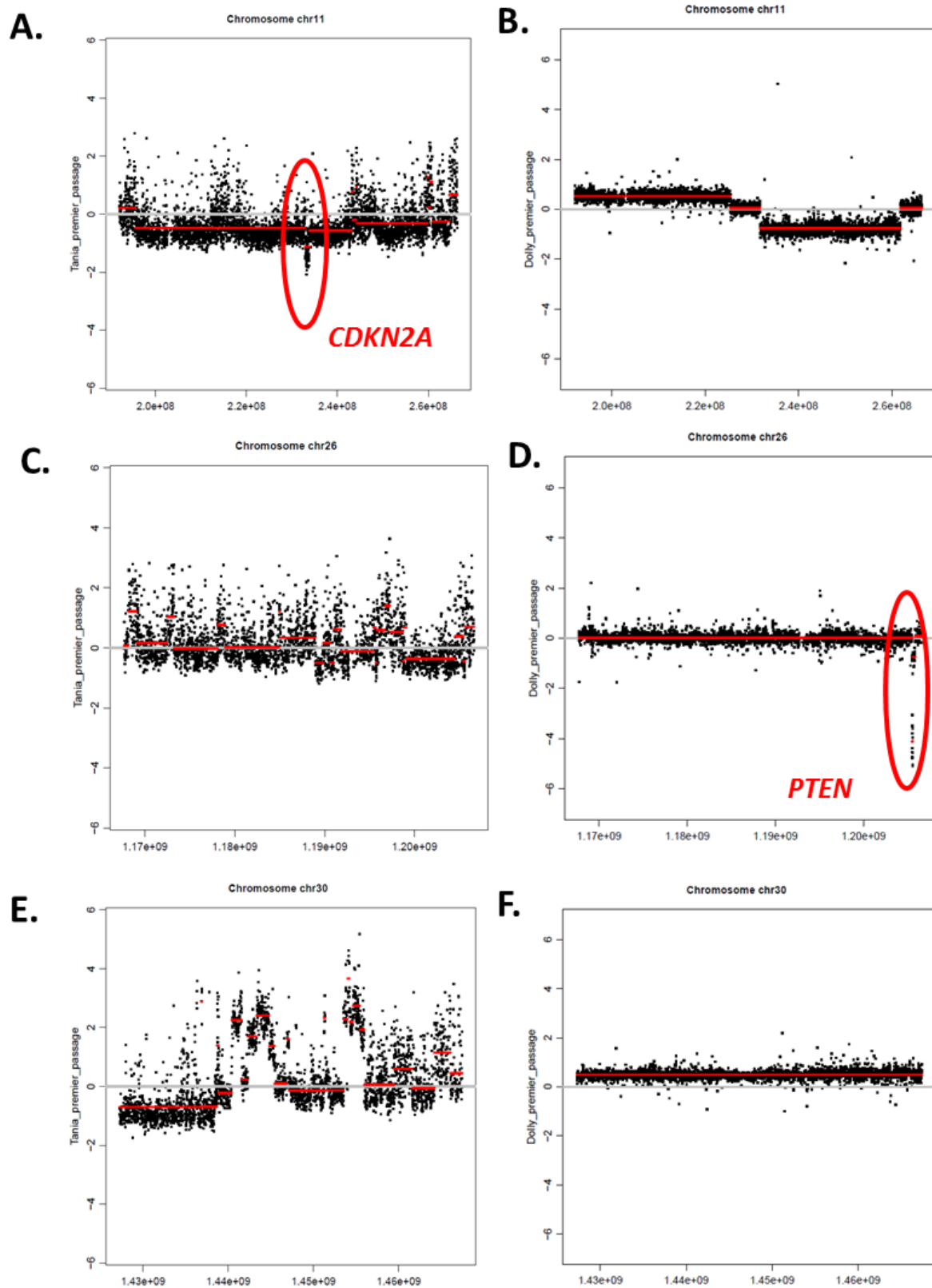


Figure 35: Chromosome plot des lignées *cDuX* (A, C, E) et *cMeX* (B, D, F) montrant les altérations au niveau des chromosomes 11, 26 et 30 (sur 39 paires de chromosomes). Diagrammes générées à l'aide d'un script élaboré sur le logiciel R.

Parmi les autres altérations identifiées, une délétion homozygote du gène *Pten* a été identifiée, uniquement au sein de la lignée *cMeX*. On note également le remaniement important caractéristique du chromosome 30, rapporté par plusieurs travaux de recherches, témoignant de l'agressivité de la tumeur et dont une liste hypothétique de gènes impactées a été établie récemment (*Poorman et al, 2015*).

Gène	Position chromosomique	Log2 ratio	
		<i>cMeX</i>	<i>cDuX</i>
CDKN2A	CFA 11 : 41225749-41264280	-0,76	-1,13
RB1	CFA 22 : 3063445-3177426	-0,9	-0,44
PTEN	CFA 26 : 37853148-37913100	-4,11	-0,44

Tableau 8: Liste commune de gènes délétés dans les deux lignées cellulaires de mélanomes canin et leur position chromosomique (CFA : *Canis lupus Familiaris*).

Une classification hiérarchique (*clustering* de gènes) sur l'ensemble des échantillons (tumeur primitive, xénogreffes et lignées) a été établie et n'a permis de démontrer aucune dérive significative de la lignée *cDuX* entre la lignée primaire, issue de la tumeur primitive et la lignée dérivée de la xénogreffe, sur le plan génomique. Une légère altération est observée cependant au cours du troisième passage de la lignée *cMeX*. Des analyses complémentaires par *Whole Exome* ou *RNA-Seq* nous permettraient de comprendre plus spécifiquement les anomalies chromosomiques dérivant de la transformation de cette lignée issue d'un modèle murin (Figure 36).

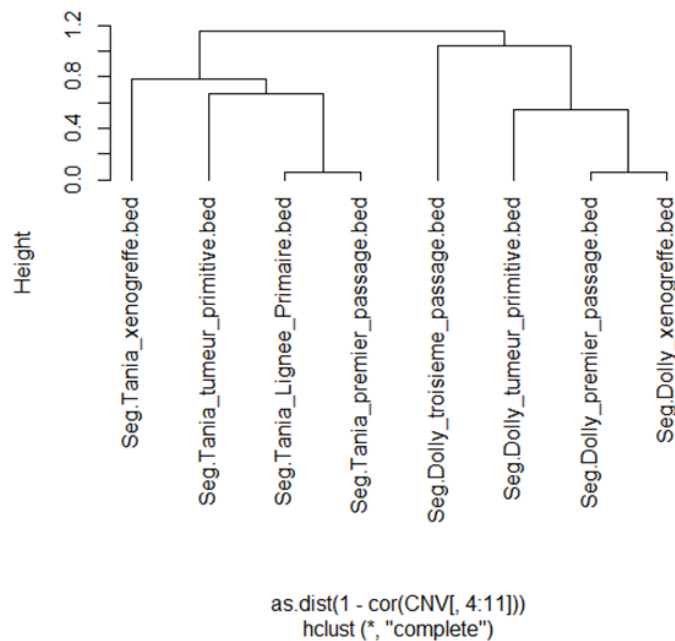


Figure 36: Clustering génétique représentant la classification hiérarchique des échantillons issus de Tania et Dolly et la matrice des distances entre chaque échantillon. Figure élaborée à partir du logiciel R et à l'aide d'un algorithme spécifique adapté.

Nous avons ainsi pu identifier une liste des régions génomiques et/ou de gènes ayant subi des amplifications ou délétions, observables par l'analyse comparée des deux patients analysés entre eux et vis-à-vis de témoins issus de la base de données GEO (GSE57137), a été dressée. Cette première liste permet dès à présent de distinguer chaque échantillon et de repérer des régions et des gènes « perdus » et « gagnés ». La représentation et les analyses génomiques ont été réalisées sur la plateforme *Genomic Workbench Software v7.0.4.0* (**Annexe E**).

Une analyse comparative des trois groupes (*Tania*, *Dolly* et échantillons contrôle issus de GEO) a été réalisée et a permis d'établir une liste d'aberrations, mettant en évidence des régions chromosomiques spécifiques. En se référant à la base de données *RefSeq*, une liste regroupant le nom des gènes présents dans chaque région a été établie. A partir de cette liste, les aberrations présentes exclusivement dans l'ensemble des échantillons retenus pour chaque prélèvement (*Tania* et *Dolly*) ont été retenues.

Un ensemble de 82 gènes ont été amplifiés chez Dolly vs. Tania et les contrôles alors que Tania dispose d'un nombre de gènes amplifiés beaucoup plus important, au nombre de 1842. De plus, une analyse croisée des échantillons *Tania* et *Dolly* vs. contrôles a permis de mettre en évidence 898 gènes amplifiés communs (Tableau 9).

	Nombre de régions impliquées		Taille totale (Mb)		Nombre de gènes	
	amplification	délétion	amplification	délétion	amplification	délétion
Tania xénogreffe	649	85	382.163	215.890	5.728	875
Tania DuP	499	47	513.314	37.737	7.829	5.034
Tania Tumeur Primitive	676	51	486.319	112.544	9.293	11
Tania cDuX	734	78	617.353	112.327	7.929	864
Dolly xénogreffe	29	48	397.245	577.828	10.782	12.350
Dolly cMeX 1	27	45	396.973	580.481	10.799	12.241
Dolly cMeX 3	458	41	654.849	226.493	11.434	21
Dolly Tumeur Primitive	24	25	313.530	411.890	1.423	119

Tableau 9 : Description du nombre d'évènements génomiques (amplification/ délétion) dans chaque échantillon.

Ces listes ont été soumises à la base de données IPA (QIAGEN's Ingenuity® Pathway Analysis, Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity). Les résultats obtenus montrent une amplification importante du gène codant pour la protéine PD-L1 (Cd274 at CFA1 :93590594-93597819 - (NM_021893) programmed cell death 1 ligand 1 precursor), responsable de l'immunoéchappement et de l'augmentation de l'agressivité des tumeurs ainsi que du potentiel métastatique. Aussi, il a été rapporté une augmentation des cyclines Cdk4 et Cdk20 (cdk20 at CFA1 :97623350-97628970 - (NM_001008655) cyclin-dependent kinase 20 ; cdk4 at CFA10 :1813220-1815111 - (NM_001016742) cyclin-dependent kinase 4), importantes pour la régulation du cycle cellulaire, uniquement pour la lignée *cDuX*.

Parmi les amplifications identifiées dans les deux lignées *cMeX* et *cDuX*, notons la présence du gène ABCB1 (CFA14 :13645287-13726710 - (NM_001287322) multidrug resistance protein 1), codant pour les protéines de résistances au traitement mais aussi de ALDH1 (CFA30 :23084104-23130445 - (NM_001087771) aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 L homeolog). Ces deux gènes sont connus pour leurs implications dans les mécanismes de régulations des cellules souches tumorales (*Luo et al, 2012*) capables d'auto renouvellement et de différenciation, primordiales pour le processus de cancérogenèse.

3. Caractérisation pharmacologique

Les mélanomes sont des tumeurs connues pour développer un certain nombre de résistances aux traitements quels qu'en soient leur nature. Ainsi, au stade métastatique, le mélanome est souvent associé à une radiorésistance, une polychimiorésistance voire même un immunoéchappement comme l'ont déjà démontré un certain nombre d'études récentes (*Ziegler et al, 2008 ; Thakur & Stuart, 2013 ; Bu et al, 2016*).

Les agents de chimiothérapie constituent une classe thérapeutique largement utilisée dans la prise en charge d'un certain nombre de cancers en raison de leur haut potentiel cytotoxique vis-à-vis des populations cellulaires tumorales. Parmi ces molécules, la dacarbazine (DTIC, déticène®) constitue l'agent de première intention et a pendant très longtemps été le standard thérapeutique dans le traitement du mélanome métastatique non-opérable, et ce malgré un faible taux de réponse (15 – 25%, *Hill, Metter et al, 1979*) ainsi qu'un faible bénéfice apporté quant à la survie des patients (*Ugruel et al, 2013*). La mise en place de thérapies ciblées a permis d'améliorer et de prolonger la survie et la qualité de vie des patients atteints de mélanome métastatique. C'est par exemple le cas du *Vémurafenib* (PLX4032) (*Flaherty et al, 2010*) petite molécule ciblant spécifiquement les mutations de l'oncogène BRAF responsables de l'activation constitutive de la voie des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) et rapportées dans plus de 50% des mélanomes métastatiques humains (*Sun et al, 2014*).

Nous avons évalué dans un premier temps la concentration efficace du DTIC, inhibant la croissance et la prolifération, dans nos lignées cellulaires précédemment établies. Les lignées de mélanome humain A375 et Sk-Mel28 ont servi de témoins positifs pour ces expériences. Un effet sur la croissance et la prolifération cellulaires (IC_{50}) n'a été observé que 72h après incubation.

Les valeurs obtenues pour les lignées humaines ont été de l'ordre du nanomolaire (100 nM \pm 0,6 and 700nM \pm 11) pour les lignées A375 et Sk-Mel 28 respectivement. Aucune différence significative n'a été rapportée entre le profil de ces deux lignées.

Pour les lignées ***cMeX*** et ***cDuX*** la réponse à la dacarbazine a été de l'ordre du micromolaire et les valeurs obtenues sont $IC_{50} = 6,9\mu M \pm 0,5$ pour *cMeX* et $IC_{50} = 23\mu M \pm 0,9$ pour *cDuX*. La variabilité de réponse entre ces deux lignées est très significative ($p < 0,0001$), confirmant

ainsi la différence d'agressivité du profil clinique à partir duquel ont été établis les deux modèles cellulaires (Figure 37).

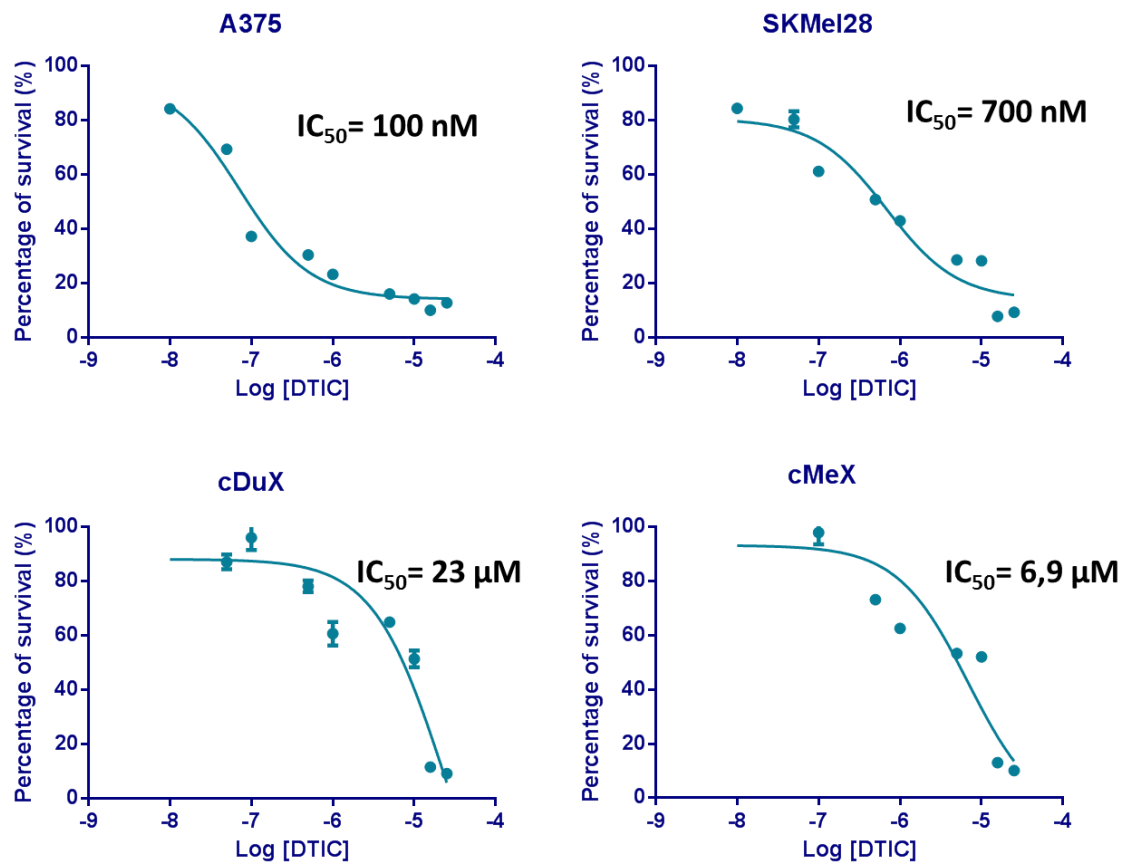


Figure 37 : Courbes doses-réponse du DTIC. Les cellules ont été incubées 72h en présence de la molécule. Les pourcentages de survie ont été établis à partir des valeurs obtenues via le test MTS et les IC_{50} déterminés grâce au logiciel GraphPad (Prism®).

Nous avons ensuite évalué la cytotoxicité du *Vémurafenib* sur les lignées *cMeX* et *cDuX*, 24 et 72h post- traitement. Contrairement au DTIC, le vémurafenib est capable d'induire un effet sur la survie cellulaire à partir de 24h et jusqu'à 72h après incubation (Tableau 10). Aussi, à l'exception de la lignée Sk-Mel28 qui semble développer une résistance à cet inhibiteur, une réponse de l'ordre du micromolaire est obtenue avec l'ensemble des cellules (Figure 38).

Lignée	IC ₅₀ à 24h	IC ₅₀ à 72h
A375	6 μ M \pm 0,1	6 μ M \pm 0,06
SK-Mel28	30 μ M \pm 4,5	> 100 μ M
cMeX	10 μ M \pm 0,14	1 μ M \pm 0,1
cDuX	13,5 μ M \pm 0,07	2,9 μ M \pm 0,02

Tableau 10 : Valeurs IC₅₀ des lignées de mélanome après 24 et 72h de traitement au Vémurafenib (IC₅₀ \pm sem).

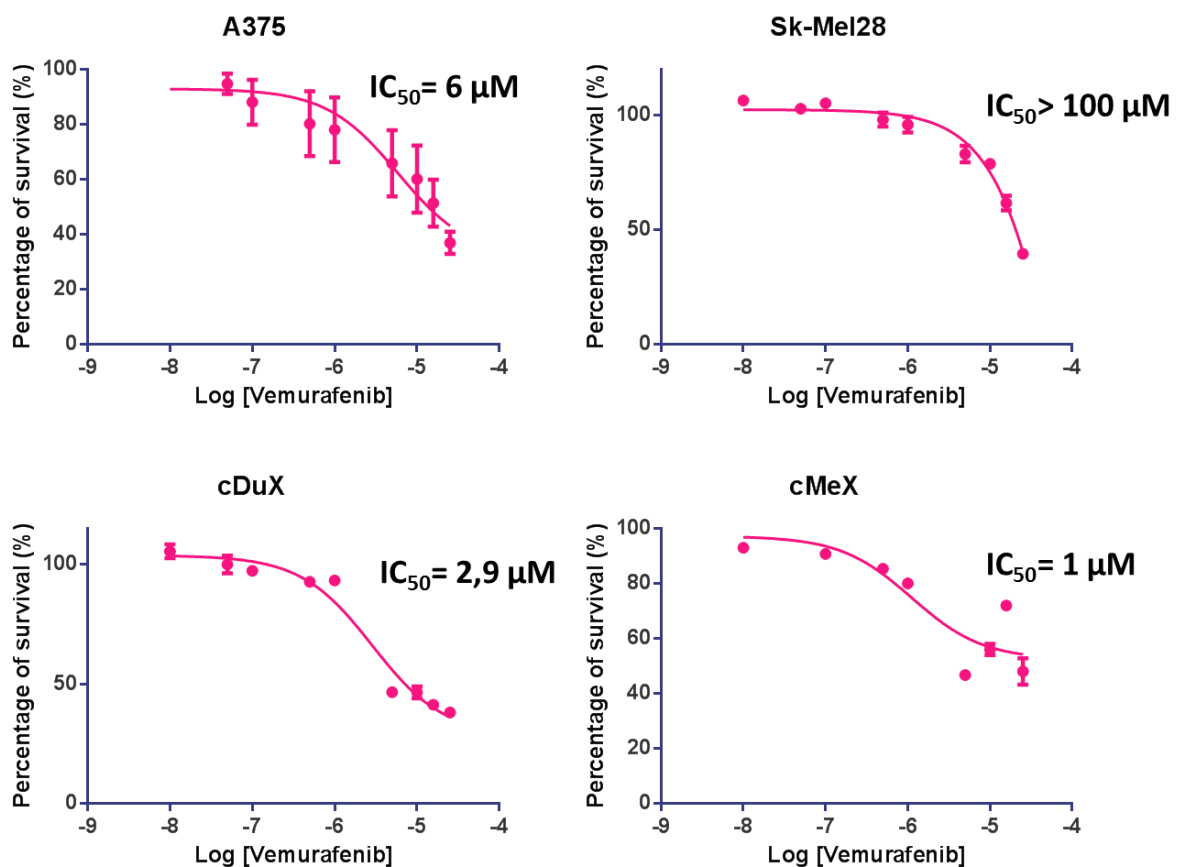


Figure 38 : Courbes doses-réponse 72h après traitement au Vémurafenib. Les cellules ont été incubées 72h en présence de la molécule. Les pourcentages de survie ont été établis à partir des valeurs obtenus via le test MTS et les IC₅₀ déterminés grâce au logiciel GraphPad (Prism®).

Depuis la mise en évidence des mutations du gène BRAF activant constitutivement la voie MAPK dans un certain nombre de cancers humains (Davies *et al*, 2002) et dans plus de 60% des mélanomes métastatiques (Goel *et al*, 2006), l'inhibition de cette protéine ainsi que des

partenaires impliqués dans cette voie de signalisation a fait l'objet de plusieurs projets de développement thérapeutique.

Très peu documentées jusqu'à présent ces mutations sont absentes voire très rares dans les mélanomes canins (*Chudnovsky et al, 2005*), probablement en raison de leur statut non-uv dépendant, impliquant donc une autre voie au cours de la transformation maligne des mélanocytes (*Gillard et al, 2014*).

Une équipe a récemment rapporté une mutation du gène BRAF, homologue à la mutation BRAF V600E humaine (*Mochizuki et al, 2015b*). En effet la mutation BRAF V595E, substituant une valine [V] par un acide glutamique [E] conduirait à l'activation de la voie des MAPK et enclencherait la cascade de phosphorylation des protéines Raf, MEK et ERK conduisant ainsi à la promotion de la croissance et la survie des cellules malignes (*Decker et al, 2015*).

Pour la suite de ce travail sur les inhibiteurs, nous avons donc quantifié les niveaux protéiques des isoformes phosphorylées (pMEK) et non phosphorylées de la protéine MEK, par western-blot, en présence et en absence de vémurafenib (10 μ M), pendant 24h.

Les résultats obtenus montrent une absence d'isoformes phosphorylées pour l'ensemble des lignées testées en présence de vémurafenib, indiquant ainsi le blocage de cette voie

Figure 39, A).

Nous nous sommes également intéressés à la voie PI3K, également connue pour être impliquée dans le processus de mélanomagenèse dans 15 à 20% des mélanomes humains et canins (*Fowles et al, 2013*). En effet, c'est l'homologue 3 du proto-oncogène Akt, une protéine kinase B souvent activée par délétion de PTEN (*Koenig et al, 2002*) ou suite à l'amplification du gène AKT3, qui est responsable de l'activation de cette voie, conduisant ainsi à l'inhibition et à la résistance aux mécanismes d'apoptose.

Les résultats obtenus montrent une activation importante de cette voie et des niveaux importants d'isoformes phosphorylées dans l'ensemble des modèles cellulaires étudiés (

Figure 39, B).

Il est donc nécessaire d'étudier l'inhibition de cette voie par un ensemble d'inhibiteurs comme le LY294002 ou la rapamycine (*Kent et al, 2009*) afin de confirmer son importance dans notre modèle cellulaire.

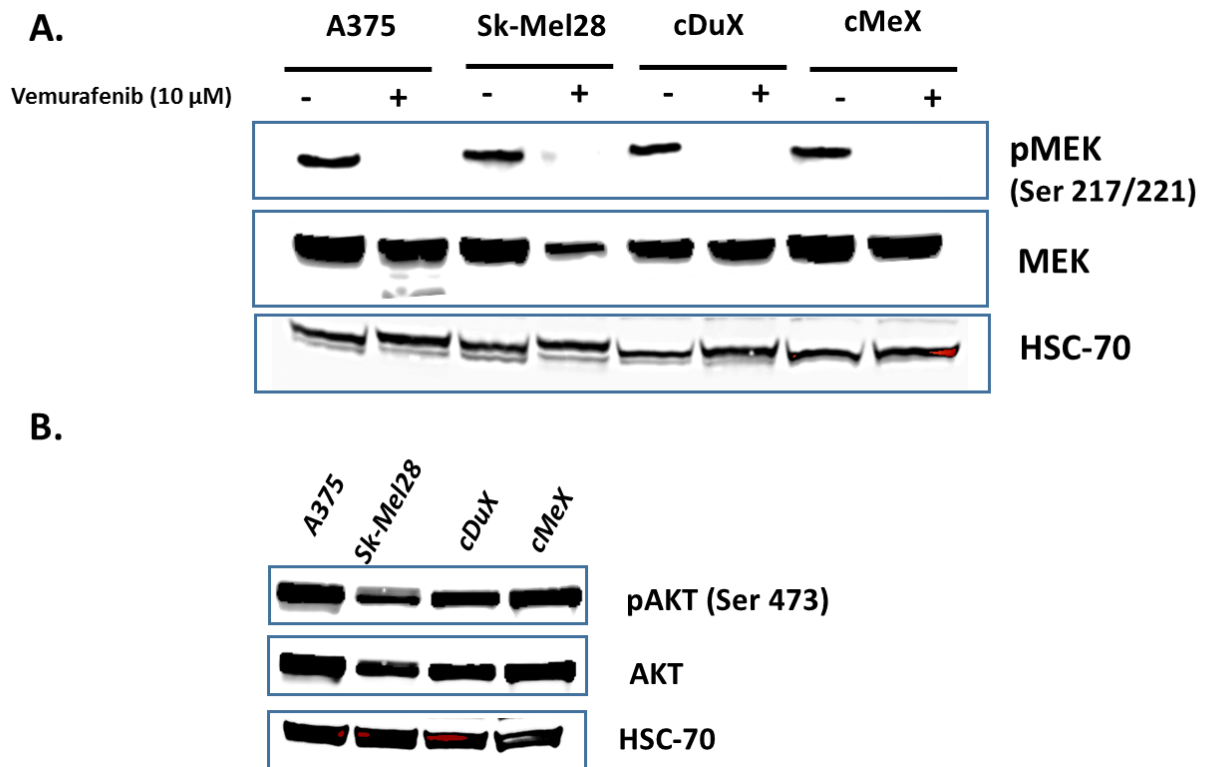


Figure 39 : Activation de la voie BRAF (A) et PI3K/Akt (B) dans les modèles cellulaires établis de mélanome. Les cellules ont été incubées pendant 24h en présence ou non de vémurafenib à une concentration de 10 μ M. Les lignées de mélanome humain A375 et Sk-Mel 28 ont été utilisées comme témoins et la protéine HSC-70 comme contrôle de charge.

4. Caractérisations fonctionnelles

a. Identification des cellules souches cancéreuses (CSC) dans les lignées cMeX et cDuX

Longuement controversée, l'hétérogénéité tumorale prend une part importante dans la croissance, la persistance tumorale ainsi que le développement de résistances aux traitements (*Shatton et al, 2008*).

Les mélanomes forment un ensemble de tumeurs hautement métastatiques et très hétérogènes. La complexité intra-tumorale est en effet d'une grande importance dans l'enrichissement génétique et phénotypique de chaque tumeur (*Nowell et al, 1976*), permettant ainsi l'évolution d'une ou plusieurs sous-populations clonales au profil de réponse et de résistance au traitement hautement variable (*Maecham et al, 2013*).

La sélectivité de ces marqueurs et l'organisation hiérarchique des mélanocytes tumoraux a longuement été discutée. Ces marqueurs, bien qu'ils soient spécifiques des CSC, peuvent voir leur profil d'expression altéré en fonction d'un changement au niveau du microenvironnement tumoral. On cite par exemple le cas du CD133 (*Zabierowski et al, 2008 ; Jaksch et al, 2008*) d'ABCB5 (*Schatton et al et Keshet et al, 2008*) ou encore du CD34. Ces seuls marqueurs ne sont donc pas suffisants pour la caractérisation de ces populations souches au sein de notre modèle.

Plusieurs travaux ont déjà démontré les capacités des CSC à générer des sphères mais aussi leur capacité à exclure des drogues et des molécules exogènes, de manière plus importante que les populations non-souches, témoignant ainsi d'une activité importante des pompes à efflux p-gp (p-glycoprotéine) (*Clevers et al, 2011 ; Visvader et al, 2011 et Kuranda et al 2011*).

Nous nous sommes donc basés sur un ensemble de tests fonctionnels (formation de sphères, rétention de marqueurs fluorescents et tests d'exclusions de la Rhodamine 123 [Rh 123]) pour identifier et caractériser ces sous-populations (*stem-like*) sur les plans morphologiques et fonctionnels.

i. Tests d'exclusion à la Rh 123

En l'absence de marqueurs spécifiques de CSC dans le mélanome, le test fonctionnel d'efflux à la Rh 123 a été réalisé afin de différencier les populations souches (Rh 123^{low}), faiblement marquées (*Mc Kenzie et al, 2007*) et non souches (Rh123^{high}).

La rhodamine 123 (Rh123) constitue non seulement un substrat spécifique des transporteurs ABCB1 et ABCB5 mais est aussi capable de se lier aux mitochondries, et sa rétention est indicatrice de l'état métabolique de la cellule (*Kim et al, 1998 ; Frank et al, 2003*).

Ainsi, une faible fluorescence Rh123 peut être synonyme de la présence d'un faible nombre de mitochondries actives dans la cellule ou d'une importante activité d'efflux, des pompes p-gp (*Kim et al, 1998*) et ainsi une résistance au traitement.

Nous avons évalué le pouvoir de rétention et d'efflux de Rh 123 dans nos modèles cellulaires. La Figure 40 montre les résultats obtenus par cytométrie en flux des deux lignées cellulaires *cDuX* et *cMeX*, marquées à la Rh 123. Après 1h d'incubation, les deux lignées présentent des profils distincts, une population importante éliminant fortement le marqueur Rh123 est observée dans la population *cDuX* (44 %) alors qu'elle est largement plus faible pour *cMeX* (12 %) (Figure 40).

Ce test indique que l'activité d'efflux dans ces lignées est ABCB1/ ABCB5 dépendante et conforte donc l'hypothèse d'un lien direct entre les populations Rh123^{low} et l'activité de ces transporteurs.

Des populations de cellules quiescentes ont donc été identifiées au sein des lignées de mélanomes canins établies. Ces cellules sont capables d'exclure la rhodamine 123 et expriment à leur surface le marqueur p-gp (ABCB5), différemment selon les lignées.

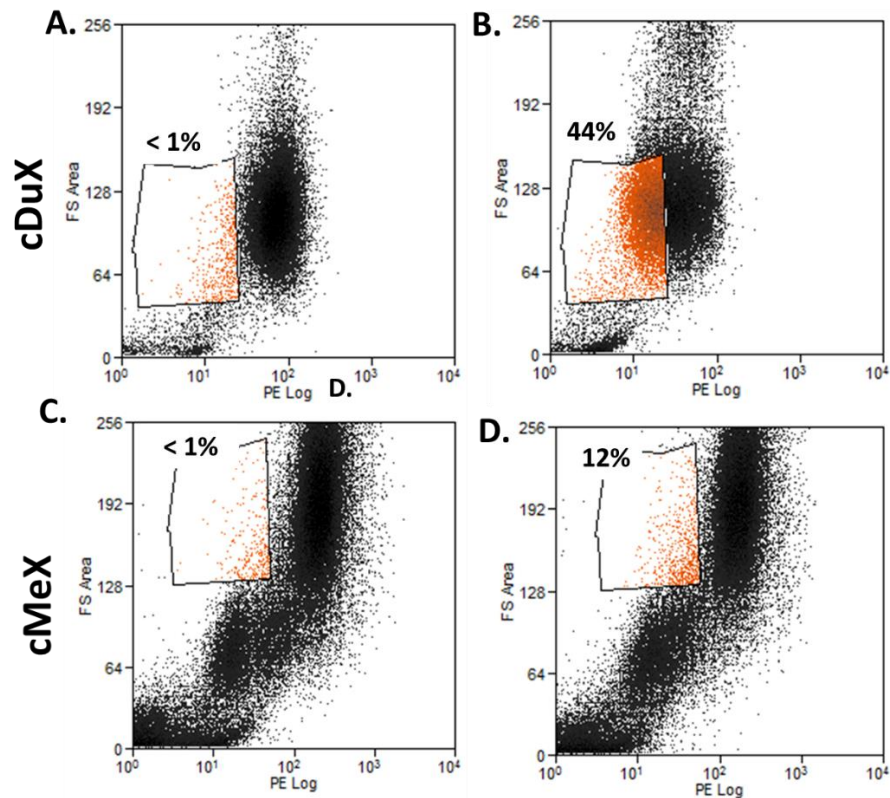


Figure 40 : Test d'exclusion de la rhodamine 123 (Rh 123). Les cellules ont été incubées en présence de Rh123 pendant 20 minutes (**A, C**) suivies d'une phase d'exclusion de 60 minutes (**B, E**). Une sous-population importante ainsi qu'une faible fraction de cellules, immatures et métaboliquement inactives retenant faiblement le marqueur Rh123 (Rh 123^{low}) a été identifiée dans les lignées *cDuX* (**A, B**) et *cMeX* (**C, D**) (n=3).

ii. Formation de sphéroïdes

Ce test fonctionnel a permis d'étudier les capacités d'autorenouveau à long terme des populations souches présentes dans nos lignées canines de mélanome. Les résultats obtenus montrent une différence significative entre les générations g1, g2 et g3 pour les sous-populations Rh 123^{high} dans lignées *cMeX* avec une amplification du nombre de colonies formées (SFU) multipliée par deux entre g1 et g2 et qui revient au niveau basal à g3 alors qu'aucune modulation n'a été rapportée pour la lignée *cDuX*. Aucune colonie n'a été observée pour la 4^e génération, pour les deux lignées, indiquant ainsi le potentiel « moins souche » de ces populations.

Contrairement aux populations Rh 123^{high}, on observe un enrichissement important du nombre de colonies de mélanosphères générées à partir des clones Rh 123^{low} sur un ensemble de quatre générations consécutives. En effet, la génération de sphéroïdes est multipliée par 3,5

entre les générations g1 et g2 ($p < 0,001$) et ne varie pas significativement entre les générations g2 à g4 (Figure 41) montrant ainsi leur potentiel d'autorenouveau à long terme et leur caractère souche (*Perego et al, 2011*).

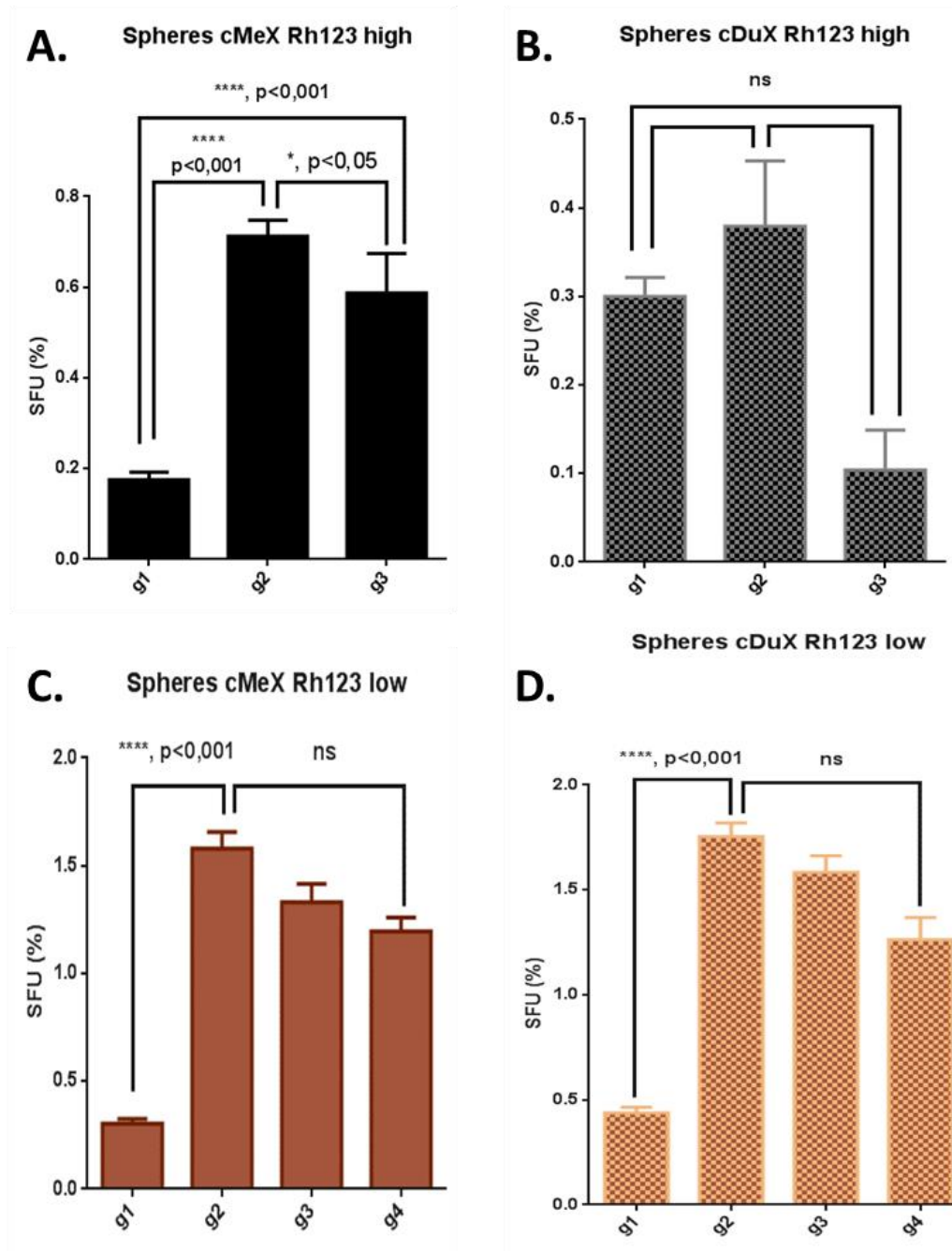


Figure 41 : Formation de sphéroïdes pour les lignées *cMeX* (A, C) et *cDUX* (B, D), sur trois générations (g1, g2 et g3) pour les cellules Rh 123^{High} (A, B) et g1 à g4 pour les populations Rh 123^{Low} (C, D) (S.F.U, *spheres forming unit*, calculé suivant la formule suivant : nombre de sphères x 100/ nombre de cellulesensemencées) (n=6, \pm sem) (ANOVA suivie d'un PLSD Fisher).

iii. Etude du cycle cellulaire

Afin de confirmer nos résultats, nous nous sommes intéressés à l'analyse du cycle cellulaire dans les populations Rh 123^{low} et Rh123^{high} après tri cellulaire de celles-ci. En effet, une des caractéristiques des cellules tumorales est leur capacité de division incontrôlée (phases S et G2/M), contrairement aux cellules quiescentes, qui maintiennent essentiellement un état en phase SubG1/G0.

L'analyse du cycle cellulaire des sphéroïdes Rh 123^{low} et Rh 123^{high} montre une différence significative ($p < 0,001$) entre les différentes phases de ces deux populations dans la lignée *cDuX* (Tableau 11).

Cellules	SubG1/ G0	G1	S	G2
Rh123 ^{low}	60,9 ± 1,3	30,6 ± 0,6	2,7 ± 0,2	6,3 ± 0,8
Rh123 ^{High}	6,9 ± 0,4	57,8 ± 0,3	18,2 ± 0,1	19 ± 0,3

Tableau 11 : Analyse des différentes phases du cycle cellulaire entre les populations Rh 123^{low} et Rh123^{high} de la lignée *cDuX*. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de chaque échantillon ± sem, (n=6).

Le pourcentage de cellules en phase SubG1/ G0 est donc important dans les populations Rh 123^{low} par rapports à Rh 123^{high}, indiquant la forte quiescence de celles-ci.

En conclusion, les lignées de mélanomes canins obtenues sont capables d'induire la formation de mélanosphères en milieux dépourvus en sérum. L'activité de la glycoprotéine p (p-gp) a été détectée dans l'ensemble des cellules étudiées mais d'amplitude variable en fonction de la lignée cellulaire, avec une très forte activité pour la lignée *cDuX*.

b. Echappement immunitaire et étude de l'interaction PD-1/ PD-L1 dans nos lignées modèles de mélanome canin

Le système immunitaire constitue une des premières barrières de défense de l'organisme face aux agressions extérieures mais permet aussi le développement d'une réponse anti-tumorale (Roitt *et al*, 1994). C'est en effet l'ensemble des altérations génétiques et phénotypiques d'une cellule cancéreuse qui apportent toutes les informations nécessaires à la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique par l'intermédiaire des cellules T cytotoxiques (CD8+) ainsi que des lymphocytes auxiliaires CD4+ (Kim *et al*, 2014).

C'est donc un équilibre continu qui est établi dans l'organisme entre la reconnaissance du soi et du non-soi permettant ainsi la prévention contre les réactions auto-immunes. Bien souvent, l'organisme élabore des stratégies d'échappement à cette réponse comme par exemple la glycosylation, le blocage par anticorps de certains antigènes tumoraux (Morrison *et al*, 2002) ou encore la surexpression de certaines protéines responsables de l'échappement à l'immunosurveillance. C'est le cas par exemple des protéines CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) et PD-1 (*Programmed Death-1*) présentes à la surface des lymphocytes, ou de PD-L1 (*Programmed Death-Ligand 1*) surexprimée à la surface des cellules tumorales et faisant actuellement l'objet de plusieurs études cliniques et de développements thérapeutiques en cancérologie (Chen & Mellman, 2013).

La molécule PD-1 et son ligand PD-L1 sont des protéines transmembranaires appartenant à la famille des immunoglobulines. Alors que l'expression de PD-1 n'a été rapportée que sur les lymphocytes B et T matures et les thymocytes ayant un phénotype CD4-/ CD8- en transition CD4+/ CD8+, son ligand PD-L1 lui est exprimé aussi bien au niveau des cellules immunitaires que non-hématopoïétiques. Ces protéines ont un rôle important dans l'immunosurveillance et la tolérance périphérique, en effet, l'interaction PD-1/ PD-L1 bloque la prolifération, la survie et induit la mort cellulaire par apoptose des lymphocytes T cytotoxiques (Merelli *et al*, 2014).

La surexpression de la protéine PD-L1 a été rapportée dans plusieurs types de cancers et pourrait être à l'origine d'immunoéchappement et de résistances tumorales au traitement. C'est le cas par exemple des carcinomes pulmonaires, les cancers ovariens mais aussi les mélanomes (Merelli *et al*, 2014, Hino *et al*, 2010).

Dans cette partie du projet, nous nous sommes intéressés à l'expression de cette protéine dans le mélanome canin ainsi qu'à la mise en place d'essais fonctionnels pour l'évaluation de son activité dans l'échappement tumoral au contrôle immunitaire.

Des analyses complémentaires ont permis d'établir le profil d'expression de cette protéine par IHC dans une étude rétrospective sur une cohorte de 53 chiens atteints de mélanome (Figure 42). Les résultats obtenus mettent en évidence l'existence de trois types tumoraux significativement différents en fonction des niveaux d'expressions de PD-L1 (forte, moyenne et faible) (Figure 42). Les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL : *tumor infiltrating lymphocytes*) sont importants pour le monitoring de la réponse anti-tumorale et la surveillance de l'immunoéchappement (Asano *et al*, 2016). Des études ont rapporté une corrélation importante entre l'expression de la protéine PD-L1 et la quantité de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ ainsi que les lymphocytes régulateurs (Treg, FoxP3+) dans le tissu tumoral (Maekawa *et al*, 2016 ; Gadiot *et al* 2011). Nous avons donc par la suite analysé l'infiltrat immunitaire dans le but de corrélérer le type tumoral au type de réponse mis en place par le système immunitaire.

Les résultats obtenus mettent en évidence la présence d'un infiltrat immunitaire CD8+ important dans les tissus exprimant faiblement PD-L1 par rapport aux tissus présentant des taux élevés de cette protéine ($p < 0,05$), pouvant ainsi correspondre à la mise en place par l'organisme d'une réponse immunitaire antitumorale. Aucune différence n'est observée entre les groupes de niveaux d'expression faible et forte (Figure 43).

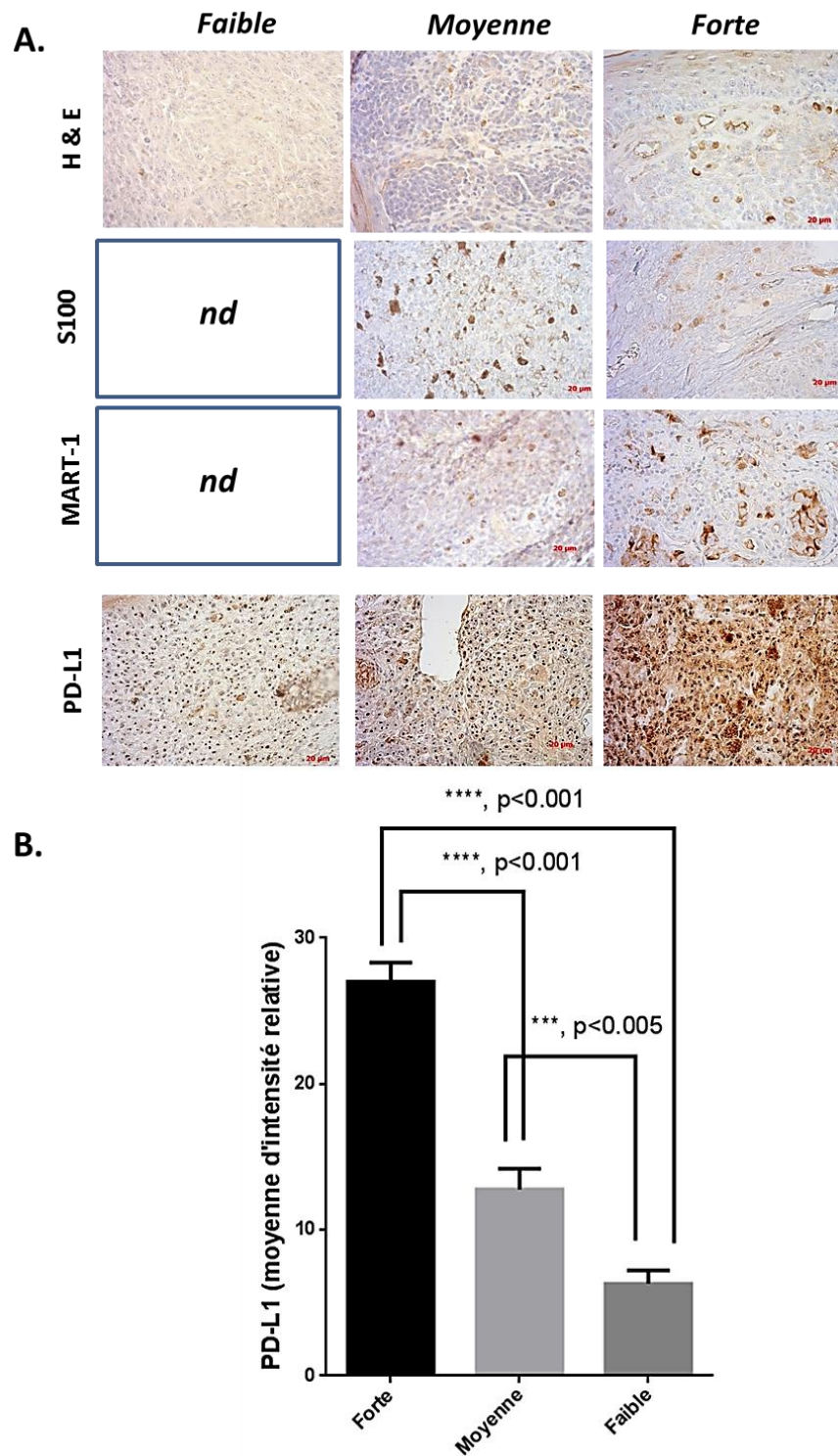


Figure 42 : Niveaux d'expression de la protéine PD-L1 par IHC sur une cohorte de 53 blocs de paraffine de mélanome canin. Les colorations par immunohistochimie permettent de distinguer trois groupes différents en fonction de l'intensité de marquage. Les protéines S100 et MART-1 ont été utilisées pour la confirmation de la nature des tumeurs (A). La quantification des marquages a été réalisée à l'aide du logiciel image J et les histogrammes élaborés à partir du logiciel GraphPad Prism® (B).

A l'inverse, aucune différence significative n'a pu être observée quant au niveau des lymphocytes T régulateurs (FoxP3+) entre les différents groupes, ne nous permettant pas de conclure sur l'effet d'une tolérance périphérique potentielle (Figure 43).

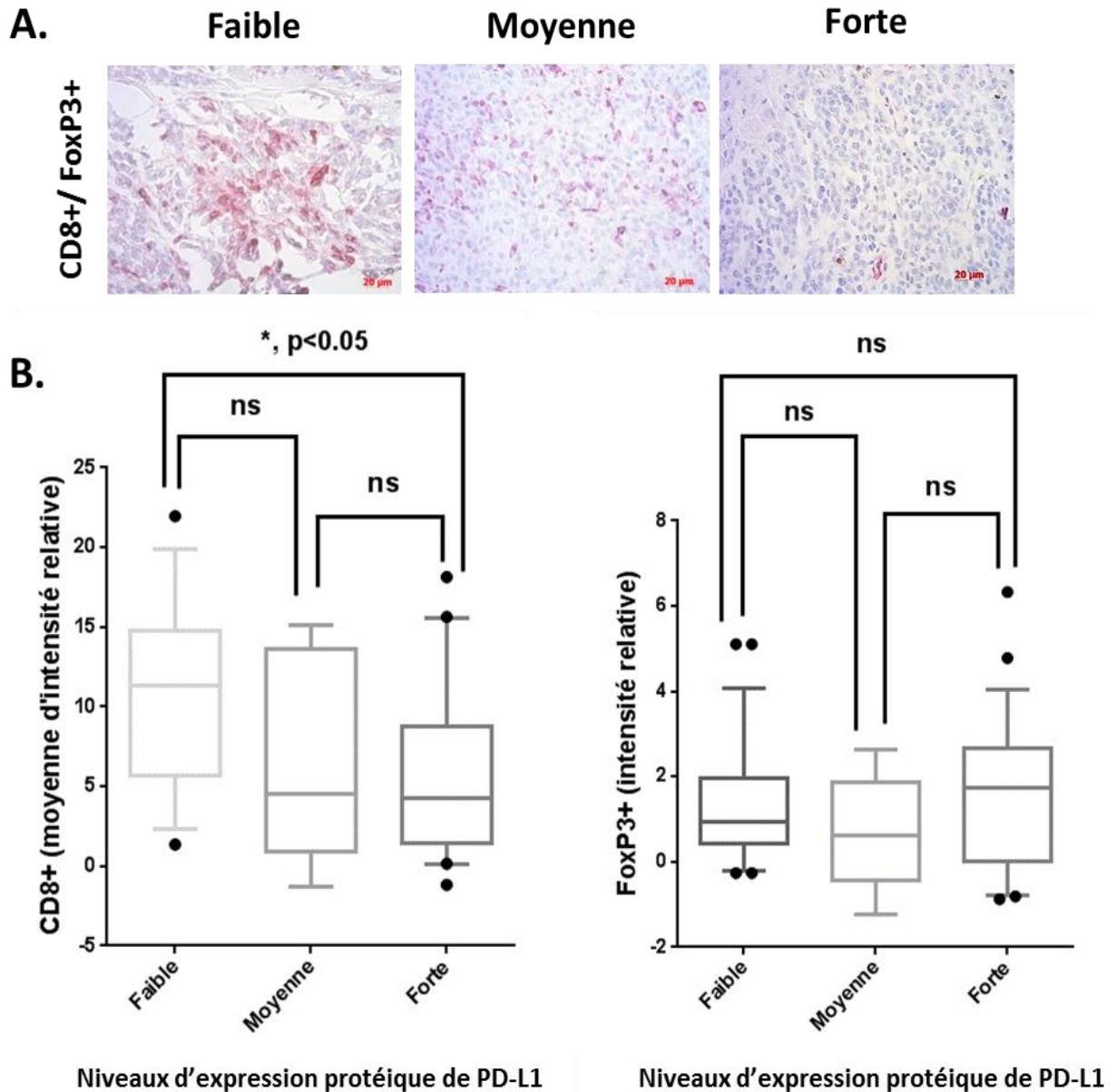


Figure 43 : Etudes de l'infiltrat lymphocytaire par IHC sur une cohorte de 53 blocs de paraffine de mélanome canin. Co-marquages des lymphocytes CD8+ / FoxP3+ (A). La quantification des marquages a été réalisée à l'aide du logiciel image J et les histogrammes élaborés à partir du logiciel GraphPad Prism® (B).

L'évaluation de l'expression de surface de PD-L1 sur notre modèle cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux. Les résultats obtenus montrent une expression importante de cet antigène dans nos deux lignées et dont l'expression augmente positivement en présence d'INF γ , comme l'ont rapporté *Maekawa et al*, dans leurs travaux (2014 et 2016) (Figure 44).

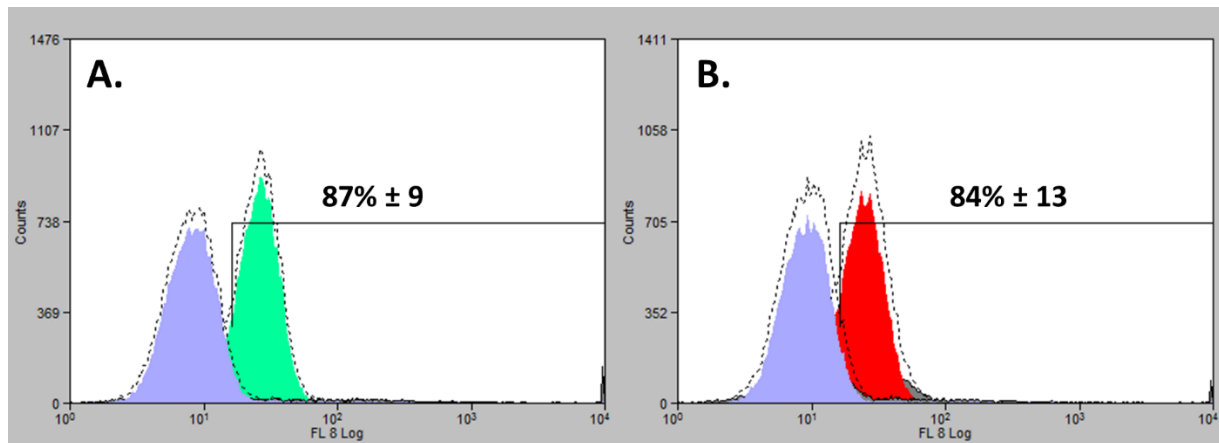


Figure 44 : Profils d'expression de la protéine PD-L1 par cytométrie de flux dans les lignées *cDuX* (A) et *cMeX* (B). L'expression de surface de la protéine PD-L1 a été évaluée à l'aide d'un anticorps couplé à la phycoérythrine (PE, clone MIH5) et les contrôles isotypiques ont été réalisés à l'aide d'un anti-IgG2a de rat, couplé à la PE. Les résultats montrent une forte expression de la protéine PD-L1 dans les deux lignées de mélanome canin et une variabilité importante en fonction du nombre de passage de chaque lignée.

L'activité lytique des cellules NK anti-tumorale chez le chien a été mise en évidence en 1983 par *Krakowka et al*, qui ont rapporté une lyse significative des cellules canines de mélanome (*Krakowka et al, 1983*).

A la suite des analyses mettant en évidence l'expression de PD-L1 dans nos lignées, nous avons donc mis en place, préalablement à l'évaluation de la lyse médiée par des lymphocytes cytotoxiques canins, un test de lyse cellulaire non-spécifique, médié par les cellules NK (*Saudemont et al, 2007*). Nous avons pu montrer à l'aide d'un test fonctionnel évaluant l'activité spécifique des caspases exécutrices 3/7 que nos modèles cellulaires étaient sensibles à la lyse non spécifique médiée par les cellules NK. Les lignées cellulaires de mélanome canin (*cDuX* et *cMeX*) ainsi que la lignée humaine A375 ont été co-cultivées en présence de cellules NK et à des ratios variables.

Les résultats obtenus montrent une reconnaissance établie entre les cellules de la lignée NK92 et nos modèles de mélanome canin, induisant à une lyse cytotoxique, dose-spécifique (Figure 45, D). Ces résultats ont été confirmés par le test de viabilité cellulaire annexine V/ IP et mettent

en évidence une corrélation entre l'augmentation de la concentration en cellules NK et les populations cellulaires A-/ PI+ (négatives à l'annexine et positives à l'iodure de propidium) en présence d'un nombre important de cellules NK (Figure 45, A, B et C).

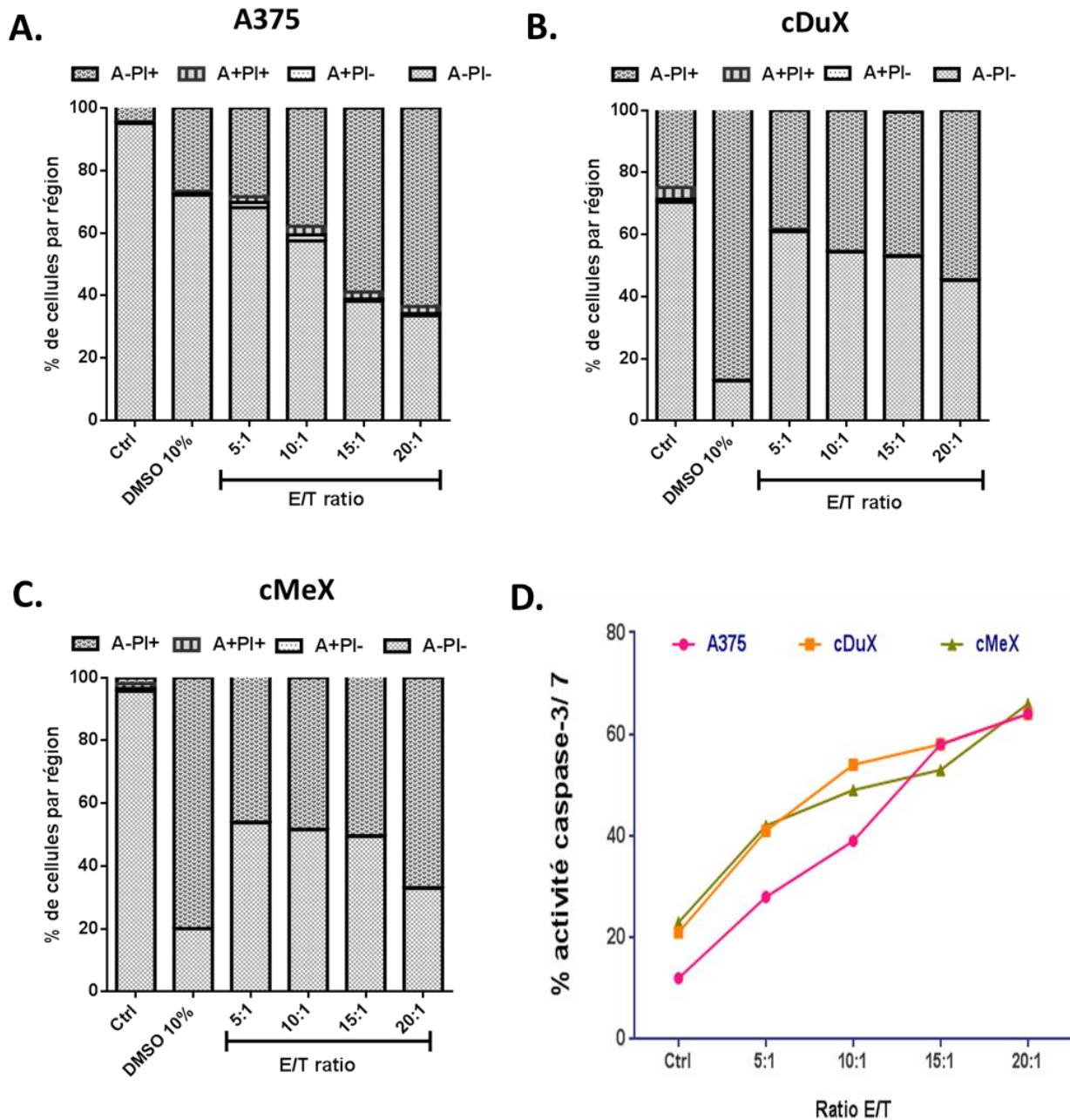


Figure 45 : Lyse non-spécifique des cellules de mélanome A375 (A), cDuX (B) et cMeX (C) par les cellules NK. L'augmentation du ratio Effecteur/ Cible (E/T) favorise l'activité caspase 3/7 dans les trois lignées étudiées (D). Les cellules de mélanome ont été cultivées en présence de concentrations variables de cellules NK pendant 24h, et les analyses de viabilité (A, B, C) et de l'activité caspase 3/7 (D) ont été réalisées par cytométrie de flux.

Les résultats préliminaires de phénotypage des populations lymphocytaires présentes au sein des PBMC canins ne nous ont pas permis de mettre en évidence la présence d'une quantité importantes de cellules CD8+. Nous n'avons donc pu purifier et expandre ces populations et poursuivre la suite de nos expériences visant à évaluer la lyse spécifique médiée par les CTL (Figure 46).

Ces résultats peuvent s'expliquer par des conditions expérimentales non optimales ou par le manque de spécificité des anticorps utilisés, non-adaptés aux prélèvements canins.

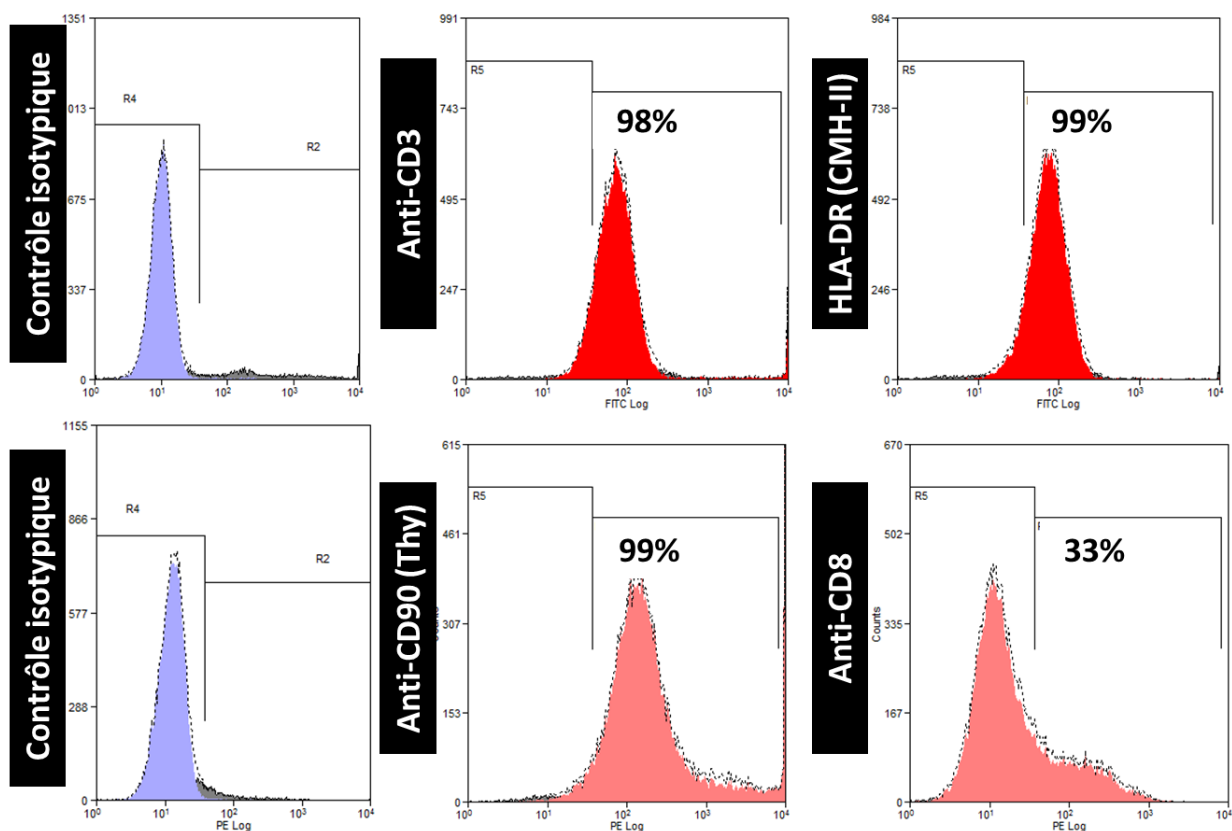


Figure 46 : Identifications des populations cellulaires présentes dans les PBMC canins par cytométrie de flux. Les cellules périphériques mononuclées ont été purifiées par un gradient de ficoll puis marquées à l'aide d'un panel d'anticorps spécifiques canins (CD3, CD4, CD8, CD45RA, Thy-1 et HLA-DE ou dirigés contre l'isoforme humaine (CD25, CD161, CD57) (cf. Matériel et Méthodes). Les cellules ont été analysées au cytomètre CyAN™ ADP Analyzer (Beckman Coulter®) et les diagrammes obtenues après analyse à l'aide du logiciel Summit® (Beckman Coulter®).

La purification de la population de départ constitue une étape nécessaire pour la croissance et la prolifération des lymphocytes CD8+. En effet, ces lymphocytes sont très sensibles aux

facteurs de croissance présents dans la niche immunitaire tels que les cytokines (*Graves et al, 2011*). Une perturbation de la signalisation de ces médiateurs entrainerait donc l'inhibition de prolifération et la senescence de ces effecteurs cytotoxiques.

Il serait donc intéressant pour la suite de ce projet de d'abord purifier ces populations avant de les expandre pour la réalisation des tests fonctionnels de lyse, à posteriori.

Discussion et perspectives

- **Caractérisation histologique**

Les mélanomes malins représentent un ensemble de tumeurs ayant un comportement agressif, une croissance rapide et en clinique vétérinaire 80% des animaux développent des métastases quelques mois après le diagnostic. Alors que les taux de survie à 5 ans avoisinent les 80% aux stades précoces, ils ne représentent que 6 à 9 mois au stade métastatique et une survie globale inférieure à 5% (*Lev et al, 2004*).

Cancer majeur chez le chien, le mélanome muqueux représente une forme rare chez l'homme et ne compte que pour 5% de l'ensemble des tumeurs mélanocytaires. De pronostic sombre, la survie moyenne rapportée pour les deux espèces est respectivement de 200 jours (*Gillard et al, 2014*) et < 25% à 5 ans (*Hicks & Flaitz, 2000*).

Le diagnostic du mélanome dès les premiers stades évolutifs reste donc important car il permet une prise en charge plus précoce de la maladie et augmente les chances de réponse.

Nous avons pu suivre l'évolution clinique de deux mélanomes muqueux de stades évolutifs différents. Les deux profils étudiés ont montré une agressivité et une évolution tumorale différentes. Le traitement de base a consisté en une chirurgie ainsi qu'une radiothérapie adjuvante locorégionale de 4 séances de 8 Gy espacées d'une semaine pour les deux cas.

Les mélanomes de la jonction cutanéomuqueuse, plus particulièrement le mélanome labial, se présentent sous une forme agressive dans plus de 70% des cas (*Schultheiss et al, 2006*). **Tania** présentait une de ces formes, puisque des atteintes neurologiques pouvant correspondre à un syndrome paranéoplasique causé par des lésions métastatiques du système nerveux central (CNS) ont été rapportées 6 mois après le début du traitement.

Ces tumeurs, de faible manifestation clinique aux premiers stades évolutifs rendent difficile leur diagnostic clinique, cytologique et histologique, et la microscopie électronique, permettant la mise en évidence des vésicules de mélanomes, reste la meilleure option pour la caractérisation et le diagnostic de certitude des mélanomes.

La caractérisation histologique a consisté en la mise en évidence de l'expression des protéines melan-A, présentes en fortes quantités dans les mélanosomes. Ce marquage nous a permis

d'isoler et d'identifier une population cellulaire d'aspects microscopique et macroscopique variables et présentant un plésiomorphisme cellulaire important dans nos modèles.

L'absence de pigmentation dans certains cas de mélanomes achromiques (*Smedley et al 2011*) en plus de la présence de certaines formes de mélanomes à différenciation ostéoïde rendent le marquage par l'antigène melan-A incomplet (*Maliver et al 2004*).

La confirmation de ces résultats a donc été primordiale pour la validation de notre modèle cellulaire. La protéine S100 marque sensiblement plus de 80% des mélanocytes (*Sandusky et al 1985*) et nous a donc permis d'établir un compte-rendu précis et complet pour la caractérisation morphologique et phénotypique de nos modèles cellulaires.

- **Caractérisation génétique et pharmacologique**

Considérée comme principale cause d'échec dans le traitement d'un certain nombre de tumeurs, la chimiothérapie est à la base de la prise en charge des patients présentant un mélanome, même si aux stades avancés de la maladie, elle est plus utilisée à but palliatif que curatif. En effet, il a été rapporté des faibles taux de réponse avec cette option thérapeutique. Pour les dérivés platinés (Carboplatine et Cisplatine), ces taux de réponse oscillent entre 15 et 28% pour l'homme et le chien (*Rassnick et al, 2001 ; Boria et al, 2004*) et sont de 14 et 13% pour la Vindesine (VDS) et la Vinorelbine (VBL) respectivement (*Quagliana et Stephens 1984*).

La Dacarbazine par exemple, agent alkylant atypique, le plus actif et le plus largement utilisé dans cette tumeur n'est efficace que dans 15 – 25% des cas uniquement (*Hill Metter et al, 1979, Lev et al, 2004*).

Les études de viabilité cellulaire nous ont permis de montrer que les lignées canines établies de mélanomes adoptent des profils pharmacologiques proches des caractéristiques cliniques de chaque cas dont elles sont issues. L'exposition continue à la Dacarbazine met en évidence une augmentation significative de la résistance des lignées établies de mélanome canin mais surtout de la lignée *cDuX* par rapport aux contrôles (*A375 et Sk-Mel 28*).

Cela nous a permis de confirmer la problématique de chimiorésistance, qui apparaît fréquemment dans le traitement du mélanome ainsi que d'évaluer l'efficacité de la

chimiothérapie combinée, qui reste à ce jour incertaine dans le traitement du mélanome métastatique (*Lev et al, 2004*).

La voie Ras-Raf-Mek-Erk joue un rôle clé dans les réponses cellulaires de croissance, de prolifération et survie dans un certain nombre de cancers. Ainsi ont été rapportés un certain nombre de mutations du gène RAS, codant pour trois protéines HRAS, KRAS et NRAS dans 20 -25% de cancers chez l'homme et des mutations similaires ont été mises en évidence dans les carcinomes pulmonaires et les leucémies chez le chien (*Mochizuki et al 2015a*).

En 2002, des mutations activatrices pour le gène codant BRAF, un membre de la famille RAF ont été identifiées et ont conduit au développement d'inhibiteurs spécifiques. C'est le cas du Vémurafenib, ciblant spécifiquement la protéine kinase BRAF et ayant obtenu une AMM en 2011 pour le traitement des mélanomes métastatiques non-résécables mutés BRAF V600E, forme la plus répandue chez l'homme (*Brose et al, 2002 ; Flaherty et al, 2010 et 2011*).

La mutation BRAF V600E conduit à l'activation constitutive de la voie MAPK dérégulée dans plusieurs cancers chez l'homme jouant un rôle important de l'initiation de la mélanomagenèse. Cette activation mime une phosphorylation, s'en suit alors une activité kinase élevée en aval de cette voie de signalisation (*Roskoski, et al, 2010*).

L'étude de l'effet Vémurafénib sur nos lignées *cDuX* et *cMeX* montre un effet significatif supposant donc la présence de cette mutation dans notre modèle. Nous avons par la suite confirmé ces résultats en étudiant la phosphorylation de la protéine MEK par western blot et comme déjà démontré par *Decker et al* en 2015.

Les altérations géniques sont à la base de la transformation maligne des mélanomes. Les résultats de caractérisation génomique ont pu démontrer une amplification de cet oncogène (chromosome 16, région 8222912-8311618, gain log₂ ratio > 0.9) dans nos modèles. Ces résultats ont cependant besoin d'être confirmés par des analyses supplémentaires notamment par séquençage classique Sanger ou par des études de transcriptome (RNASeq) (*Gillar et al, 2014*) et font actuellement l'objet de collaborations pour la suite du projet.

Une exposition prolongée aux rayons UV est souvent rapportée comme facteur favorisant et augmentant le risque de développement de mélanome chez l'homme. En effet, les radiations sont responsables de plus de 65% des mélanomes humains et conduisent à la libération de radicaux libres oxygénés causant des cassures double brin de l'ADN et des anomalies

chromosomiques, entraînant par la suite des dysfonctionnements cellulaires (*Sulaimon & Kitchell, 2003*).

Les mélanomes canins de la cavité buccale sont souvent non-uv dépendants et possèdent rarement cette mutation V600E de l'oncogène BRAF (*Maldonado et al, 2003 ; Edwards et al, 2004 ; Shelly et al, 2005 ; Chudnovsky et al 2005*). Elle ne constitue donc pas une cause majeure de développement de ces tumeurs chez le chien même si un risque stochastique n'est pas à exclure selon *Sulaimon & Kitchell, 2003*.

L'exon 15 de BRAF est très conservé entre les espèces. C'est en effet dans deux études récentes qu'a été mise en évidence une mutation BRAF V595E, orthologue de la mutation humaine V600E (transversion d'une thymidine (T) par une Adénine (A) en position 8296284 du chromosome 16 (CanFam 3.1), dans 6% des mélanomes canins (*Mochizuki et al, 2015b, Decker et al, 2015 Gillard et al, 2014*), ce faible pourcentage pouvant s'expliquer par le nombre très limité de cas étudiés (*Richter et al 2005*).

Ces mutations ainsi identifiées chez le chien soulignent l'importance de ces mécanismes dans les processus de cancérogenèse. L'étude de la dérégulation de cette voie dans le modèle canin permet donc d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine des processus de cancérogenèse dans le mélanome et permettra de guider les études *in-vivo* pour l'identification des facteurs intervenant dans la réponse et la résistance aux traitements de ces tumeurs.

Bien que cette altération moléculaire oncogénique soit présente dans plus de 82% des nævi dysplasiques et 17% des tumeurs canines (*Mochizuki et al, 2015*) elle reste insuffisante pour expliquer l'agressivité de certaines tumeurs métastatiques et nécessite la présence d'altérations complémentaires.

Un ensemble de proto-oncogènes est donc impliqué dans la régulation, la croissance et la différenciation des mélanocytes malins (*Modiano et al, 1999*). Ainsi des dérégulations génétiques majeures dans le mélanome ont été rapportées parmi lesquelles la surexpression de *c-myc*, ayant un rôle prépondérant dans la progression tumorale du mélanome chez le chien. On note également l'altération du profil d'expression des protéines de transduction du signal comme par exemple la protéine kinase c-Kit, impliquée dans la voie PI3K/ Akt et jouant un rôle important dans la différenciation tardive et anormale des mélanoblastes embryonnaires (*Sulaimon & Kitchell 2003 ; Lahav et al, 2005*).

Nous avons donc par la suite étudié le profil génomique des modèles établis par hybridation comparative (CGH). Les résultats obtenus montrent deux profils génomiques distincts et des altérations correspondant aux données de la littérature (*Poorman et al, 2015*). Nous avons donc pu mettre en évidence une perte de la fonction des gènes *Cdkn2a* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*) au niveau du chromosome 11 mais aussi une désorganisation chromosomique autour des régions codant pour les gènes *Pten* et *Rb* (*Reinoblastoma tumor suppressor*), anomalies génétiques les plus fréquemment rencontrées lors de mélanomes bénins et malins canins (*Koenig et al 2002*).

Parmi les dérégulations les plus importantes dans le mélanome, l'altération de la fonction des cyclines engendre une dérégulation de la division cellulaire (*Cullen et al, 2002*). L'inactivation temporaire des protéines inhibitrices prive donc la cellule de toute possibilité d'inhibition de la mitose et entraîne donc une croissance et une prolifération incontrôlées (*Modiano 1999*).

La famille CDKN2 code pour un ensemble de protéines inhibant les protéines CDK (*Cyclin Dépendant Kinase*) intervenant dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. C'est le cas des protéines p15 (INK4B/ CDKN2B), p16 (INK4A/ CDKN2A), p19 (*Arf*/ CDKN2D) et enfin p21 (*Waf*/ CDKN1B) (*Smith et al 2002 ; Chudnovsky et al 2005*).

Koenig et al (2002) rapportent que la mutation d'INK4a est l'une des anomalies génétiques caractérisant plus de 50% des mélanomes humains et est considéré de ce fait comme un gène de prédisposition familiale au mélanome les plus importants.

L'ensemble de ces événements ainsi que la perte concomitante de l'expression de la protéine *Rb*, déjà rapportée dans une lignée de mélanome canin (CML-6MC2) (*Modiano et al 1999*) ne sont donc pas aléatoires mais correspondent à un complexe d'instabilité génomique tardive important et en faveur de la pathogénèse des mélanomes humains et canins (*Chudnovsky et al 2005*).

En effet, la dérégulation des niveaux d'ARNm de ces gènes a déjà été rapportée (*Ritt et al. 1998 ; Koenig et al. 2002 ; Bianco et al. 2003*). L'identification de ces variations du nombre de copies suggère par conséquent des mécanismes par lesquels les tumeurs régulent l'expression de gènes à l'origine de la tumorigénèse du mélanome muqueux canin mais aussi au développement de résistances à la chimiothérapie.

Le codon 61 de l'exon 2 de l'oncogène NRAS est l'un des sites les plus fréquemment mutés dans les mélanomes humains (*Richter et al 2005*), avec une fréquence avoisinant 36%, représentant ainsi une position critique dans cette pathologie (*Mayr et al 2003*). En coopération avec la mutation CDKN2A, la substitution Q61K de cette protéine est ainsi importante pour la promotion et l'initiation de la tumeur (*Delmas et al, 2007*).

Parallèlement à la voie MAPK, PI3K/Akt représente l'une des voies les plus importantes dans les néoplasies malignes et surtout dans les mélanomes muqueux chez l'homme et chez le chien où elle est souvent associée à la perte de la phosphatase PTEN (*Wee et al 2008 ; Shull et al, 2012 ; Turri-Zanoni et al, 2012 et Fowles et al, 2013*).

Nous avons pu démontrer au cours de ces travaux l'activation constitutive de cette voie dans notre modèle cellulaire. Une des perspectives intéressante de ce travail serait l'identification des mutations pertinentes décrites plus haut et rapportées récemment dans une étude visant à caractériser génétiquement une cohorte de 153 chiens présentant des mélanomes muqueux (*Gillar et al, 2014*).

- **Caractérisation fonctionnelle**

L'identification des modèles cellulaires par CGH a permis de mettre en évidence une amplification du gène de l'aldéhyde déshydrogénase, isoenzyme impliquée dans la transformation et le métabolisme d'un certain nombre d'aldéhydes intracellulaires, conférant ainsi une résistance à un certain nombre d'agents de chimiothérapies tels que le cyclophosphamide (*Magni et al, 1996 ; Sophos et al, 2003*). Des niveaux élevés de cette enzyme ont été rapportés dans un certain nombre de cellules souches cancéreuses (*Hess et al, 2006 ; Corti et al, 2006*). Les mélanomes représentent un ensemble de tumeurs très hétérogènes, des travaux récents ont établi un lien évident entre la capacité tumorigène de ces cellules et l'activité ALDH (*Boonyaratanakornkit et al, 2010 ; Luo et al, 2012*).

Nous nous sommes donc intéressés par la suite à l'étude des populations souches tumorales et avons pu démontrer la présence de deux populations cellulaires différentes dans les modèles établis comme l'ont rapporté des résultats antérieurs sur des lignées de mélanomes humain et murin (*Touil et al, 2013*). Il existerait donc une compartimentation ayant des caractéristiques particulières et des sensibilités différentes aux stimuli environnementaux. Les populations

Rh123^{low} présentent en effet des caractéristiques de cellules quiescentes à faible taux d'auto-renouvellement comme le rapportent les résultats d'étude du cycle cellulaire. Il est donc important de confirmer ces résultats par l'étude des facteurs protéiques intervenant dans la régulation de la division cellulaire de ces populations comme les cyclines (*Cyclin D1 et CDK-4*) et le marqueur *Ki67* par exemple dont la différence d'expression est discriminante pour la croissance et de la prolifération cellulaires (*Touil et al, 2013*).

Les études précédentes ont permis de souligner un effet important de la voie PI3K/Akt, laissant à penser qu'elle jouerait un rôle majeur dans la dormance tumorale des mélanocytes malins en permettant le maintien de cette quiescence mais aussi en autorisant la sortie de cet état en cas d'agression thérapeutique (*Touil et al, 2013*). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'inactivation de cette voie sur l'enrichissement des populations Rh123^{low} à l'aide d'inhibiteurs spécifiques.

Le mélanome malin est malheureusement synonyme d'échecs thérapeutiques (*Soengas & Lowe 2003*). La complexité et les mécanismes de résistance de ces tumeurs rendent impuissants les cliniciens et les chercheurs face sa capacité à contourner les stratégies thérapeutiques les plus innovantes (*Zaretsky et al, 2016*). C'est pourquoi il est nécessaire de mettre en place des nouveaux modèles, avatars des cancers humains, afin de décrypter ces mécanismes et mieux les combattre.

Ces mécanismes restent encore mal définis (*Mantwill 2000, Nikolaou Stratigos et al 2011*). Il existerait deux types de résistances, intrinsèque et acquise (*Gatti & Zunino 2005*). La première est innée et les tumeurs sont initialement insensibles au produit. La seconde se développe au fur et à mesure de l'exposition au traitement par activation des pompes à efflux p-gp (*Guminski Harnett et al, 2002*).

L'expression et l'élimination par transport actif grâce aux pompes à efflux représente l'une des principales voies d'échappement des cellules tumorales face à la chimiothérapie (*Stavrovskaya, 2000*). Plusieurs études ont rapporté l'enrichissement des populations ABCB5+ suite à l'exposition à un produit de chimiothérapie (*Chartrain et al, 2012*).

La série de tests fonctionnels a permis l'identification de populations présentant une forte activité à efflux ABCB1/ ABCB5-like, caractéristique des CSC et synonyme de résistance au traitement. Pour la suite de ce projet, il sera essentiel d'identifier ces populations notamment à l'aide de marqueurs de surface tels que l'antigène CD133, OCT-4 ou encore M-CAM (*Melanoma Cell Adhesion Molecule*) (*Touil et al, 2013*). Cette molécule d'adhésion, spécifique

du mélanome est le premier marqueur de progression tumorale identifié chez l'homme et dont l'expression est proportionnelle à la capacité de dissémination tumorale de la tumeur (*Guezguez et al 2006*).

Les résultats préliminaires des tests de viabilité en présence de Dacarbazine (DTIC) montrent une différence de réponse au traitement entre les populations quiescentes présentant des caractéristiques de cellules souches et les populations dites « normales », non-souches. Il serait ainsi intéressant de réaliser ces tests sur cellules triées Rh123low afin de confirmer cette différence de sensibilité et ces propriétés de chimiorésistance, caractéristiques de ces populations.

Enfin, la capacité de ces CSC à initier la formation de tumeur dans un modèle *in-vivo* de nos modèles canins reste à établir, comme déjà rapporté par *Shatton et al (2008)*. Nous avons pu mettre en évidence la différence du potentiel tumorigène entre les populations dites « souches » et les populations « non-souches » dans un modèle murin immunodéficient. Ces résultats préliminaires doivent cependant être confirmés.

- **Etude de l'axe PD-1 / PD-L1**

L'hétérogénéité tumorale du mélanome est souvent responsable de la mise en place de mécanismes de résistance et d'échappement au traitement (*Roesch, 2015*). Parmi les limites identifiées dans le traitement des mélanomes, le pourcentage des patients répondant au traitement et la durée de réponse avant la rechute constituent les principaux obstacles dans la prise en charge de ces tumeurs.

Il est évident depuis bien longtemps que le système immunitaire joue un rôle important dans la réponse anti-tumorale. En effet, l'échappement immunitaire constitue une voie par laquelle le tissu tumoral contourne et esquive les différents contrôles et stratégies mises en place pour l'éradication des tumeurs.

Ces mécanismes mis en évidence par plusieurs travaux se traduisent par exemple par la perte d'expression du CMH, une surexpression du ligand Fas ou alors une sécrétion accrue de TGFβ (*Gadiot et al, 2010*).

C'est dans cet axe que ce sont concentrés plusieurs programmes de développement R&D ces dernières années. On cite par exemple la découverte et la mise sur le marché de l'Ipilimumab, anticorps monoclonal ciblant spécifiquement CTLA-4 (*Hodi et al, 2010*) ou encore des anti-PD-1 comme le Nivolumab ayant eu des réponses intéressantes dans le traitement du mélanome métastatique (*Deeks et al, 2014 ; Hersey et al, 2015 ; Mashima et al, 2015*).

Par ailleurs, les agents de chimiothérapie renforcent la réponse anti-tumorale en atténuant les réponses immunosuppressives aux lymphocytes Treg (*Walter et al, 2012*). De plus, des études récentes ont pu démontrer des propriétés immunomodulatrices de l'agent de chimiothérapie, la Dacarbazine (*Ugruel et al, 2013*). En effet, d'après les travaux de *Hervieu et al, (2013a)*, cette molécule est non seulement cytotoxique mais exerce en plus des effets stimulateurs sur le microenvironnement tumoral par une activation locale des cellules NK et des cellules T, CD8+ (CTL). Elle participe ainsi à l'initiation des réponses immunitaires en augmentant l'expression du ligand liant le récepteur NKG2D à la surface des mélanocytes tumoraux murins et humains (*Hervieu et al, 2013b*).

La protéine PD-L1 est connue pour sa grande contribution dans les mécanismes d'immuno-échappement. Sa surexpression a été mise en évidence dans un certain nombre de cancers humains et canins, soulignant ainsi l'importance de cette cible (*Zigler et al, 2008 ; Massi et al, 2014 ; Maekawa et al, 2014*). Nous avons pu démontrer lors de ce projet de thèse que les mélanomes canins exprimaient cet antigène à des niveaux d'expression variables. Nous avons aussi pu mettre en évidence l'expression de cette protéine dans notre modèle cellulaire et démontré l'efficacité de la lyse non spécifique par les cellules NK.

La synergie de réponse entre la chimiothérapie, la radiothérapie et l'immunothérapie est un phénomène bien connu et validé par un certain nombre d'essais cliniques chez l'homme (*Robert et al, 2011*). L'irradiation conduirait en effet à la surexpression de la protéine PD-L1 mais aussi à l'augmentation des populations souches, favorisant ainsi la réponse au traitement (*Lagadec et al, 2010 ; Bramhall et al, 2014 ; Deng et al, 2014 ; Herter-Sprue et al, 2016*).

Il serait donc intéressant pour la suite de ce projet d'étudier les effets des rayonnements ionisants sur l'expression de cette protéine et la potentialisation possible de l'effet des molécules ciblant spécifiquement cet axe aussi bien *in-vitro* sur nos modèles cellulaires qu'*in-vivo*, par la mise en place d'essais cliniques.

Malgré sa différence de localisation, le mélanome canin de la cavité buccale partage avec son homologue humain bien plus d'aspects, cliniques et biologiques, que n'importe quel autre

modèle. Les résultats obtenus lors de ce travail de thèse mettent en évidence un certain nombre de caractéristiques se rapprochant de la pathologie humaine, de la résistance au traitement à la présence de facteurs de résistance tout en passant par les variations génomiques, faisant de ce modèle, un outil pertinent pour le développement et l'amélioration des traitements en cancérologie humaine. Cependant, face au manque d'outils de recherche spécifique, la standardisation de ce modèle dans le paysage de recherche clinique classique peine à se développer (*Porrello et al, 2006*). Il est donc nécessaire aujourd'hui de remédier à ce problème afin d'accélérer le processus translationnel entre la médecine humaine et vétérinaire, pour une meilleure prise en charge en oncologie.

II. Validation clinique

Evaluation préalable d'un composé anti-mitotique dans les modèles de mélanomes canin établis

1. Effets du composé **16a** sur la morphologie cellulaire des lignées modèles de mélanome canin

Les effets du composé **16a** sont observés en microscopie optique. En effet, les cellules traitées avec ces molécules induisent le détachement des cellules adhérentes et l'altération de l'intégrité de la membrane plasmique pouvant être mise en évidence à l'aide d'un marquage au bleu de trypan. Contrairement au **16c** qui n'a aucun effet (Figure 47).

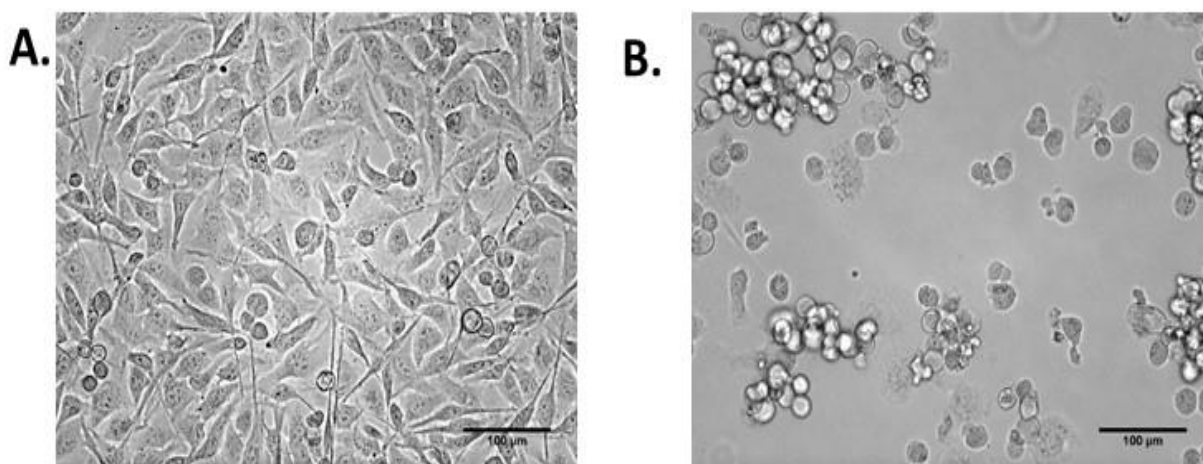


Figure 47 : Impact des molécules **16c** (A) et **16a** (B) sur la morphologie cellulaire de la lignée *cMeX*; les cellules sont incubées 24h en présence du composé à tester, et à une concentration de 1 µM puis observées au microscope optique à contraste de phase (dispositif EVOS® FLoid® Cell Imaging Station), grossissement x20.

2. Analyse du cycle cellulaire

Les diagrammes obtenus montrent une différence significative entre les deux molécules. On observe en effet une augmentation importante et dose dépendante du pourcentage de cellules en phase G2/M pour les cellules traitées au composé **16a** par rapport au composé **16c**. Ainsi, à partir de 100 nM, une inhibition de la croissance de plus de 50% des populations traitées avec le composé **16a** est observée pour les deux lignées de mélanome canin. Cette augmentation est dose dépendante, à partir de 1 µM, plus de 90% des cellules sont bloquées en phase G2/M (Figure 48).

Cet effet est saturable, car à partir d'une certaine concentration la molécule n'a plus d'effet sur le blocage du cycle cellulaire. Ce phénomène pourrait s'expliquer par les effets de résistance aux traitements que pourrait développer la cellule au fur et à mesure de son exposition à des

doses fréquentes et de plus en plus croissantes du composé. En effet, comme nous avons pu le démontrer dans la première partie, nos modèles cellulaires présentent une activité plus ou moins importante des pompes à efflux de type p-glycoprotéine (*MDR : multidrug resistance*).

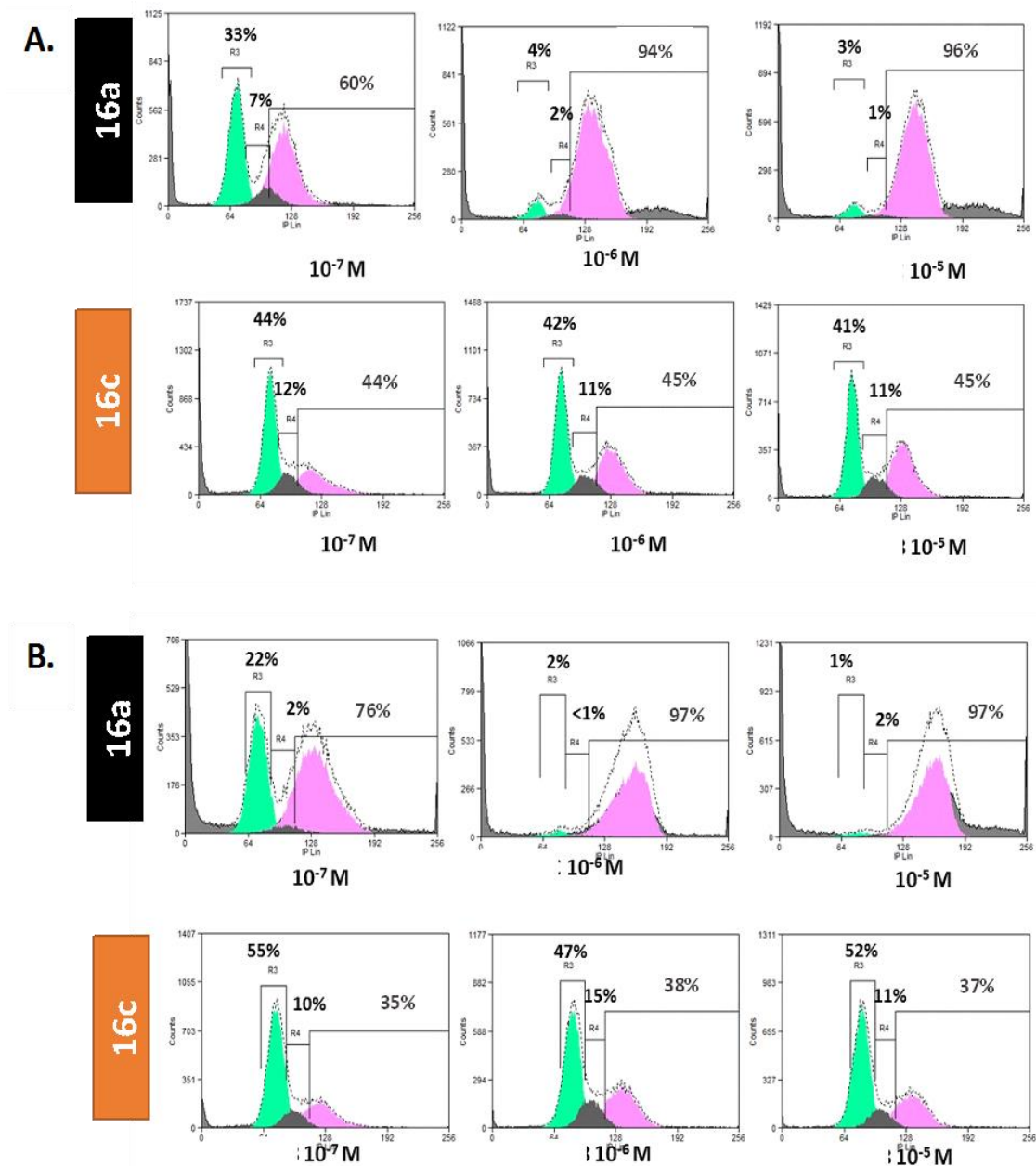


Figure 48 : Effets du composé 16a vs. 16c sur le cycle cellulaire. les cellules (A) *cDUX* et (B) *cMeX* sont incubées pendant 24h avec chaque composé, elles sont ensuite fixées à l'éthanol 70% froid et marquée AN à l'iodure de propidium (IP) (50 µg/mL) en présence de 5µg de RNase. La fluorescence cellulaire est mesurée au cytomètre (CyAN™ ADP Analyzer, Beckman Coulter, Inc.) et les résultats sont enregistrés à l'aide du logiciel Summit ® (respectivement phases G1 en vert, S en gris et G2/M en rose).

3. Etude de la prolifération des modèles cellulaires de mélanome canin traités par ces deux composés

Afin d'étudier les effets du composé **16a** sur les capacités de réparation cellulaire, nous avons mis en place un modèle de la blessure (ou 'wound-healing' assay) (*Moreno-Bueno et al, 2009*), qui fait appel à la fois aux capacités de migration et de prolifération des cellules tumorales.

Les résultats obtenus montrent une diminution de la cinétique de réparation pour les cellules traitées au composé **16a** par rapport au contrôle (DMSO 1% et cellules non-traitées) ; en revanche il n'y a pas d'impact sur la réparation et la prolifération cellulaires du groupe traité au composé **16c** (Figure 49 et Figure 50). En effet, dès 3 heures une diminution significative de la réparation est rapportée dans les cellules traitées au **16a** par rapport aux groupes contrôle, DMSO 1% et **16c** pour la lignée *cMeX* uniquement ($p < 0,05$). Une cicatrisation quasi complète est atteinte 22 heures après l'initiation de la blessure pour les cellules contrôles, **16c** et DMSO 1% par rapport au groupe **16a** (résultats non montrés).

Le composé **16a** présente donc un effet inhibiteur significatif sur la migration et la prolifération cellulaires en empêchant la formation de pseudopodes.

L'effet de cette molécule sur la migration transendothéliale reste cependant à évaluer, notamment par la mise en place de test de transmigration en chambre de *Boyden* par exemple.

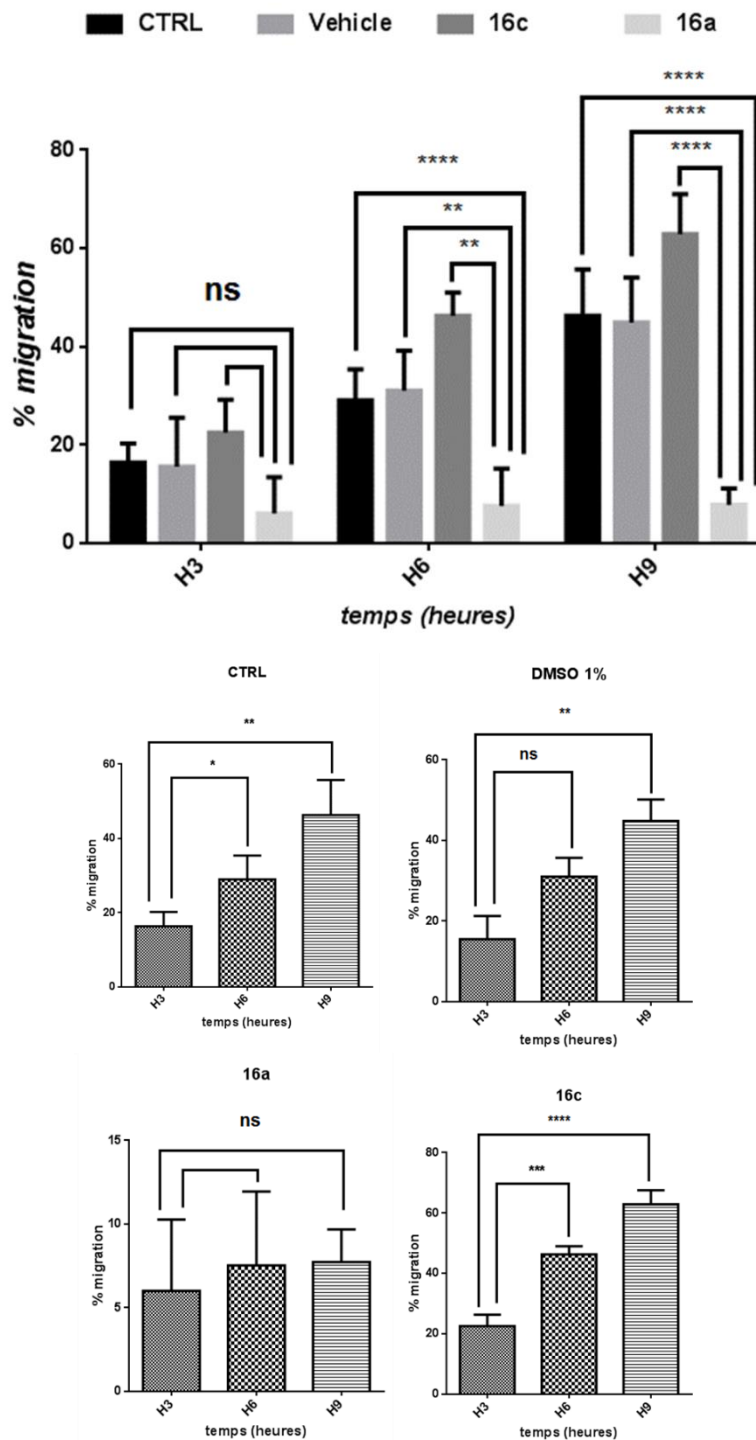


Figure 49 : Modèle de cicatrisation cellulaire en monocouche pour la lignée *cDuX*. Lorsqu'elles sont à confluence, 24 à 48h après mise en culture, la plaie est initiée à l'aide d'un cône 200 μ L, les cellules sont ensuite incubées 9h en présence de 1 μ M du composé *16a*, *16c* ou 1% de DMSO (*vehicle*). Les histogrammes représentent la surface de la plaie cicatrisée, la quantification de la surface de la plaie est exprimée par le ratio des moyennes de largeur mesurées dans trois puits différents et réalisée à l'aide du logiciel *ImageJ*[®] ; ns : non-significatif, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $P < 0.005$ et **** $p < 0.001$.

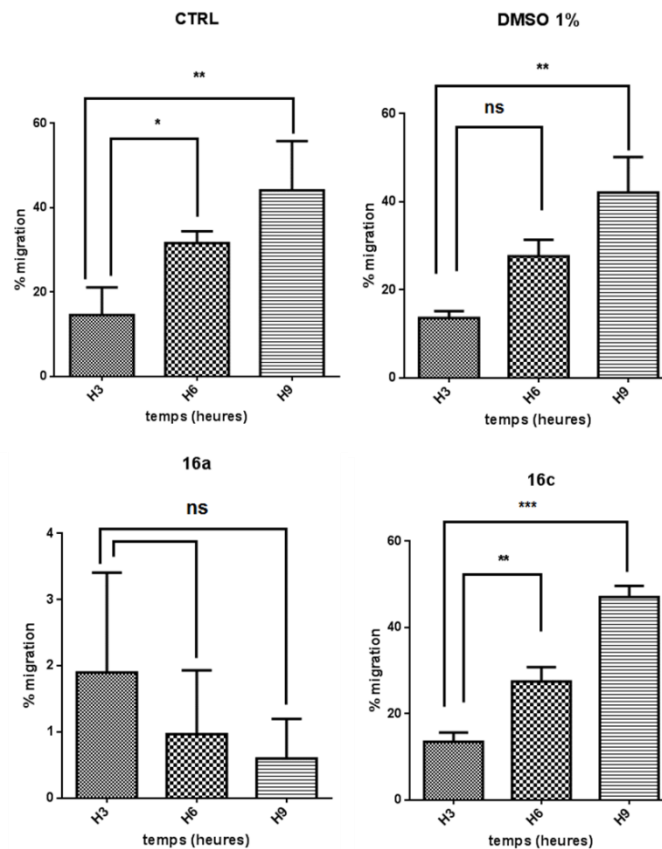
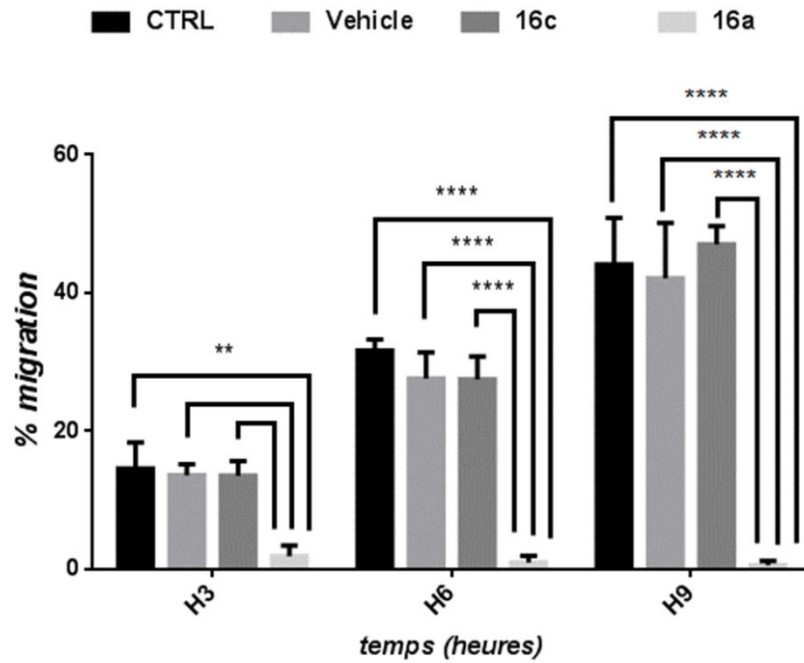


Figure 50 : Modèle de cicatrisation cellulaire en monocouche pour la lignée *cMeX*. Les histogrammes représentent la surface de la plaie cicatrisée, la quantification de la surface de la plaie est exprimée par le ratio des moyennes de largeur mesurées dans trois puits différents et réalisée à l'aide du logiciel *ImageJ*® (moyenne \pm sem) ; ns : non-significatif, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $P < 0.005$ et **** $p < 0.001$.

Discussion et perspectives

Dans cette seconde partie du projet nous nous sommes intéressés à l'évaluation d'une série de petites molécules liant le site d'interaction de la colchicine, dérivé naturel ayant la capacité d'inhiber la croissance et la prolifération cellulaires, entraînant ainsi une inhibition de la polymérisation de la tubuline et un blocage du cycle cellulaire.

Une dérégulation du cycle cellulaire associée à un défaut d'apoptose est souvent observée au cours de la cancérogenèse. Plusieurs études ont montré que l'inhibition des régulateurs du cycle cellulaire aurait un impact potentiel sur la croissance tumorale (*Dumontet et al, 2010*). La tubuline est une protéine importante dans le maintien de l'architecture et des fonctions cellulaires. Entrant dans la composition des microtubules, elle joue un rôle crucial dans le processus de division cellulaire. Ainsi le ciblage de cette structure constitue une option d'intérêt dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement du cancer.

Nous avons concentré nos efforts sur l'étude de l'interaction de deux composés, analogues structuraux diversifiés de la colchicine, et entrant en interaction avec les dimères $\alpha\beta$ de tubuline grâce à un criblage d'une série de molécules (*Segoula et al, 2016*), sur un large panel de lignées cellulaires cancéreuses.

Une activité cytotoxique assez forte et intéressante a permis d'isoler le composé **16a** pour des études plus approfondies dans la poursuite de notre projet. Un deuxième composé, le **16c**, ne présentant aucune activité biologique, a été choisi comme contrôle négatif.

Nos résultats montrent une activité inhibitrice du composé **16a** sur la croissance et la prolifération cellulaires d'un ensemble de lignées de mélanomes. Cette activité pharmacologique est observée à de très faibles doses, allant de l'ordre du nano (nM) au micromolaire (μM).

La molécule **16a** agit donc sur l'inhibition de la croissance et la prolifération cellulaire par l'intermédiaire d'un blocage du cycle cellulaire, en phase G2/M, comme le montrent nos données de cycle cellulaire.

A la suite de ce blocage, la cellule entre dans un processus apoptotique aboutissant à la mort cellulaire. Les cellules adoptent un aspect sphérique, suite à une désorganisation totale du cytosquelette ; structure stabilisatrice de l'architecture cellulaire, et responsable du maintien et du bon fonctionnement de la machinerie cellulaire. Cela entraîne l'activation de la chaîne des

caspases et le déclenchement de l'apoptose par le recrutement d'un nombre de médiateurs dont les protéines caspases, étape finale du processus de mort.

L'activité du composé **16a** est donc spécifique au blocage de la polymérisation des microtubules en élongation. En effet, les résultats préliminaires sur sphéroïdes, cellules en état de quiescence et dépourvues de division cellulaire ne montrent aucune activité significative de notre molécule par rapport au composé contrôle, la molécule **16c**. C'est pourquoi il est nécessaire aujourd'hui de combiner plusieurs thérapeutiques anti-tumorales afin d'augmenter les chances de réponses cliniques, de prolonger les médianes de survies des patients et espérer à long terme, une remission complète (*Long et al, 2015 ; Cully et al, 2015*).

Les inhibiteurs de tubuline, appartenant à la famille des analogues de la colchicine ont, en plus de leurs fonctions inhibitrices du cycle cellulaire, des propriétés anti-angiogènes. En effet, ces molécules ont la capacité d'induire une désorganisation du réseau vasculaire au niveau des cellules endothéliales, privant ainsi la tumeur de son réseau vasculaire et donc de nutriments nécessaires à sa croissance et à sa prolifération. Une inhibition significative du composé **16a** sur la formation de vaisseaux a été démontrée dans un test d'angiogenèse *in-vitro* consistant en la formation de tubes vasculaires par des cellules endothéliales issues de sang de cordon, dans une matrice en matrigel (*HUVEC tube formation assay*) (*Segoula et al, 2016*).

Le composé **16a** induit des changements importants dans la plasticité des microtubules, entraînant une instabilité dynamique de ces derniers et conduisant à une modification de la morphologie cellulaire. Une dernière étape, nécessaire pour la validation de nos tests *in-vitro* serait donc l'évaluation des effets de celui-ci sur la migration transendothéliale de nos cellules tumorales de mélanome canin (*Ghislin et al, 2012*).

Enfin, l'évaluation des effets *in-vivo* du composé **16a** dans un modèle syngénique de mélanome murin, par la greffe sous-cutanée de cellules murines B16F10 (*Bouvard, et al, 2014b*) nous a permis de mettre en évidence un effet antiangiogène et anti-tumoral.

Le développement de nouvelles entités chimiques (NEC) est aujourd'hui en pleine expansion (*Adams et al, 2015*). Ces poisons du fuseau sont à l'origine de la découverte des agents perturbateurs des microtubules, une révolution il y a 40 ans. A l'ère de la révolution génomique et des thérapies ciblées, leur utilisation en cancérologie a largement reculé en raison des fortes toxicités associées à l'utilisation de ces agents (*Dobbelstein et al, 2014*).

Les inhibiteurs de tubuline en revanche ont toujours montré un intérêt en raison de leur efficacité, même relativement faible. Ces molécules sont toujours prescrites dans certains cancers en association à des thérapies ciblées, à la radiothérapie ou en thérapie néoadjuvante ou adjuvante (*Dumontet et al, 2010*).

La compréhension des mécanismes moléculaires et de l'architecture structurale des cellules tumorales est donc d'un intérêt majeur pour l'amélioration des composés en développement visant les fonctions protéiques ayant un rôle important dans la machinerie cellulaire. Le composé idéal doit donc être stable, efficace à des concentrations très faibles et entraînant le moins de toxicités tout en contournant les phénomènes de résistance.

Nous avons pu mettre en place au laboratoire deux modèles cellulaires de mélanomes canins, dont le profil de réponse au composé **16a** est identique aux lignées humaines. Ces études, combinées aux essais cliniques vétérinaires en cours sur des composés en phase de développement thérapeutique en médecine humaine, nous permettent d'avancer dans le processus de validation du modèle canin de maladie spontanée et de souligner son importance dans l'étude de la pathologie humaine.

Conclusion générale

Conclusion générale

Face aux restrictions réglementaires, l'industrie pharmaceutique enregistre aujourd'hui un ralentissement alarmant dans le développement des thérapeutiques anticancéreuses (*DiMasi et al, 2007*). Il a été rapporté en effet que sur une période de 10 ans de R&D, environ 800 nouvelles entités chimiques ont été développées en oncologie, dont seulement 5% capables de franchir l'ensemble des points de contrôle du développement préclinique (*Gupta et al, 2013*). Le manque d'efficacité et les toxicités associées sont à l'origine de plus de 30% des échecs (*Kamb et al 2007, Campone et Fernel 2012*).

Le processus de développement pharmaceutique a un coût conséquent et a été évalué approximativement à plus de 1,8 milliards de dollars (*Khanna & Paoloni 2008*). Entre 1991 et 2000, il a été rapporté qu'environ 11% des molécules en développement seulement atteignaient la phase d'AMM. Ce chiffre varie en fonction des divisions thérapeutiques, il est par exemple plus important en cardiologie qu'en cancérologie (20% vs. 5%) (*Kola-Landis et al, 2004*).

Il y a aujourd'hui une évolution dans la réflexion de la recherche en cancérologie, en raison d'un schéma de développement trop classique et non-adapté à l'oncologie (*Gordon & Khana, 2010*). En effet, le cancer regroupe un certain nombre de pathologies partageant la même caractéristique commune, une prolifération cellulaire anarchique et incontrôlée, mais qui diffèrent sur les plans moléculaire et clinique (*Lorio et al, 2016*). La chirurgie, la radio et la chimiothérapie ont depuis toujours constitué la base de la thérapie anticancéreuse. Ces traitements lourds entraînent souvent des toxicités importantes et sont associés à des faibles taux de survie. Et même si cette dernière a été améliorée durant les 20 dernières années grâce à l'essor des thérapies ciblées et de l'immunothérapie, il n'est pas possible à l'heure actuelle parler de guérison, mais plutôt de survie sans progression (*Winslow et al, 2014*).

La nécessité de modèles plus prédictifs et de biomarqueurs de réponse et de suivi reste donc primordiale pour une meilleure prise en charge des patients souffrant de cette maladie. Il a été rapporté récemment que les modèles vétérinaires de maladie spontanée présentaient des avantages intéressants pour répondre aux questions posées lors de l'élaboration d'un essai clinique (*Hansen & Khanna, 2004*). L'oncologie comparée étudie le développement de cancers spontanés sur des animaux de compagnie et cherche à établir des liens entre la médecine humaine et vétérinaire, constituant ainsi une passerelle entre le développement préclinique et clinique. Cette stratégie a donc pour but d'éliminer les molécules sans intérêt potentiel et

déterminer la dose efficace (profil pharmacocinétique (PK) et pharmacodynamique (PD)) à utiliser chez l'Homme.

La séquence du génome canin est connue depuis 2005. Composée de 2,4 milliards de paires de bases et 39 paires de chromosomes, elle est responsable d'une des plus importantes diversités phénotypiques retrouvées dans les 175 races canines et attribuable à la domestication de cette espèce. S'ils n'ont pas d'uniformité génétique contrairement aux animaux de laboratoire, les chiens ont l'avantage de présenter un polymorphisme moins important que l'homme et plus de 18000 gènes sont conservés entre les deux espèces. Certaines races par exemple comme les terriers Ecosais développent 30 fois plus de carcinomes transitionnels de la vessie que d'autres espèces (*Dobson et al, 2013*). De plus, le chien est la seule espèce développant naturellement des carcinomes métastatiques de la prostate (*Davis et al, 2014*), faisant du chien domestique un outil avantageux pour l'étude et l'identification de gènes de prédispositions à certains types de néoplasies.

L'ensemble des avantages exposés précédemment permet donc une analyse approfondie des traits génétiques associés à chaque tumeur conduisant *in-fine* à la mise en évidence de facteurs génétiques à l'origine de chaque cancer générant ainsi un ensemble de données pertinentes, exploitables et transposables à l'homme (*Gillard et al, 2014*).

Bien que rare, les mélanomes canins sont d'un grand intérêt diagnostique et pronostique pour l'étude des cancers chez l'homme car ils partagent des caractéristiques histologiques, moléculaires et cliniques comparables aux tumeurs humaines (*Vail et al, 2000 ; Bianco et al, 2003*).

Le modèle spontané canin a la particularité de présenter un schéma d'étude clinique non similaire à la médecine humaine et des temps de développement relativement courts (3 ans vs. 5 à 15 ans chez l'homme pour un essai randomisé) (*Hansen et Khanna 2004*). Cette approche présente donc de nombreux avantages par rapport aux modèles classiques de laboratoire. Les modèles rongeurs sont en effet utiles pour étudier les mécanismes de la carcinogenèse mais moins efficaces pour la prédiction de la réponse à un traitement. Par ailleurs, les chiens disposent d'un système immunitaire intact et partagent le même environnement que leurs homologues humains constituant ainsi un modèle sentinelle. Ils permettent d'approfondir nos connaissances dans un grand nombre de pathologies et de réduire l'écart d'informations, fondamental pour le pilotage et une mise en place plus rapide et moins coûteuse des essais cliniques chez l'homme.

Références

A

- Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, et al. (1985) The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318:533–38
- Adams, JL., Smothers, J., Srinivasan, R., and Hoos, A. (2015). Big opportunities for small molecules in immuno-oncology. *Nat Rev Drug Discov* 14, 603–622.
- Adams, VJ., Evans, KM., Sampson, J., and Wood, JLN. (2010). Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *J Small Anim Pract* 51, 512–524.
- Ailles, LE, and Weissman, IL. (2007). Cancer stem cells in solid tumors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 460–466.
- Al-Hajj, M., Wicha, MS., Benito-Hernandez, A., Morrison, SJ., and Clarke, MF. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3983–3988.
- American Cancer Society, 2006; Cancer Facts and figures, <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/caff2006pwsecuredpdf.pdf>
- Amé-Thomas, P., and Tarte, K. (2014). The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin. Cancer Biol.* 24, 23–32.
- Annereau, J-P, Brel, V., Dumontet, C, Guminski, Y, Imbert, T, Broussas, M, Vispé, S, Bréand, S, Guilbaud, N, Barret, J-M, et al. (2010). A fluorescent biomarker of the polyamine transport system to select patients with AML for F14512 treatment. *Leuk. Res.* 34, 1383–1389.
- Aresu, L., Aricò, A, Comazzi, S, Gelain, ME, Riondato, F, Mortarino, M, Morello, E, Stefanello, D, and Castagnaro, M (2014). VEGF and MMP-9: biomarkers for canine lymphoma. *Vet Comp Oncol* 12, 29–36.
- Asano, Y., Kashiwagi, S., Goto, W., Kurata, K., Noda, S., Takashima, T., Onoda, N., Tanaka, S., Ohsawa, M., and Hirakawa, K. (2016). Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. *Br J Surg* 103, 845–854.
- Ascierto, PA., and Marincola, FM. (2015). 2015: The Year of Anti-PD-1/PD-L1s Against Melanoma and Beyond. *EBioMedicine* 2, 92–93.
- Asnani, A. & Peterson, R. T. (2014) The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. *Dis. Model. Mech.* 7, 763–767.
- Axiak-Bechtel, SM., Maitz, CA., Selting, KA., and Bryan, JN. (2015). Preclinical imaging and treatment of cancer - The use of animal models beyond rodents. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* Sep;59(3):303-16.
- Aydinlik H, Nguyen TD, Moennikes O, Buchmann A, Schwarz M. 2001. Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of β -catenin-mutated mouse liver tumors. *Oncogene* 20:7812–16.

B

- Badoual, C., Hans, S., Merillon, N., Ryswick, C.V., Ravel, P., Benhamouda, N., Levionnois, E., Nizard, M., Si-Mohamed, A., Besnier, N., et al. (2013). PD-1–Expressing Tumor-Infiltrating T Cells Are a Favorable Prognostic Biomarker in HPV-Associated Head and Neck Cancer. *Cancer Res* 73, 128–138.
- Baneux, P.J.R., Martin, M.E., Allen, M.J., and Hallman, T.M. (2014). Issues Related to Institutional Animal Care and Use Committees and Clinical Trials Using Privately Owned Animals. *ILAR Journal* 55, 200–209.
- Barker, C.A., Postow, M.A., Khan, S.A., Beal, K., Parhar, P.K., Yamada, Y., Lee, N.Y., and Wolchok, J.D. (2013). Concurrent radiotherapy and ipilimumab immunotherapy for patients with melanoma. *Cancer Immunol Res* 1, 92–98.
- Baselga, J. (2006). Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* 312, 1175–1178.
- Bataille, V., and Vries, E. de (2008). Melanoma—Part 1: epidemiology, risk factors, and prevention. *BMJ* 337, a2249.
- Beard C, Hochedlinger K, Plath K, Wutz A, Jaenisch R. 2006. Efficient method to generate single-copy transgenic mice by site-specific integration in embryonic stem cells. *Genesis* 44:23–28
- Bergman, P.J.; Wolchok, J.D. (2008) Of mice and men (and dogs): Development of a xenogeneic DNA vaccine for canine oral malignant melanoma. *Cancer Ther*, 6, 817–826
- Bergman, P.J.; Kent, M.S.; Farese, J.P. (2013) in *Small Animal Clinical Oncology*, 5th ed.; by Withrow, S.J., Vail, D.M., Page, R.L., Eds.; (Elsevier Saunders: St. Louis, MO, USA) Melanoma; pages 321–334.
- Bianco, S.R., Sun, J., Fosmire, S.P., Hance, K., Padilla, M.L., Ritt, M.G., Getzy, D.M., Duke, R.C., Withrow, S.J., Lana, S., et al. (2003). Enhancing antimelanoma immune responses through apoptosis. *Cancer Gene Ther* 10, 726–736.
- Bianco, S.R.; Sun, J.; Fosmire, S.P.; Hance, K.; Padilla, M.L.; Ritt, M.G.; Getzy, D.M.; Bibby MC. (2004) Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer*; 40(6):852–857.
- Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* 17, 320–329.
- Boiko, A.D., Razorenova, O.V., van de Rijn, M., Swetter, S.M., Johnson, D.L., Ly, D.P., Butler, P.D., Yang, G.P., Joshua, B., Kaplan, M.J., et al. (2010). Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* 466, 133–137.
- Bolon, B., Calderwood Mays, M.B., and Hall, B.J. (1990). Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Vet. Pathol.* 27, 96–102.
- Bonnett, B., Egenvall, A., Hedhammar, Å. and Olson, P. (2005). Mortality in over 350,000 Insured Swedish dogs from 1995–2000: I. Breed-, Gender-, Age- and Cause-specific Rates. *Acta Vet Scand* 46, 105–120.

- Boonyaratanakornkit, J.B., Yue, L., Strachan, L.R., Scalapino, K.J., LeBoit, P.E., Lu, Y., Leong, S.P., Smith, J.E., and Ghadially, R. (2010). Selection of tumorigenic melanoma cells using ALDH. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 2799–2808.
- Boria, P.A.; Murry, D.J.; Bennett, P.F.; Glickman, N.W.; Snyder, P.W.; Merkel, B.L.; Schlittler, D.L.; Mutsaers, A.J.; Thomas, R.M.; Knapp, D.W. (2004) Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, *224*, 388–394
- Bouvard, C., Barefield, C., and Zhu, S. (2014a). Cancer stem cells as a target population for drug discovery. *Future Medicinal Chemistry* *6*, 1567–1585.
- Bouvard, C., Segoula, Z., De Arcangelis, A., Galy-Fauroux, I., Mauge, L., Fischer, A.-M., Georges-Labouesse, E., and Helley, D. (2014b). Tie2-dependent deletion of $\alpha 6$ integrin subunit in mice reduces tumor growth and angiogenesis. *International Journal of Oncology* *45*, 2058 - 2064.
- Bracha, S., McNamara, M., Hilgart, I., Milovancev, M., Medlock, J., Goodall, C., Wickramasekara, S., and Maier, C.S. (2014). A multiplex biomarker approach for the diagnosis of transitional cell carcinoma from canine urine. *Anal. Biochem.* *455*, 41–47.
- Bramhall, R.J., Mahady, K., and Peach, A.H.S. (2014). Spontaneous regression of metastatic melanoma – Clinical evidence of the abscopal effect. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* *40*, 34–41.
- Brose, M.S., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Gerrero, R., Einhorn, E., Herlyn, M., Minna, J., Nicholson, A., et al. (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res.* *62*, 6997–7000.
- Bu, X., Mahoney, K.M., and Freeman, G.J. (2016). Learning from PD-1 Resistance: New Combination Strategies. *Trends Mol Med.* Jun; *22*(6):448-51.
- Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2007). PD-L1 interacts specifically with B7-1 to inhibit T cell proliferation. *Immunity* *27*, 111–122.

C

- Campone, M., and Frenel, J.-S. (2012). Phase 1 en oncologie. Le défi de développer de nouveaux agents thérapeutiques à l'ère de la médecine personnalisée. *Médecine nucléaire* *36*, 228–232.
- Cancedda, S., Rohrer Bley, C., Aresu, L., Dacasto, M., Leone, V.F., Pizzoni, S., Gracis, M., and Marconato, L. (2016). Efficacy and side effects of radiation therapy in comparison with radiation therapy and temozolomide in the treatment of measurable canine malignant melanoma. *Vet Comp Oncol* *14*, e146–e157.
- Carlson, R.O. (2008). New tubulin targeting agents currently in clinical development. *Expert Opinion on Investigational Drugs* *17*, 707–722.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* *407*, 249–257.

- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 10, 417–427.
- Casero, R.A., and Marton, L.J. (2007). Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 373–390.
- Cataldo, V.D., Gibbons, D.L., Pérez-Soler, R., and Quintás-Cardama, A. (2011). Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 364, 947–955.
- Cekanova M, Lee SH, Donnell RL, et al. (2009) Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 expression inhibits urethane-induced pulmonary tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Prev Res (Phila)*;2(5): 450–458.
- Cekanova, M. & Rathore, K. (2014) Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Design, Development and Therapy* 1911. 14; 8:1911-21.
- Chartrain, M., Riond, J., Stennevin, A., Vandenberghe, I., Gomes, B., Lamant, L., Meyer, N., Gairin, J.E., Guilbaud, N., and Annereau, J.P. (2012). Melanoma Chemotherapy Leads to the Selection of ABCB5-Expressing Cells. *PloS One* 7, e36762.
- Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 39, 1–10.
- Chen, T.T.; Berman, D.M.; Wolchok, J.D. (2015) Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol*, 33, 1889–1894.
- Chen, Z., Cheng, K., Walton, Z., Wang, Y., Ebi, H., Shimamura, T., Liu, Y., Tupper, T., Ouyang, J., Li, J., et al. (2012). A murine lung cancer co-clinical trial identifies genetic modifiers of therapeutic response. *Nature* 483, 613–617.
- Cheon, D.-J., and Orsulic, S. (2011). Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol* 6, 95–119.
- Chin L, Pomerantz J, Polsky D, et al. (1997) Cooperative effects of INK4a and Ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes Dev*; 11: 2822–2834.
- Chudnovsky, Y., Khavari, P.A., and Adams, A.E. (2005). Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* 115, 813–824.
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 313–319.
- Colak, S., and Medema, J.P. (2014). Cancer stem cells--important players in tumor therapy resistance. *FEBS J.* 281, 4779–4791.
- Corti, S., Locatelli, F., Papadimitriou, D., Donadoni, C., Salani, S., Del Bo, R., Strazzer, S., Bresolin, N., and Comi, G.P. (2006). Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells* 24, 975–985.
- Costin GE, Hearing VJ. (2007) Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*; 21:976-94
- Cullen, J.M., Page, R., and Misdorp, W. (2002). An Overview of Cancer Pathogenesis, Diagnosis, and Management. In *Tumors in Domestic Animals*, D.J.M. DVM, ed. (Iowa State Press), pp. 1–44.
- Cully, M. (2015). Trial watch: Combinations with checkpoint inhibitors at wavefront of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 14, 374–375.

D

- Dankort D, Curley DP, Carlidge RA, et al. (2009) Braf V600E cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature Genet*; 41: 544–552.
- Davies, M.A., and Kopetz, S. (2013). Overcoming Resistance to MAPK Pathway Inhibitors. *JNCI J Natl Cancer Inst* 105, 9–10.
- Davis, B.W., and Ostrander, E.A. (2014). Domestic dogs and cancer research: a breed-based genomics approach. *ILAR J* 55, 59–68.
- De Braud, F., Khayat, D., Kroon, B.B.R., Valdagni, R., Bruzzi, P., and Cascinelli, N. (2003). Malignant melanoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 47, 35–63.
- Decker, B., Parker, H.G., Dhawan, D., Kwon, E.M., Karlins, E., Davis, B.W., Ramos-Vara, J.A., Bonney, P.L., McNiel, E.A., Knapp, D.W., et al. (2015). Homologous Mutation to Human BRAF V600E Is Common in Naturally Occurring Canine Bladder Cancer--Evidence for a Relevant Model System and Urine-Based Diagnostic Test. *Molecular Cancer Research* 13, 993–1002.
- Deeks, E.D. (2014). Nivolumab: A Review of Its Use in Patients with Malignant Melanoma. *Drugs* 74, 1233–1239.
- Delevoeye, C., Giordano, F., van Niel, G., and Raposo, G. (2011). La biogenèse des mélanosomes. *Med Sci (Paris)* 27, 153–162.
- Delmas, V., Beermann, F., Martinozzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., Denat, L., Goodall, J., Luciani, F., Viros, A., et al. (2007). Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev.* 21, 2923–2935.
- Deng, L., Liang, H., Burnette, B., Beckett, M., Darga, T., Weichselbaum, R.R., and Fu, Y.-X. (2014). Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *Journal of Clinical Investigation* 124, 687–695.
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. (1996) Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*; 274 (5286):430–432.
- Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, et al. (2009) Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 15, 294–303.
- Diez-Torre A, Andrade R, Eguizábal C, et al. (2009) Reprogramming of melanoma cells by embryonic microenvironments. *Int J Dev Biol* 53, 1563–1568.
- DiMasi, J.A., and Grabowski, H.G. (2007). Economics of New Oncology Drug Development. *Journal of Clinical Oncology* 25, 209–216.
- Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.
<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022990561&categorieLien=id>
- Dobbelstein, M., and Moll, U. (2014). Targeting tumour-supportive cellular machineries in anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 13, 179–196.

- Dobson, J.M. (2013). Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. International Scholarly Research Notices 2013, e941275, Veterinary Science: Volume 2013 (2013), Article ID 941275, 23 pages.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, et al. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215–21.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* 5, 1365–1369.
- Données épidémiologiques de l'INCA, 2014. Les Cancers en France, Edition 2014 – Institut National du Cancer, <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-Edition-2014>
- Dorléans, A., Gigant, B., Ravelli, R.B.G., Mailliet, P., Mikol, V., and Knossow, M. (2009). Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13775–13779.
- Dovey M, White RM, Zon LI. (2009) Oncogenic NRAS cooperates with p53 loss to generate melanoma in zebrafish. *Zebrafish* 6, 397–404.
- Dudley M.E., Wunderlich, J.R., Shelton, T.E., Even, J., and Rosenberg, S.A. (2003). Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *Journal of Immunotherapy* (Hagerstown, Md.: 1997) 26, 332.
- Duke, R.C.; Withrow, S.J.; Lana, S.; et al. (2003) Enhancing anti melanoma immune responses through apoptosis. *Cancer Gene Ther*, 10, 726–736.
- Dumontet, C., and Jordan, M.A. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 9, 790–803.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991–998.

E

- Edwards, R.H., Ward, M.R., Wu, H., Medina, C.A., Brose, M.S., Volpe, P., Nussen-Lee, S., Haupt, H.M., Martin, A.M., Herlyn, M., et al. (2004). Absence of BRAF mutations in UV-protected mucosal melanomas. *J. Med. Genet.* 41, 270–272.
- Einarsdottir BO, Bagge RO, Bhadury J, et al. (2014) Melanoma patient-derived xenografts accurately model the disease and develop fast enough to guide treatment decisions. *Oncotarget*; 5, 9609–9618.

F

- Feng Y, Santoriello C, Mione M, et al. (2010) Live imaging of innate immune cell sensing of transformed cells in zebrafish larvae: parallels between tumor initiation and wound inflammation. *PLoS Biol* 2010; 8:e1000562.
- Feng Y, Renshaw S, Martin P. (2012) Live imaging of tumor initiation in zebrafish larvae reveals a trophic role for leukocyte-derived PGE2. *Curr Biol*; 22: 1253–1259.
- Fenger JM, London CA, Kisseberth WC. 2014. Canine osteosarcoma: a naturally occurring disease to inform pediatric oncology. *ILAR J.* 55(1):69–85
- Fichtner, I., Rolff, J., Soong, R., Hoffmann, J., Hammer, S., Sommer, A., Becker, M., and Merk, J. (2008). Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers. *Clin. Cancer Res.* 14, 6456–6468.
- Fidler IJ. (1973) Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature New Biol* 1973; 242: 148–149.
- Fidler, I.J., and Ellis, L.M. (2004). Neoplastic angiogenesis--not all blood vessels are created equal. *N. Engl. J. Med.* 351, 215–216.
- Fiebig, H.-H., Schüler, J., Bausch, N., Hofmann, M., Metz, T., and Korrat, A. (2007). Gene signatures developed from patient tumor explants grown in nude mice to predict tumor response to 11 cytotoxic drugs. *Cancer Genomics-Proteomics* 4, 197–209.
- Finn, O.J. (2008). Cancer immunology. *N. Engl. J. Med.* 358, 2704–2715.
- Fisher, R., Pusztai, L., and Swanton, C. (2013). Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br. J. Cancer* 108, 479–485.
- Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K., et al. (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine* 363, 809–819.
- Flaherty, K.T., Yasothan, U., and Kirkpatrick, P. (2011). Vemurafenib. *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 811–812.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182–1186.
- Fowles, J.S., Denton, C.L., and Gustafson, D.L. (2013). Comparative analysis of MAPK and PI3K/AKT pathway activation and inhibition in human and canine melanoma. *Veterinary and Comparative Oncology*; Sep;13(3):288-304.
- Frank, N.Y., Pendse, S.S., Lapchak, P.H., Margaryan, A., Shlain, D., Doeing, C., Sayegh, M.H., and Frank, M.H. (2003). Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* 278, 47156–47165.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027–1034.

- Freeman, K.P.; Hahn, K.A.; Harris, F.D.; King, G.K. (2003) Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy (1987–1997). *J. Vet. Intern. Med*, 17, 96–101
- Frei, E., Holland, J.F., Schneiderman, M.A., Pinkel, D., Selkirk, G., Freireich, E.J., Silver, R.T., Gold, G.L., and Regelson, W. (1958). A Comparative Study of Two Regimens of Combination Chemotherapy in Acute Leukemia. *Blood* 13, 1126–1148.
- Frijhoff AF, Conti CJ, Senderowicz AM. (2004). Advances in molecular carcinogenesis: current and future use of mouse models to screen and validate molecularly targeted anticancer drugs. *Mol. Carcinog.* 39:183–94
- Fulchiero, E., and Jimeno, A. (2014). Nivolumab. *Drugs Today* 50, 791–802.

G

- Gadiot, J., Hooijkaas, A.I., Kaiser, A.D.M., van Tinteren, H., van Boven, H., and Blank, C. (2011). Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma. *Cancer* 117, 2192–2201.
- Galluzzi, L., Vacchelli, E., Bravo-San Pedro, J.-M., Buqué, A., Senovilla, L., Baracco, E.E., Bloy, N., Castoldi, F., Abastado, J.-P., Agostinis, P., et al. (2014). Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* 5, 12472–12508.
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Zanetti, R., Masini, C., Boyle, P., and Melchi, C.F. (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur. J. Cancer* 41, 2040–2059.
- Ganis, J.J., Hsia, N., Trompouki, E., de Jong, J.L.O., DiBiase, A., Lambert, J.S., Jia, Z., Sabo, P.J., Weaver, M., Sandstrom, R., et al. (2012). Zebrafish globin switching occurs in two developmental stages and is controlled by the LCR. *Dev. Biol.* 366, 185–194.
- Garber, K. (2009). From human to mouse and back: “tumorgraft” models surge in popularity. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 6–8.
- Garraway, L.A. (2014). A Notch for Noncoding RNA in Melanoma. *New England Journal of Medicine* 370, 1950–1951.
- Gartner, L.P., and Hiatt, J.L. (2013). *Color Atlas and Text of Histology* (Philadelphia: LWW).
- Gatti, L., and Zunino, F. (2005). Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods Mol. Med.* 111, 127–148.
- Gauthier, M.J., Aubert, I., Abrams-Ogg, A., Woods, J.P., and Bienzle, D. (2005). The immunophenotype of peripheral blood lymphocytes in clinically healthy dogs and dogs with lymphoma in remission. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19, 193–199.
- Gavriel, H.; McArthur, G.; Sizeland, A.; Henderson, M. (2011) Review: Mucosal melanoma of the head and neck. *Melanoma Res*, 21, 257–266.
- Gentry, A.C., Pitts, S.L., Jablonsky, M.J., Bailly, C., Graves, D.E., and Osheroff, N. (2011). Interactions between the etoposide derivative F14512 and human type II

- topoisomerases: implications for the C4 spermine moiety in promoting enzyme-mediated DNA cleavage. *Biochemistry* 50, 3240–3249.
- Ghislin, S., Obino, D., Middendorp, S., Boggetto, N., Alcaide-Loridan, C., and Deshayes, F. (2012). LFA-1 and ICAM-1 expression induced during melanoma-endothelial cell co-culture favors the transendothelial migration of melanoma cell lines in vitro. *BMC Cancer* 12, 455.
 - Gillard, M., Cadieu, E., De Brito, C., Abadie, J., Vergier, B., Devauchelle, P., Degorce, F., Dréano, S., Primot, A., Dorso, L., et al. (2014). Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res* 27, 90–102.
 - Goel VK, Lazar AJF, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. (2006) Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J. Investig. Dermatol.* 126:154–60
 - Gogas, H., Polyzos, A., and Kirkwood, J. (2013). Immunotherapy for advanced melanoma: fulfilling the promise. *Cancer Treat. Rev.* 39, 879–885.
 - Goldschmidt, M.H. (1985). Benign and malignant melanocytic neoplasms of domestic animals. *Am J Dermatopathol* 7 *Suppl*, 203–212.
 - Goldschmidt, M.H. (1994). Pigmented lesions of the skin. *Clin. Dermatol.* 12, 507–514.
 - Goldstone, J.V., McArthur, A.G., Kubota, A., Zanette, J., Parente, T., Jönsson, M.E., Nelson, D.R., and Stegeman, J.J. (2010). Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. *BMC Genomics* 11, 643.
 - Gong, J.H., Maki, G., and Klingemann, H.G. (1994). Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 8, 652–658.
 - Goodman, V.L., Rock, E.P., Dagher, R., Ramchandani, R.P., Abraham, S., Gobburu, J.V.S., Booth, B.P., Verbois, S.L., Morse, D.E., Liang, C.Y., et al. (2007). Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 13, 1367–1373.
 - Gordon, I.K., and Khanna, C. (2010). Modeling opportunities in comparative oncology for drug development. *ILAR J* 51, 214–220.
 - Gorlick, R., and Khanna, C. (2010). Osteosarcoma. *J. Bone Miner. Res.* 25, 683–691.
 - Goutham, H.V., Mumbrekar, K.D., Vadhiraaja, B.M., Fernandes, D.J., Sharan, K., Kanive Parashiva, G., Kapaettu, S., and Bola Sadashiva, S.R. (2012). DNA Double-Strand Break Analysis by γ -H2AX Foci: A Useful Method for Determining the Overreactors to Radiation-Induced Acute Reactions Among Head-and-Neck Cancer Patients. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 84, e607–e612.
 - Gowen LC, Johnson BL, Latour AM, Sulik KK, Koller BH. (1996) Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat. Genet.* 12:191–94
 - Graaff, K.M.V.D., Strete, D., and Creek, C.H. (2001). *MP: Van De Graaff Human Anatomy* (Dubuque, Iowa; London: McGraw Hill Higher Education), pages 105 - 130.
 - Grall, A., Guaguère, E., Planchais, S., Grond, S., Bourrat, E., Hausser, I., Hitte, C., Le Gallo, M., Derbois, C., Kim, G.-J., et al. (2012). PNPLA1 mutations cause autosomal recessive congenital ichthyosis in golden retriever dogs and humans. *Nat. Genet.* 44, 140–147.

- Graves, S.S., Stone, D.M., Loretz, C., Peterson, L.J., Lesnikova, M., Hwang, B., Georges, G.E., Nash, R., and Storb, R. (2011). Antagonistic and Agonistic Anti-canine CD28 Monoclonal Antibodies: Tools for Allogeneic Transplantation: Transplantation 91, 833–840.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., and Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445, 851–857.
- Gregory-Bryson, E., Bartlett, E., Kiupel, M., Hayes, S., and Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2010). Canine and human gastrointestinal stromal tumors display similar mutations in c-KIT exon 11. *BMC Cancer* 10, 559.
- Grisendi S, Pandolfi PP. (2004) Germline modification strategies. In *Mouse Models of Human Cancer*, ed. EC Holland, pp. 43–63. New York: Wiley
- Grosenbaugh, D.A.; Leard, A.T.; Bergman, P.J.; Klein, M.K.; Meleo, K.; Susaneck, S.; Hess, P.R.; Jankowski, M.K.; Jones, P.D.; Leibman, N. (2011) Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *Am. J. Vet. Res.* 2011, 72, 1631–1638
- Grottke, C., Mantwill, K., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (2000). Identification of differentially expressed genes in human melanoma cells with acquired resistance to various antineoplastic drugs. *Int. J. Cancer* 88, 535–546.
- Guezguez, B., Vigneron, P., Alais, S., Jaffredo, T., Gavard, J., Mège, R.-M., and Dunon, D. (2006). A dileucine motif targets MCAM-1 cell adhesion molecule to the basolateral membrane in MDCK cells. *FEBS Letters* 580, 3649–3656.
- Guminski, A.D., Harnett, P.R., and deFazio, A. (2002). Scientists and clinicians test their metal—back to the future with platinum compounds. *The Lancet Oncology* 3, 312–318.
- Gupta, S.C., Sung, B., Prasad, S., Webb, L.J., and Aggarwal, B.B. (2013). Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs. *Trends in Pharmacological Sciences* 34, 508–517.
- Gupta, U.C., Bhatia, S., Garg, A., Sharma, A., and Choudhary, V. (2011). Phase 0 clinical trials in oncology new drug development. *Perspect Clin Res* 2, 13–22.

H

- Haass, N.K.; Smalley, K.S.; Herlyn, M. (2004) The role of altered cell–cell communication in melanoma progression. *J. Mol. Histol.* 35, 309–318.
- Hakem R, de la Pompa JL, Sirard C, Mo R, Woo M, et al. (1996) The tumor-suppressor gene *Brcal* is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* 85:1009–23
- Haldi M, Ton C, Seng WL, McGrath P. (2006) Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis*, 9: 139–151
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

- Hande, K.R. (2006). The Pharmacokinetics and Safety of ABT-751, a Novel, Orally Bioavailable Sulfonamide Antimitotic Agent: Results of a Phase 1 Study. *Clinical Cancer Research* 12, 2834–2840.
- Hansen, K., and Khanna, C. (2004). Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development. *Eur. J. Cancer* 40, 858–880.
- Hao, M., Song, F., Du, X., Wang, G., Yang, Y., Chen, K., and Yang, J. (2015). Advances in targeted therapy for unresectable melanoma: New drugs and combinations. *Cancer Lett* 1; 359(1):1-8.
- Hedan, B., Thomas, R., Motsinger-Reif, A., Abadie, J., Andre, C., Cullen, J., and Breen, M. (2011). Molecular cytogenetic characterization of canine histiocytic sarcoma: A spontaneous model for human histiocytic cancer identifies deletion of tumor suppressor genes and highlights influence of genetic background on tumor behavior. *BMC Cancer* 11, 201.
- Henry, C.J., Brewer, W.G., Whitley, E.M., Tyler, J.W., Ogilvie, G.K., Norris, A., Fox, L.E., Morrison, W.B., Hammer, A., Vail, D.M., et al. (2005). Canine digital tumors: a veterinary cooperative oncology group retrospective study of 64 dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 19, 720–724.
- Henry, C.J. (2010). Biomarkers in veterinary cancer screening: Applications, limitations and expectations. *Vet. J.* 185, 10–14.
- Hersey, P., and Gowrishankar, K. (2015). Pembrolizumab joins the anti-PD-1 armamentarium in the treatment of melanoma. *Future Oncol* 11, 133–140.
- Herter-Sprue, G.S., Koyama, S., Korideck, H., Hai, J., Deng, J., Li, Y.Y., Buczkowski, K.A., Grant, A.K., Ullas, S., Rhee, K., et al. (2016). Synergy of radiotherapy and PD-1 blockade in Kras-mutant lung cancer. *JCI Insight* 1. Jun 16; 1(9):e87415.
- Hervieu, A., Mignot, G., and Ghiringhelli, F. (2013a). Dacarbazine mediates antimelanoma effects via NK cells. *Oncoimmunology*; Apr 1; 2(4): e23714.
- Hervieu, A., Rébé, C., Végran, F., Chalmin, F., Bruchard, M., Vabres, P., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., and Mignot, G. (2013b). Dacarbazine-mediated upregulation of NKG2D ligands on tumor cells activates NK and CD8 T cells and restrains melanoma growth. *J. Invest. Dermatol.* 133, 499–508.
- Hess, D.A., Wirthlin, L., Craft, T.P., Herrbrich, P.E., Hohm, S.A., Lahey, R., Eades, W.C., Creer, M.H., and Nolte, J.A. (2006). Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood* 107, 2162–2169.
- Hicks, M.J., and Flaitz, C.M. (2000). Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncol.* 36, 152–169.
- Hill, G.J., Metter, G.E., Kremenz, E.T., Fletcher, W.S., Golomb, F.M., Ramirez, G., Grage, T.B., and Moss, S.E. (1979). DTIC and combination therapy for melanoma. II. Escalating schedules of DTIC with BCNU, CCNU, and vincristine. *Cancer Treat Rep* 63, 1989–1992.
- Hino, R., Kabashima, K., Kato, Y., Yagi, H., Nakamura, M., Honjo, T., Okazaki, T., and Tokura, Y. (2010). Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 116, 1757–1766.
- Hodi, F.S., O’Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine* 363, 711–723.

- Hoepfner, M.P., Lundquist, A., Pirun, M., Meadows, J.R.S., Zamani, N., Johnson, J., Sundström, G., Cook, A., FitzGerald, M.G., Swofford, R., et al. (2014). An Improved Canine Genome and a Comprehensive Catalogue of Coding Genes and Non-Coding Transcripts. *PloS One* 9, e91172.
- Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K. (1986) The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.* 14:2287–300
- Hoffman, S.J., Psaltis, P.J., Clark, K.J., Spoon, D.B., Chue, C.D., Ekker, S.C., and Simari, R.D. (2012). An In Vivo Method to Quantify Lymphangiogenesis in Zebrafish. *PloS One* 7. :e45240.
- Höinghaus, R., Mischke, R., and Hewicker-Trautwein, M. (2002). Use of immunocytochemical techniques in canine melanoma. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49, 198–202.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503.
- Huang, X., and Darzynkiewicz, Z. (2006). Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage. *Methods Mol. Biol.* 314, 73–80.
- Hussussian, C.J., Struewing, J.P., Goldstein, A.M., Higgins, P.A., Ally, D.S., Sheahan, M.D., Clark, W.H., Tucker, M.A., and Dracopoli, N.C. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat. Genet.* 8, 15–21.
- Hutchinson, L., and Kirk, R. (2011). High drug attrition rates—where are we going wrong? *Nat Rev Clin Oncol* 8, 189–190.
- Huynh, A.S., Abrahams, D.F., Torres, M.S., Baldwin, M.K., Gillies, R.J., and Morse, D.L. (2011). Development of an orthotopic human pancreatic cancer xenograft model using ultrasound guided injection of cells. *PLoS ONE* 6, e20330.

I

- Iorio, F., Knijnenburg, T.A., Vis, D.J., Bignell, G.R., Menden, M.P., Schubert, M., Aben, N., Gonçalves, E., Barthorpe, S., Lightfoot, H., et al. (2016). A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. *Cell* 166, 740–754.
- Ivashkevich, A., Redon, C.E., Nakamura, A.J., Martin, R.F., and Martin, O.A. (2012). Use of the γ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett.* 327, 123–133.

J

- Jaksch, M., Múnera, J., Bajpai, R., Terskikh, A., and Oshima, R.G. (2008). Cell cycle dependent variation of a CD133 epitope in human embryonic stem cell, colon cancer and melanoma cell lines. *Cancer Res* 68, 7882–7886.
- Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, et al. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev.* 15:3243–48
- Jeong, J.-Y., Kwon, H.-B., Ahn, J.-C., Kang, D., Kwon, S.-H., Park, J.A., and Kim, K.-W. (2008). Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. *Brain Res. Bull.* 75, 619–628.

K

- Kamb, A., Wee, S., and Lengauer, C. (2007). Why is cancer drug discovery so difficult? *Nat Rev Drug Discov* 6, 115–120.
- Karagiannis, P., Fittall, M., and Karagiannis, S.N. (2014). Evaluating biomarkers in melanoma. *Front Oncol* 4, 383.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C., and Dessiris, A. (2001). Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 48, 85–96.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677–704.
- Kent, M.S., Collins, C.J., and Ye, F. (2009). Activation of the AKT and mammalian target of rapamycin pathways and the inhibitory effects of rapamycin on those pathways in canine malignant melanoma cell lines. *Am. J. Vet. Res.* 70, 263–269.
- Kerbel, R.S. (2003). Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol. Ther.* 2, S134-139.
- Keshet, G.I., Goldstein, I., Itzhaki, O., Cesarkas, K., Shenhav, L., Yakirevitch, A., Treves, A.J., Schachter, J., Amariglio, N., and Rechavi, G. (2008). MDR1 expression identifies human melanoma stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 930–936.
- Khaled, W.T., and Liu, P. (2014). Cancer mouse models: past, present and future. *Semin. Cell Dev. Biol.* 27, 54–60.
- Khan, N., Khan, M.K., Almasan, A., Singh, A.D., and Macklis, R. (2011). The Evolving Role of Radiation Therapy in the Management of Malignant Melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80, 645–654.

- Khanna, C., Lindblad-Toh, K., Vail, D., London, C., Bergman, P., Barber, L., Breen, M., Kitchell, B., McNeil, E., Modiano, J.F., et al. (2006). The dog as a cancer model. *Nat Biotech* 24, 1065–1066.
- Khanna, C. (2008). Novel targets with potential therapeutic applications in osteosarcoma. *Curr Oncol Rep* 10, 350–358.
- Khanna, C., and Gordon, I. (2009). Catching Cancer by the Tail: New Perspectives on the Use of Kinase Inhibitors. *Clin Cancer Res* 15, 3645–3647.
- Khanna, C., Fan, T.M., Gorlick, R., Helman, L.J., Kleinerman, E.S., Adamson, P.C., Houghton, P.J., Tap, W.D., Welch, D.R., Steeg, P.S., et al. (2014). Toward a drug development path that targets metastatic progression in osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* 20, 4200–4209.
- Kim, H.-J., and Cantor, H. (2014). The Path to Reactivation of Antitumor Immunity and Checkpoint Immunotherapy. *Cancer Immunology Research* 2, 926–936.
- Kim, M., Cooper, D.D., Hayes, S.F., and Spangrude, G.J. (1998). Rhodamine-123 staining in hematopoietic stem cells of young mice indicates mitochondrial activation rather than dye efflux. *Blood* 91, 4106–4117.
- Koenig, A., Bianco, S.R., Fosmire, S., Wojcieszyn, J., and Modiano, J.F. (2002). Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. *Vet. Pathol.* 39, 458–472.
- Kola I, Landis J. (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* ; 3 : 711-5.
- Krakowka, S. (1983). Natural killer cell activity in adult gnotobiotic dogs. *Am. J. Vet. Res.* 44, 635–638.
- Kuranda, K., Berthon, C., Leprêtre, F., Polakowska, R., Jouy, N., and Quesnel, B. (2011). Expression of CD34 in hematopoietic cancer cell lines reflects tightly regulated stem/progenitor-like state. *J. Cell. Biochem.* 112, 1277–1285.

L

- Laale HW. (1977) Biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research: literature review. *J Fish Biol*; 10:121–173.
- Lagadec, C., Vlashi, E., Della Donna, L., Meng, Y., Dekmezian, C., Kim, K., and Pajonk, F. (2010). Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment. *Breast Cancer Research* 12, R13.
- Lahav, R. (2005). Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma. *The International Journal of Developmental Biology* 49, 173–180.
- Lamers, C.H.J., Willemsen, R.A., Luijck, B.A., Debets, R., and Bolhuis, R.L.H. (2002). Protocol for gene transduction and expansion of human T lymphocytes for clinical immunogene therapy of cancer. *Cancer Gene Therapy* 9, 613–623.

- LaRue, S.M., Withrow, S.J., Powers, B.E., Wrigley, R.H., Gillette, E.L., Schwarz, P.D., Straw, R.C., and Richter, S.L. (1989). Limb-sparing treatment for osteosarcoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 195, 1734–1744.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2, 261–268.
- Lawson ND, Weinstein BM. (2002) In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol*; 248: 307–318
- Lee, L.M.J., Seftor, E.A., Bonde, G., Cornell, R.A., and Hendrix, M.J.C. (2005). The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev. Dyn.* 233, 1560–1570.
- Lev, D.C. (2004). Exposure of Melanoma Cells to Dacarbazine Results in Enhanced Tumor Growth and Metastasis In Vivo. *Journal of Clinical Oncology* 22, 2092–2100.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67, 1030–1037.
- Lieschke GJ, Currie PD. (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 2007; 8:353–367.
- Lin JY, Fisher DE. (2007) Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* ; 445:843-50.
- Lin, D.Y., Tanaka, Y., Iwasaki, M., Gittis, A.G., Su, H.-P., Mikami, B., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N., and Garboczi, D.N. (2008). The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors. *PNAS* 105, 3011–3016.
- Liptak J.M, Duncan B. and Lasalles X. (2012) in *Veterinary surgical oncology* by Kudnig, S.T., Séguin, B., and Carlson, D. (Chichester [England]: Wiley-Blackwell); Oral tumors, pages 119 – 177.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295:868–72
- London, C.A., Galli, S.J., Yuuki, T., Hu, Z.Q., Helfand, S.C., and Geissler, E.N. (1999). Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. *Exp. Hematol.* 27, 689–697.
- London CA, Hannah AL, Zadovoskaya R, Chien MB, Kollias-Baker C, et al. (2003) Phase I dose-escalating study of SU11654, a small molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, in dogs with spontaneous malignancies. *Clin. Cancer Res.* 9(7):2755–68.
- London CA, Malpas PB, Wood-Follis SL, Boucher JF, Rusk AW, et al. (2009) Multi-center, placebo controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clin. Cancer Res.* 15(11):3856–65
- Long, G.V., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., de Braud, F., Larkin, J., Garbe, C., Jouary, T., Hauschild, A., Grob, J.-J., et al. (2015). Dabrafenib and trametinib

versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 386, 444–451.

- Ludueña, R.F., Banerjee, A., and Khan, I.A. (1992). Tubulin structure and biochemistry. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 53–57.
- Luo, Y., Ellis, L.Z., Dallaglio, K., Takeda, M., Robinson, W.A., Robinson, S.E., Liu, W., Lewis, K.D., McCarter, M.D., Gonzalez, R., et al. (2012). Side population cells from human melanoma tumors reveal diverse mechanisms for chemoresistance. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2440–2450.

M

- MacEwen EG, Kurzman ID, Rosenthal RC, Smith BW, Manley PA, et al. (1989). Therapy for osteosarcoma in dogs with intravenous injection of liposome-encapsulated muramyl tripeptide. *J. Natl. Cancer Inst.* 81(12):935–38.
- MacEwen, E.G. (1990). Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 9, 125–136.
- MacEwen EG, Rosenthal RC, Fox LE, Loar AS, Kurzman ID. (1992) Evaluation of L-asparaginase: polyethylene glycol conjugate versus native L-asparaginase combined with chemotherapy. A randomized double-blind study in canine lymphoma. *J Vet Intern Med.*; 6(4): 230–234.
- MacRae, C.A., and Peterson, R.T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 14, 721–731.
- Maekawa, N., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Adachi, M., Takagi, S., Kagawa, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Murata, S., et al. (2014). Expression of PD-L1 on Canine Tumor Cells and Enhancement of IFN- γ Production from Tumor-Infiltrating Cells by PD-L1 Blockade. *PLoS One* 9, e98415.
- Maekawa, N., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Ikebuchi, R., Izumi, Y., Takagi, S., Kagawa, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., et al. (2016). Immunohistochemical Analysis of PD-L1 Expression in Canine Malignant Cancers and PD-1 Expression on Lymphocytes in Canine Oral Melanoma. *PloS One* 11, e0157176.
- Magni, M., Shammah, S., Schiró, R., Mellado, W., Dalla-Favera, R., and Gianni, A.M. (1996). Induction of cyclophosphamide-resistance by aldehyde-dehydrogenase gene transfer. *Blood* 87, 1097–1103.
- Mak, I.W., Evaniew, N., and Ghert, M. (2014). Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *American Journal of Translational Research* 6, 114.
- Maldonado, J.L., Fridlyand, J., Patel, H., Jain, A.N., Busam, K., Kageshita, T., Ono, T., Albertson, D.G., Pinkel, D., and Bastian, B.C. (2003). Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1878–1890.
- Maliver, P., Estrada, M., Lagadic, M., Mialot, M., Manin, S., and Fontaine, J.-J. (2004). An osteoid variant of cutaneous melanoma in a dog detected by S100 and melanin markers. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 51, 413–415.

- Marconato, L., Gelain, M.E., and Comazzi, S. (2013). The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematol Oncol* 31, 1–9.
- Marcus, D.M., Marcus, R.P., Prabhu, R.S., Owonikoko, T.K., Lawson, D.H., Switchenko, J., and Beitler, J.J. (2012). Rising Incidence of Mucosal Melanoma of the Head and Neck in the United States. *Journal of Skin Cancer* 2012, e231693.
- Markham, A. (2016). Atezolizumab: First Global Approval. *Drugs* 76, 1227–1232.
- Martin-Orozco, N., Wang, Y.-H., Yagita, H., and Dong, C. (2006). Cutting Edge: Programed Death (PD) Ligand-1/PD-1 Interaction Is Required for CD8+ T Cell Tolerance to Tissue Antigens. *J Immunol* 177, 8291–8295.
- Mashima, E., Yamaguchi, T., Sasaki, N., Hara, Y., Omoto, D., Haruyama, S., Yoshioka, M., Nishio, D., Sakuragi, Y., et al. (2015). Nivolumab in the treatment of malignant melanoma: review of the literature. *OncoTargets and Therapy*; Aug 6; 8:2045-51.
- Massi, D., Brusa, D., Merelli, B., Ciano, M., Audrito, V., Serra, S., Buonincontri, R., Baroni, G., Nassini, R., Minocci, D., et al. (2014). PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics. *Annals of Oncology* 25, 2433–2442.
- Mayr, B., Eschborn, U., Schleger, W., Loupal, G., and Burtscher, H. (1992). Cytogenetic studies in a canine malignant melanoma. *J. Comp. Pathol.* 106, 319–322.
- MBBS, A.K.A., PhD, A.H.H.L.M., and PhD, S.P.M. (2012). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*, 4e (Philadelphia, PA: Saunders).
- McKenzie, J.L., Takenaka, K., Gan, O.I., Doedens, M., and Dick, J.E. (2007). Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population. *Blood* 109, 543–545.
- Meacham, C.E., and Morrison, S.J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501, 328–337.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1, 135–145.
- Meleti, M.; Leemans, C.R.; De Bree, R.; Vescovi, P.; Sesenna, E.; van der Waal, I. (2008) Head and neck mucosal melanoma: Experience with 42 patients, with emphasis on the role of postoperative radiotherapy. *Head Neck*, 30, 1543–1551.
- Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, et al. (2003) In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin. Cancer Res.* 9(1):327–37.
- Merelli, B., Massi, D., Cattaneo, L., and Mandalà, M. (2014). Targeting the PD1/PD-L1 axis in melanoma: biological rationale, clinical challenges and opportunities. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 89, 140–165.
- Meyers PA, Schwartz CL, KrailoM, Kleinerman ES, Betcher D, et al. (2005) Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. *J. Clin. Oncol.* 23(9):2004–110.
- Meyers PA, Schwartz CL, Krailo MD, Healey JH, Bernstein ML, et al. (2008) Osteosarcoma: The addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival—a report from the Children’s Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 26(4):633–38.
- Meyers, P.A. (2009). Muramyl tripeptide (mifamurtide) for the treatment of osteosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 9, 1035–1049.

- Miller, A.J., and Mihm, M.C.J. (2006). Melanoma. *New England Journal of Medicine* 355, 51–65.
- Mobasher A, Cassidy JP. (2010) Biomarkers in veterinary medicine: Towards targeted, individualised therapies for companion animals. *Vet. J.*, 185, 1-3.
- Mochizuki, H., and Breen, M. (2015a). Comparative Aspects of BRAF Mutations in Canine Cancers. *Veterinary Sciences* 2, 231–245.
- Mochizuki, H., Kennedy, K., Shapiro, S.G., and Breen, M. (2015b). BRAF Mutations in Canine Cancers. *PLoS One* 10, e0129534.
- Modiano JF, Ritt MG, Wojcieszyn J. (1999) The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *J Vet Intern Med*; 13(3):163–174.
- Moff, S.L.; Corey, G.R.; Gottfredsson, M. (1999) Distant cutaneous granulomas after bacille Calmette-Guérin immunotherapy for malignant melanoma: Case for direct infection. *Clin. Infect. Dis*, 29, 1569–1570.
- Morello E, Martano M, Buracco P. (2011) Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma. *Vet J*; 189(3):268–277.
- Moreno-Bueno, G., Peinado, H., Molina, P., Olmeda, D., Cubillo, E., Santos, V., Palacios, J., Portillo, F., and Cano, A. (2009). The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc* 4, 1591–1613.
- Morrison, W.B. (2002). *Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management* (Teton NewMedia).
- Morrison, W. B. (2010). *Cancer Chemotherapy: An Annotated History*. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, 1249–1262.
- Morton DL., Essner R., Kirkwood JM., Wollman RC., (2003) in *Cancer Medicine by Holland-Frei* (BC Decker); Melanoma, pages 1849 - 1869.
- Moser AR, Pitot HC, Dove WF. (1990) A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247:322–24.
- Mouawad, F., Gros, A., Rysman, B., Bal-Mahieu, C., Bertheau, C., Horn, S., Sarrazin, T., Lartigau, E., Chevalier, D., Bailly, C., et al. (2014). The antitumor drug F14512 enhances cisplatin and ionizing radiation effects in head and neck squamous carcinoma cell lines. *Oral Oncology* 50, 113–119.
- Mueller, BM., and Reisfeld, RA. (1991). Potential of the scid mouse as a host for human tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 10, 193–200.
- Mueller, F., Fuchs, B., and Kaser-Hotz, B. (2007). Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Res.* 27, 155–164.
- Mukherjee, S. (2011). *The Emperor of All Maladies: A Biography of Cancer* (New York: Scribner).

N

- Nardella, C., Lunardi, A., Patnaik, A., Cantley, L.C., and Pandolfi, P.P. (2011). The APL paradigm and the “co-clinical trial” project. *Cancer Discov* 1, 108–116.
- Némati, F., Sastre-Garau, X., Laurent, C., Couturier, J., Mariani, P., Desjardins, L., Piperno-Neumann, S., Lantz, O., Asselain, B., Plancher, C., et al. (2010). Establishment and characterization of a panel of human uveal melanoma xenografts derived from primary and/or metastatic tumors. *Clin. Cancer Res.* 16, 2352–2362.
- Neufert C, Becker C, Neurath MF. (2007) An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc*;2(8):1998–2004.
- Nikolaou, V., and Stratigos, A.J. (2014). Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br. J. Dermatol.* 170, 11–19.
- Nishiya, A., Massoco, C., Felizzola, C., Perlmann, E., Batschinski, K., Tedardi, M., Garcia, J., Mendonça, P., Teixeira, T., and Zaidan Dagli, M. (2016). Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Veterinary Sciences* 3, 7.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28.

O

- Ostrander EA, Wayne RK. (2005) The canine genome. *Genome Res.* 15(12):1706–16.

P

- Packard FR. (1921) *The Life and Times of Ambroise Paré*, 2nd ed. New York: Paul B. Hoeber 27, 163. 1510–1590. New York, 1921. 35, 89.
- Paoloni, M., and Khanna, C. (2008). Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat. Rev. Cancer* 8, 147–156.
- Park HY, Pongpudpunth M, Lee J, Yaar M. Biology of Melanocytes. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffel DJ, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. McGraw Hill: New York; (2007). pp.591-608.

- Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrest BA. (2009) Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci*; 66:1493-506.
- Parker HG, Kim LV, Sutter NB, Carlson S, Lorentzen TD, Malek TB et al (2004). Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science*, 304, 1160- 1164.
- Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, et al. (2005) BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol*; 15: 249–254.
- Penna, L.S., Henriques, J.A.P., and Bonatto, D. (2017). Anti-mitotic agents: Are they emerging molecules for cancer treatment? *Pharmacol. Ther.* pii: S0163-7258(17)30021-9.
- Perego, M., Alison, M.R., Mariani, L., Rivoltini, L., and Castelli, C. (2011). Spheres of influence in cancer stem cell biology. *J. Invest. Dermatol.* 131, 546–547.
- Perlemuter, L., and Perlemuter, G. (2010). *Guide de thérapeutique* (Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson).
- Perna D, Karreth FA, Rust AG, et al. (2015) BRAF inhibitor resistance mediated by the AKT pathway in an oncogenic BRAF mouse melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 112: E536–E545.
- Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gärtner F. (2012) Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl. Res*, 159, 165-172.
- Plensdorf S, Martinez J. (2009) Common pigmentation disorders. *Am Fam Physician.*; 79:109-16.
- Pollack A. (2012) Seeking Cures, Patients Enlist Mice Stand-Ins, *The New York Times*, September 26.
- Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J.P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Pastor, M., Delignette, M.L., and Fournel-Fleury, C. (2010). A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Vet. Pathol.* 47, 414–433.
- Poole, C.M., and Guerry, D. (2005). *Melanoma: Prevention, Detection, and Treatment; Second Edition* (Princeton, N.J.: Yale University Press) pages 13 - 21.
- Poorman, K., Borst, L., Moroff, S., Roy, S., Labelle, P., Motsinger-Reif, A., and Breen, M. (2014). Comparative cytogenetic characterization of primary canine melanocytic lesions using array CGH and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Research*; Jun;23(2):171-86.
- Porrello, A., Cardelli, P., and Spugnini, E.P. (2006). Oncology of companion animals as a model for humans. an overview of tumor histotypes. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 25, 97–105.
- Proschowsky HF, Rugbjerg H, Ersbøll AK. (2003) Morbidity of purebred dogs in Denmark. *Prev. Vet. Med*, 58, 53-62.
- Pryer NK, Lee LB, Zadovaskaya R, Yu X, Sukbuntherng J, et al. (2003) Proof of target for SU11654: inhibition of KIT phosphorylation in canine mast cell tumors. *Clin. Cancer Res.* 9(15):5729–34.

Q

- Quagliana, J.M., Stephens, R.L., Baker, L.H., and Costanzi, J.J. (1984). Vindesine in patients with metastatic malignant melanoma: a Southwest Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* 2, 316–319.
- Quintana E, Piskounova E, Shackleton M, et al. (2012) Human melanoma metastasis in NSG mice correlates with clinical outcome in patients. *Sci Transl Med*; 4:159ra149.
- Ramus SJ, Bobrow LG, Pharoah PD, Finnigan DS, Fishman A, et al. (1999) Increased frequency of TP53 mutations in BRCA1 and BRCA2 ovarian tumours. *Genes Chromosomes Cancer* 25:91–96
- Quesnel B. Dormance tumorale (2010) : quiescence ou équilibre ? *Hématologie*. 16(5) :355-362.

R

- Ramos-Vara, J.A., and Miller, M.A. (2011). Immunohistochemical identification of canine melanocytic neoplasms with antibodies to melanocytic antigen PNL2 and tyrosinase: comparison with Melan A. *Vet. Pathol.* 48, 443–450.
- Ranieri, G., Gadaleta, C.D., Patruno, R., Zizzo, N., Daidone, M.G., Hansson, M.G., Paradiso, A., and Ribatti, D. (2013). A model of study for human cancer: Spontaneous occurring tumors in dogs. Biological features and translation for new anticancer therapies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 88, 187–197.
- Rassnick, K.M., Ruslander, D.M., Cotter, S.M., Al-Sarraf, R., Bruyette, D.S., Gamblin, R.M., Meleo, K.A., and Moore, A.S. (2001). Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989-2000). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 1444–1448.
- Rebecca, V.W., Sondak, V.K., and Smalley, K.S.M. (2012). A Brief History of Melanoma: From Mummies to Mutations. *Melanoma Res* 22, 114–122.
- Richter, A., Escobar, H.M., Günther, K., Soller, J.T., Winkler, S., Nolte, I., and Bullerdiek, J. (2005). RAS Gene Hot-Spot Mutations in Canine Neoplasias. *J Hered* 96, 764–765.
- Ritt, M.G., Wojcieszyn, J., and Modiano, J.F. (1998). Functional loss of p21/Waf-1 in a case of benign canine multicentric melanoma. *Vet. Pathol.* 35, 94–101.
- Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O’Day, S., Weber, J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.-F., Testori, A., Grob, J.-J., et al. (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 364, 2517–2526.
- Robert, C.; Ribas, A.; Wolchok, J.D.; Hodi, F.S.; Hamid, O.; Kefford, R.; Weber, J.S.; Joshua, A.M.; Hwu, W.J.; Gangadhar, T.C.; et al. (2014) Anti-programmed-death-

- receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: A randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet*, 384, 1109–1117.
- Roguin, A. (2006). Rene Theophile Hyacinthe Laënnec (1781–1826): The Man Behind the Stethoscope. *Clin Med Res* 4, 230–235.
 - Roitt, I.M.; B., Jonathan; Male, David K. (1989). *Immunology* (Harper & Row).
 - Roskoski, R. (2010). RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 313–317.
 - Rowell, J.L., McCarthy, D.O., and Alvarez, C.E. (2011a). Dog models of naturally occurring cancer. *Trends in Molecular Medicine* 17, 380–388.
 - Rowell, J.L., McCarthy, D.O., and Alvarez, C.E. (2011b). Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol Med* 17, 380–388.
 - Ruffell, B., Affara, N.I., and Coussens, L.M. (2012). Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* 33, 119–126.
 - Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. (2014) Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochem Pharmacol*; 87(1):150–161.
 - Russell WL, Kelly EM, Hunsicker PR, Bangham JW, Maddux SC, et al. (1979) Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5818–19.
 - Rütgen, B.C., Hammer, S.E., Gerner, W., Christian, M., de Arespacochaga, A.G., Willmann, M., Kleiter, M., Schwendenwein, I., and Saalmüller, A. (2010). Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously occurring diffuse large cell lymphoma. *Leukemia Research* 34, 932–938.
 - Rütgen, B.C., Willenbrock, S., Reimann-Berg, N., Walter, I., Fuchs-Baumgartinger, A., Wagner, S., Kovacic, B., Essler, S.E., Schwendenwein, I., Nolte, I., et al. (2012). Authentication of Primordial Characteristics of the CLBL-1 Cell Line Prove the Integrity of a Canine B-Cell Lymphoma in a Murine In Vivo Model. *PLoS One* 7(6):e40078.

S

- Sandusky, G.E., Carlton, W.W., and Wightman, K.A. (1985). Immunohistochemical staining for S100 protein in the diagnosis of canine amelanotic melanoma. *Vet. Pathol.* 22, 577–581.
- Saudemont, A., Hamrouni, A., Marchetti, P., Liu, J., Jouy, N., Hetuin, D., Colucci, F., and Quesnel, B. (2007). Dormant tumor cells develop cross-resistance to apoptosis induced by CTLs or imatinib mesylate via methylation of suppressor of cytokine signaling 1. *Cancer Research* 67, 4491–4498.
- Sauer B. (1987) Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*; 7(6):2087–2096.

- Schadendorf, D.; Hodi, F.S.; Robert, C.; Weber, J.S.; Margolin, K.; Hamid, O.; Patt, D.; Schallreuter KU, Kothari S, Chavan B, Spencer JD. (2008) Regulation of melanogenesis-- controversies and new concepts. *ExpDermatol*; 17:395-404.
- Schadendorf, D., Fisher, D.E., Garbe, C., Gershenwald, J.E., Grob, J.-J., Halpern, A., Herlyn, M., Marchetti, M.A., McArthur, G., Ribas, A., et al. (2015). Melanoma. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15003.
- Schatton, T., and Frank, M.H. (2008). Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 21, 39–55.
- Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., et al. (2008). Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451, 345–349.
- Schaeue, D., and McBride, W.H. (2015). Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*; 12, 527–540.
- Schiffman, J.D., and Breen, M. (2015). Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci*; Jul 19;370(1673). pii: 20140231.
- Scholl R. (2002), *Der Papyrus Ebers, die größte Buchrolle zur Heilkunde, Altägyptens*, Leipzig : Universitätsbibliothek, 40p.
- Schultheiss, P.C. (2006). Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 422–425.
- Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348, 69–74.
- Segoula, Z., Leclercq, J., Verones, V., Flouquet, N., Lecoeur, M., Ach, L., Renault, N., Barczyk, A., Melnyk, P., Berthelot, P., et al. (2016). Synthesis and Biological Evaluation of N-[2-(4-Hydroxyphenylamino)-pyridin-3-yl]-4-methoxybenzenesulfonamide (ABT-751) Tricyclic Analogues as Antimitotic and Antivascular Agents with Potent in Vivo Antitumor Activity. *J. Med. Chem.* 59, 8422–8440.
- Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, et al. (2001) Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature*; 413: 86–91.
- Sharpless NE, Depinho RA. (2006) The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5:741–54.
- Shearin AL, Ostrander EA. (2010) Leading the way: canine models of genomics and disease. *Dis. Mod. Mech*, 3, 27-34.
- Shelly, S., Chien, M.B., Yip, B., Kent, M.S., Theon, A.P., McCallan, J.L., and London, C.A. (2005). Exon 15 BRAF mutations are uncommon in canine oral malignant melanomas. *Mamm. Genome* 16, 211–217.
- Sheridan, C. (2012). Cautious optimism surrounds early clinical data for PD-1 blocker. *Nat Biotech* 30, 729–730.
- Shinohara, T., Taniwaki, M., Ishida, Y., Kawaichi, M., and Honjo, T. (1994). Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics* 23, 704–706.
- Shull, A.Y., Latham-Schwark, A., Ramasamy, P., Leskoske, K., Oroian, D., Birtwistle, M.R., and Buckhaults, P.J. (2012). Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. *PLoS One* 7, e43369.
- Silver, M., Rusk, A., Phillips, B., Beck, E., Jankowski, M., Philibert, J., Hahn, K., Hershey, E., McKeegan, E., Bauch, J., et al. (2012). Evaluation of the Oral Antimitotic

- Agent (ABT-751) in Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26, 349–354.
- Simpson, R.M., Bastian, B.C., Michael, H.T., Webster, J.D., Prasad, M.L., Conway, C.M., Prieto, V.M., Gary, J.M., Goldschmidt, M.H., Esplin, D.G., et al. (2014). Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 27, 37–47.
 - Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401.
 - Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev*; 84:1155-228.
 - Smedley, R.C., Lamoureux, J., Sledge, D.G., and Kiupel, M. (2011). Immunohistochemical Diagnosis of Canine Oral Amelanotic Melanocytic Neoplasms. *Vet Pathol* 48, 32–40.
 - Smith, S.H., Goldschmidt, M.H., and McManus, P.M. (2002). A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet. Pathol.* 39, 651–678.
 - Soengas, M.S., and Lowe, S.W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22, 3138–3151.
 - Sophos, N.A., and Vasiliou, V. (2003). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem. Biol. Interact.* 143-144, 5–22.
 - Starkey, M.P.; Scase, T.J.; Mellersh, C.S.; Murphy, S. (2005) Dogs really are man’s best friend—Canine genomics has applications in veterinary and human medicine! *Brief. Funct. Genomic. Proteomic*, 4, 112–128.
 - Statistical Principles for Clinical Trials : ICH.
 - Stavrovskaya, A.A. (2000). Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry*; 65 (1) 95–106.
 - Stein, R., Balkman, C., Chen, S., Rassnick, K., McEntee, M., Page, R., and Goldenberg, D.M. (2011). Evaluation of anti-human leukocyte antigen-DR monoclonal antibody therapy in spontaneous canine lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 52, 273–284.
 - Steinbicker, A.U., Sachidanandan, C., Vonner, A.J., Yusuf, R.Z., Deng, D.Y., Lai, C.S., Rauwerdink, K.M., Winn, J.C., Saez, B., Cook, C.M., et al. (2011). Inhibition of bone morphogenetic protein signaling attenuates anemia associated with inflammation. *Blood* 117, 4915–4923.
 - Stennicke, H.R., Ryan, C.A., and Salvesen, G.S. (2002). Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem. Sci.* 27, 94–101.
 - Sulaimon, S.S., and Kitchell, B.E. (2003). The basic biology of malignant melanoma: molecular mechanisms of disease progression and comparative aspects. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 760–772.
 - Sun, C., Wang, L., Huang, S., Heynen, G.J.J.E., Prahallad, A., Robert, C., Haanen, J., Blank, C., Wesseling, J., Willems, S.M., et al. (2014). Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 508, 118–122.
 - Sundaresan, T.K., and Haber, D.A. (2015). Does molecular monitoring matter in early-stage breast cancer? *Science Translational Medicine* 7, (302) 35–35.

T

- Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. (2003) A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci*;94(11):965–973.
- Tanaka, S., Saito, Y., Kunisawa, J., Kurashima, Y., Wake, T., Suzuki, N., Shultz, L.D., Kiyono, H., and Ishikawa, F. (2012). Development of mature and functional human myeloid subsets in hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2 γ KO mice. *J. Immunol.* 188, 6145–6155.
- Taylor, A.M., and Zon, L.I. (2009). Zebrafish tumor assays: the state of transplantation. *Zebrafish* 6, 339–346.
- Tentler, J.J., Nallapareddy, S., Tan, A.C., Spreafico, A., Pitts, T.M., Morelli, M.P., Selby, H.M., Kachaeva, M.I., Flanigan, S.A., Kulikowski, G.N., et al. (2010). Identification of predictive markers of response to the MEK1/2 inhibitor selumetinib (AZD6244) in K-ras-mutated colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther.* 9, 3351–3362.
- Tentler, J.J., Tan, A.C., Weekes, C.D., Jimeno, A., Leong, S., Pitts, T.M., Arcaroli, J.J., Messersmith, W.A., and Eckhardt, S.G. (2012). Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 9, 338–350.
- Thakur, M.D., and Stuart, D.D. (2013). The Evolution of Melanoma Resistance Reveals Therapeutic Opportunities. *Cancer Research* 73, 6106–6110.
- Thamm, D., and Dow, S. (2009). How companion animals contribute to the fight against cancer in humans. *Vet. Ital.* 45, 111–120.
- Thomas ED, Storb R, Epstein RB, Rudolph RH. (1969) Symposium on bone marrow transplantation: experimental aspects in canines. *Transplant. Proc.*, 1, 31-33.
- Thomas KR, Capecchi MR. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503–12.
- Tierny, D., Serres, F., Segoula, Z., Bemelmans, I., Bouchaert, E., Pétaïn, A., Brel, V., Couffin, S., Marchal, T., Nguyen, L., et al. (2015). Phase I Clinical Pharmacology Study of F14512, a New Polyamine-Vectorized Anticancer Drug, in Naturally Occurring Canine Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 21, 5314–5323.
- Tiso, N., Moro, E. & Argenton, F. (2009) Zebrafish pancreas development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 312, 24–30.
- Topczewska JM, Postovit L-M, Margaryan NV, et al. (2006) Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nature Med*; 12: 925–932.
- Touil, Y., Zuliani, T., Wolowczuk, I., Kuranda, K., Prochazkova, J., Andrieux, J., Le Roy, H., Mortier, L., Vandomme, J., Jouy, N., et al. (2013). The PI3K/AKT Signaling Pathway Controls the Quiescence of the Low-Rhodamine123-Retention Cell Compartment Enriched for Melanoma Stem Cell Activity. *Stem Cells* 31, 641–651.
- Tsao, H., Chin, L., Garraway, L.A., and Fisher, D.E. (2012). Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* 26, 1131–1155.

- Tuohy, J.L.; Selmic, L.E.; Worley, D.R.; Ehrhart, N.P.; Withrow, S.J. (2014) Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998–2011). *J. Am. Vet. Med. Assoc*, 245, 1266–1273.
- Turri-Zanoni, M., Medicina, D., Lombardi, D., Ungari, M., Balzarini, P., Rossini, C., Pellegrini, W., Battaglia, P., Capella, C., Castelnuovo, P., et al. (2013). Sinonasal mucosal melanoma: Molecular profile and therapeutic implications from a series of 32 cases. *Head Neck* 35, 1066–1077.

U

- Ugurel, S., Paschen, A., and Becker, J.C. (2013). Dacarbazine in Melanoma: From a Chemotherapeutic Drug to an Immunomodulating Agent. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 289–292.
- Urteaga, O., and Pack, G.T. (1966). On the antiquity of melanoma. *Cancer* 19, 607–610.

V

- Vail, D.M., and MacEwen, E.G. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest.* 18, 781–792.
- Vail, D.M., Thamm, D.H., Reiser, H., Ray, A.S., Wolfgang, G.H.I., Watkins, W.J., Babusis, D., Henne, I.N., Hawkins, M.J., Kurzman, I.D., et al. (2009). Assessment of GS-9219 in a Pet Dog Model of Non-Hodgkin’s Lymphoma. *Clin Cancer Res* 15, 3503–3510.
- Vail, D.M., Pinkerton M.E. and Young K.M. (2012) in Withrow & MacEwen’s small animal clinical oncology (St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders); Hematopoietic tumors, pages 608 – 678.
- Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314–322.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2015). The Path to Cancer --Three Strikes and You’re Out. *N. Engl. J. Med.* 373, 1895–1898.

W

- Walrath, J.C., Hawes, J.J., Van Dyke, T., and Reilly, K.M. (2010). Genetically engineered mouse models in cancer research. *Adv. Cancer Res.* 106, 113–164.
- Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A., Zdrojowy, R., Pluzanska, A., Szczylik, C., Staehler, M., Brugger, W., Dietrich, P.-Y., Mendrzyk, R., et al. (2012). Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat. Med.* 18, 1254–1261.
- Wayne RK, Ostrander EA. (2007) Lessons learned from the dog genome. *Trends Genet.* 23, 557-567.
- Wee, S., Wiederschain, D., Maira, S.-M., Loo, A., Miller, C., deBeaumont, R., Stegmeier, F., Yao, Y.-M., and Lengauer, C. (2008). PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 13057–13062.
- Weeraratna, A.T. (2012). RAF around the edges—the paradox of BRAF inhibitors. *New England Journal of Medicine*; 366, 271–273.
- White RM, Cech J, Ratanasirintrawoot S, et al. (2011) DHODH modulates transcriptional elongation in the neural crest and melanoma. *Nature*; 471: 518–522.
- Winslow, R. (2014). How the Promise of Immunotherapy Is Transforming Oncology. *Wall Street Journal*. <https://www.wsj.com/articles/cancers-super-survivors-how-immunotherapy-is-transforming-oncology-1417714379>.
- Withrow, S.J., and Wilkins, R.M. (2010). Cross talk from pets to people: translational osteosarcoma treatments. *ILAR J* 51, 208–213.

XYZ

- Yamagiwa K, Ichikawa K (1918) Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *J Cancer Res* 27:123–81.
- Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Okumura, K., et al. (2002). Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J. Immunol.* 169, 5538–5545.
- Zabierowski, S.E., and Herlyn, M. (2008). Melanoma Stem Cells: The Dark Seed of Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*; 26, 2890–2894.
- Zaretsky, J.M., Garcia-Diaz, A., Shin, D.S., Escuin-Ordinas, H., Hugo, W., Hu-Lieskovan, S., Torrejon, D.Y., Abril-Rodriguez, G., Sandoval, S., Barthly, L., et al. (2016). Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *New England Journal of Medicine*; 1;375 (9):819-29.

- Zhou L, Ishizaki H, Spitzer M, et al. (2012) ALDH2 mediates 5-nitrofuran activity in multiple species. *Chem Biol*; 19: 883–892.
- Zhuo, R., Kosak, K.M., Sankar, S., Wiles, E.T., Sun, Y., Zhang, J., Ayello, J., Prestwich, G.D., Shami, P.J., Cairo, M.S., et al. (2014). Targeting Glutathione S-transferase M4 in Ewing sarcoma. *Front Pediatr* 2, 83.
- Zigler, M., Villares, G.J., Lev, D.C., Melnikova, V.O., and Bar-Eli, M. (2008). Tumor immunotherapy in melanoma: strategies for overcoming mechanisms of resistance and escape. *Am J Clin Dermatol* 9, 307–311.
- Zupančič, D., Kreft, M.E., and Romih, R. (2014). Selective binding of lectins to normal and neoplastic urothelium in rat and mouse bladder carcinogenesis models. *Protoplasma* 251, 49–59.

Annexes

Annexe A



OCR

Batiment ONCOVET Avenue Paul Langevin 59650 VILLENEUVE D ASCQ
Contact : Dr BEMELMANS Ingrid
Tél : 03 20 56 82 93 Fax : 09 70 61 60 46

Rapport de l'analyse histopathologique H14-0102 reçue le 21/01/2014

Propriétaire :

Mr/Mme XXXX

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

6XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Animal : Dolly, Chien, Yorkshire, 14 ans

Prélèvements : Masse buccale

Vétérinaire :

Dr MINIER

CENTRE ONCOVET ,

AVENUE PAUL LANGEVIN ,

59650 VILLENEUVE D ASCQ

L'examen histopathologique a porté sur une mandibulectomie gauche et sur l'exérèse chirurgicale d'un noeud lymphatique provenant de Dolly, Chien, Femelle, de race Yorkshire, stérilisée, âgée de 14 ans.

Masse mandibulaire gauche

L'analyse histologique porte sur 3 plans de coupe, colorés à l'hématoxyline-éosine, après décalcification. On observe une prolifération tumorale, qui se développe dans le chorion muqueux, mal délimitée, non encapsulée et de croissance infiltrante. Elle est hypercellulaire et vient au contact de l'épithélium (activité jonctionnelle) et induit une ulcération. Elle est formée de cellules non cohésives, qui sont agencées majoritairement en tapis et en nids (plages épithélioïdes) et en faisceaux qui s'entrecroisent au hasard au sein d'un stroma collagénique grêle. Les cellules, de 25 à 35 microns, sont polygonales. Elles possèdent un abondant cytoplasme acidophile qui contient dans 30% des cellules de fines granulations brunes (pigments mélaniques). Les noyaux, ronds à ovales, de 15 à 25 microns, sont vésiculeux et possèdent une chromatine décondensée et un nucléole éosinophile très proéminent. L'anisocytose et l'anisocaryose sont marquées. L'index mitotique est inférieur à une mitose par champ au Gx400. On n'observe pas d'embolie sur les sections examinées.

Noeud lymphatique

L'analyse histologique porte sur 2 plans de coupe, colorés à l'hématoxyline-éosine.

Le noeud lymphatique est le siège d'un envahissement tumoral nodulaire focal dans le cortex de 3 mm de diamètre. Les sinus sous-capsulaires, corticaux et médullaires contiennent des mélanomacrophages.

Conclusion

Mélanome malin buccal avec métastase ganglionnaire.

Remarques

La marge d'exérèse antérieure est exempte d'infiltration tumorale sur 1 cm.

Bien cordialement et restant à votre disposition,

Le 29/01/14

Dr Ingrid BEMELMANS
DESV Anatomie Pathologique
Dip. ECVF

Annexe B



OCR

Batiment ONCOVET Avenue Paul Langevin 59650 VILLENEUVE D ASCQ
Contact : Dr CARLUS Marine
Tél : 03 20 56 82 93 Fax : 09 70 61 60 46

Rapport de l'analyse histopathologique H14-0647 reçue le 15/04/2014

Propriétaire :

Mr XXXXXXXX
XXXXXXXXXX
XXXXXXXXXX

Animal : Tania, Chien, Berger Allemand, 11 ans

Prélèvements : Mélanome commissure des lèvres gauches

Vétérinaire :

Dr COTTIN
CLINIQUE VÉTÉRINAIRE ST ROCH,
105 ROUTE DE GENECH ,
59830 CYSOING

L'examen histopathologique a porté sur l'exérèse chirurgicale d'une masse labiale située la commissure des lèvres gauche, provenant de Tania, Chien, Femelle, de race Berger Allemand, stérilisée, âgée de 11 ans.

L'analyse histologique porte sur x plans de coupe, colorés l'hématoxyline-éosine.

On observe une prolifération tumorale de 23 x 20 x 15 mm, qui se développe dans le chorion muqueux, mal délimitée, non encapsulée et de croissance infiltrante, notamment vers le muscle en profondeur. Elle est hypercellulaire et vient au contact de l'épithélium (activité jonctionnelle) et induit une ulcération extensive. Elle est formée de cellules non cohésives, qui sont agencées soit en tapis ou petites thèques (plages épithélioïdes) soit plus fréquemment en faisceaux qui s'entrecroisent au hasard au sein d'un stroma collagénique grêle. Les cellules, de 25 à 35 microns, sont fusiformes à polygonales. Elles possèdent un cytoplasme acidophile modérément abondant, qui contient dans 10-20% des cellules selon les plages, de fines granulations brunes (pigments mélaniques). Les noyaux, ronds à ovales, de 15 à 25 microns, sont vésiculeux et possèdent une chromatine décondensée et un nucléole éosinophile. L'anisocytose et l'anisocaryose sont marquées. **L'index mitotique est de 5 mitoses en 10 champs à Gx400.** Absence d'embolie sur les sections analysées.

Conclusion

Mélanome malin labial, sans embolie vasculaire sur la section analysée.

Remarques

Les marges passent au ras du tissu tumoral (< 1 mm).

L'étude publiée par SMEDLEY RC. et coll. (Vet Pathol 2011 48(1): 41-53) indique que les mélanomes canins peuvent voir leur pronostic histologique précisé par le calcul de leur index de prolifération. Celui-ci repose sur une immunohistochimie mettant en évidence l'expression de l'antigène Ki67 par les cellules tumorales. Les mélanomes dont l'index de prolifération Ki67 est inférieur à 15% (pour les mélanome cutanés/digités) ou 19,5% (pour les mélanomes de lacavité buccale ou des lèvres) ont une pronostic de survie plus favorable avec 11% de mortalité un an postdiagnostic. A l'inverse, les mélanome dont l'index de prolifération est supérieur ou égal à 15% (pour les mélanome cutanés/digités) ou 19,5% (pour les mélanomes de lacavité buccale ou des lèvres) ont un pronostic péjoratif avec 82,5% de mortalité un an postdiagnostic.

Nous pouvons réaliser l'index de prolifération Ki67 à votre demande.

Bien cordialement et restant à votre disposition,

Le 23/04/14

Dr Marine CARLUS
DESV Anatomie Pathologique

Annexe C



OCR

Bâtiment Oncovet Avenue Paul Langevin 59650 Villeneuve d'Ascq
Contact : Dr Ingrid Bemelmans
Tél : 03 20 56 82 93 Fax : 09 70 61 60 46

Rapport de l'analyse histopathologique RD14-MEL1 reçue le 30/04/2014

Référence : MEL001 DOLLY (H14-0102)
Animal : Souris SCID Nude N°1
Prélèvements : Xénogreffe
Technique : Inclusion en paraffine, coupe et coloration HE (hémalun-éosine).

RD14-MEL1 – MEL001DOLLY p0 :

Fragment de tumeur sans marge, formant des plages de cellules épithélioïdes au sein d'un stroma conjonctivo-vasculaire grêle. Les cellules tumorales sont de grande taille (environ 30 µm), aux contours flous. Leur noyau est ovoïde irrégulier, hypo- ou euchromatique, à chromatine fine et possède un ou deux petits nucléoles éosinophiles bien visibles. Leur cytoplasme est acidophile, fibrillaire, modérément abondant. Des pigmentations brun-noir de mélanine sont visibles dans moins de 10% des cellules. Les atypies cytonucléaires sont modérées (anisocytose et anisocaryose modérée). L'index mitotique est de 3 mitoses par champ au grossissement x400 en moyenne. Le degré d'infiltration et la présence d'embolie n'a pu être observé (absence de tissu péri-tumoral).

L'analyse histopathologique a été complétée par une analyse immunohistochimique. Elle a consisté en un immunomarquage à fin de détection de l'antigène Melan A, spécifique des mélanocytes.)

La population cellulaire tumorale exprime fortement et diffusément l'antigène Melan A.

Conclusion

Mélanome épithélioïde, faiblement pigmenté, compatible avec une xénogreffe de mélanome canin.

Bien cordialement et restant à votre disposition,

Le 13/05/14

Dr Marine CARLUS
DESV Anatomie Pathologique

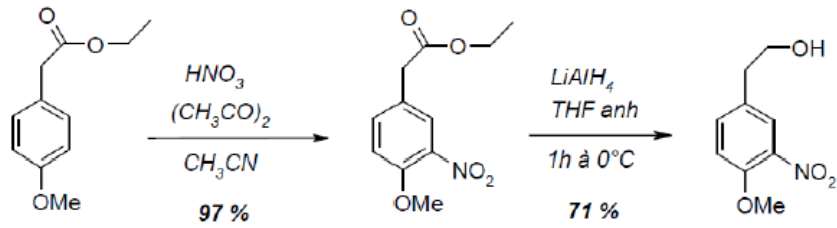
Annexe D



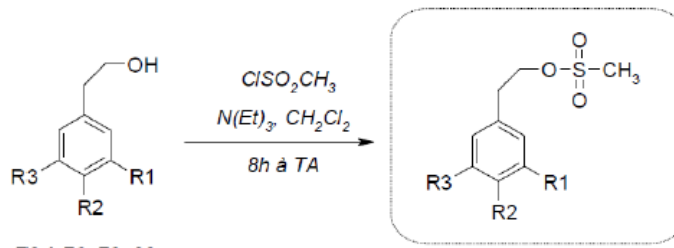
Représentation graphiques des aberrations chromosomiques retrouvées chez Dolly (dans l'ordre de droite à gauche : tumeur primitive, troisième passage, xenogreffe et premier passage) et Tania (de droite à gauche : premier passage, tumeur primitive, lignée primaire et xenogreffe). Les amplifications sont indiquées en rouge et les deletions/ pertes chromosomiques en vert.

Annexe E

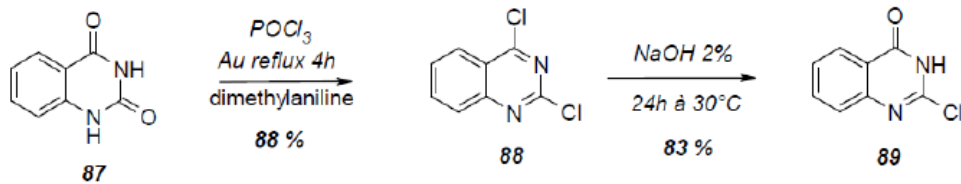
Voie de synthèse organique des composés chimiques



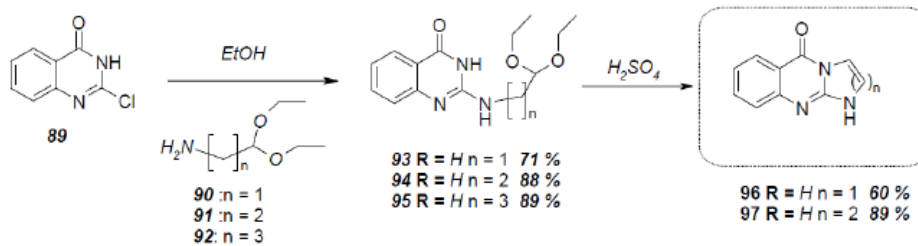
Synthèse du 2-(3-nitro-4-méthoxyphényl) éthanol



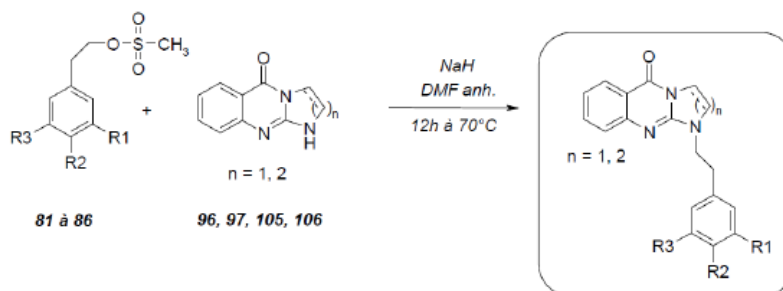
Synthèse des méthanesulfonates



Synthèse des dérivés de 2-chloroquinazolin-4-one



Amination et cyclisation



N-alkylation