



HAL
open science

Traitement du mélanome disséminé par radiothérapie interne vectorisée. Mécanismes et potentialisation.

Claire Viallard

► **To cite this version:**

Claire Viallard. Traitement du mélanome disséminé par radiothérapie interne vectorisée. Mécanismes et potentialisation.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2015. Français. NNT : 2015CLF1MM15 . tel-01874961

HAL Id: tel-01874961

<https://theses.hal.science/tel-01874961>

Submitted on 15 Sep 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.

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Soutenue le 03 novembre 2015

Viallard Claire

**TRAITEMENT DU MELANOME DISSEMINÉ PAR
RADIOTHERAPIE INTERNE VECTORISÉE :
MECANISMES ET POTENTIALISATION**

Rapporteurs : Dr. Lionel Larue
Dr. Isabelle Navarro-Teulon

Membres du Jury : Pr. Jérôme Lamartine
Pr. Michel D'Incan

Directeur de thèse : Dr. Françoise Degoul
Co-directeur : Dr. Elisabeth Miot-Noirault

UMR 990 Inserm/ Université d'Auvergne
« Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée »
58 rue Montalembert, 63005 Clermont-Ferrand Cedex

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail. Merci de l'intérêt et du temps que vous m'avez consacré.

Je remercie également le Pr. Jean Michel Chezal, directeur de l'UMR 990, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir accordé sa confiance dans ce projet.

Je désire ensuite tout particulièrement remercier Françoise Degoul, plus qu'une directrice de thèse, c'est devenu une amie que j'espère revoir souvent lors de mes retours sur le sol clermontois. Merci de m'avoir fait confiance depuis le début. J'ai réellement passé de nombreux bons moments dans l'unité et c'est en grande partie grâce à toi. J'ai tout appris à tes côtés, merci pour tes conseils, tes idées et tes encouragements. Tu vas beaucoup me manquer.

Merci également à Elisabeth Miot-Noirault, ma co-directrice de thèse. Merci de m'avoir fait partager tes connaissances. Tes conseils dans le domaine de l'imagerie ainsi que tes nombreuses explications toujours très claires m'ont été d'un grand secours à de nombreuses reprises.

Je remercie le Dr. Florence Mishellany ainsi que Anne Cayre, du centre Jean Perrin de Clermont-Ferrand, pour avoir patiemment analysé pendant 5 ans les coupes anatomopathologiques des tumeurs.

Merci au Dr. Dutreix pour sa collaboration avec le coDbait, ainsi qu'aux différents collaborateurs du projet sur les nanoparticules de gadolinium, Dr. Tillement, Dr. Janier et Dr. Kryza.

Je remercie également le Dr. Lydia Maigne et le Dr. Yann Perrot du LPC pour leurs travaux sur la dosimétrie.

Je désire ensuite remercier le Dr. Mercedes Quintana et Raphaël Benalouane pour leurs analyses sur la pigmentation des tumeurs de mélanome ainsi que pour l'établissement des lignées shRNAs.

Merci également à Elodie Jouberton pour son aide dans l'imagerie des tumeurs en bioluminescence.

Bien évidemment, merci à Zied, mon binôme depuis le début. J'ai adoré travailler avec toi et j'admire ton esprit d'analyse. Ton départ a laissé un grand vide dans le laboratoire et c'est avec beaucoup de joie que je pars te retrouver au Canada.

Je pense également à Sophie et Emilie, anciennes amies de promo, perdues de vue pour finalement se retrouver toutes les trois dans le même laboratoire. Merci Sophie pour ton aide et ton expérience. Je suis sûre que la maternité va t'aller à merveille, tu vas être une super maman. Merci également. Emilie, la salle de culture cellulaire fonctionne beaucoup

moins souvent depuis ton départ. Merci pour ton enthousiasme et bonne installation dans ta nouvelle maison. Merci à Tiffany, grâce à toi j'ai appris qu'on pouvait coller des étiquettes de couleur sur les bouteilles pour les classer dans l'ordre du spectre de l'arc-en-ciel ! Plus sérieusement, merci de m'avoir aidé quand j'étais débordée et je te souhaite le meilleur pour ta carrière professionnelle. Le meilleur pour la fin : Aurélien, prochain thésard à soutenir, mon collègue de bureau ces deux dernières années qui a su me supporter au quotidien. Merci d'avoir été à mon écoute et de m'avoir soutenue pendant cette rédaction. Bon courage pour ta dernière année (avant de partir toi aussi au Canada ?).

Merci à tout le personnel de l'UMR 990, et plus particulièrement à l'équipe de biologie : Eric, Caroline et Bernadette.

Mes remerciements vont également à ma famille. Mes parents qui m'ont toujours soutenu et que j'adore. Ma sœur, Manon, pour tous les dimanches soir qu'on a passé ensemble et les reprises beaucoup trop matinales les lundis. A Guillaume, mon frère, qui a toujours des explications passionnantes sur son métier, j'aurais adoré avoir comme toi, la nature comme bureau. Je pense aussi à ma mamie et mon papy, que j'aime tout simplement.

Et pour finir, Fred, mon chéri. Merci d'avoir résolu rapidement les petits problèmes informatiques, même à distance. J'ai hâte de venir te rejoindre au Canada.

Résumé

Le mélanome cutané est le cancer de la peau le plus agressif et malgré d'importants progrès dans sa prise en charge thérapeutique, la recherche de nouvelles stratégies se poursuit pour les patients non éligibles à la chimiothérapie ciblée ou non répondeurs aux thérapies actuelles. Le laboratoire UMR990 travaille sur une stratégie de radiothérapie interne vectorisée (RIV) utilisant des ligands ciblant spécifiquement et durablement la mélanine. Parmi ceux-ci la molécule ICF01012 couplée à l'iode 131 induit une inhibition significative de la croissance tumorale de tumeurs murines et de xénogreffes humaines pigmentées, associée à un allongement de la médiane de survie des animaux. Les objectifs de la thèse ont eu pour but i) de réaliser des études de dosimétrie dans un modèle de mélanome humain ii) d'approfondir les mécanismes de réponse à la RIV dans les modèles murins et humains iii) de potentialiser l'effet de cette stratégie par la co-injection de molécules radiosensibilisantes. L'étude dosimétrique réalisée sur le modèle de xénogreffe SK-Mel 3 montre ainsi que la croissance de ces tumeurs, qui possèdent environ 3 fois moins de mélanines que les tumeurs B16, est contrôlée de façon significative par 3 injections successives de 25 MBq. Ceci conforte l'idée d'approche théranostique avec la nécessité de caractériser les lésions d'un patient par imagerie en termes de cibles disponibles pour adapter le traitement. Nous montrons que dans les tumeurs SK-Mel 3, l'augmentation de la quantité de mélanines chez les animaux traités avec [¹³¹I]ICF01012 est similaire pour la phéo et l'eumélanine. De façon intéressante dans le modèle B16Bl6, le traitement avec [¹³¹I]ICF01012 réduit le nombre de métastases spontanées ou de colonies pulmonaires. Ce traitement est donc performant sur les petites tumeurs ou les cellules circulantes. Les mécanismes associés à la RIV sont superposables avec ceux induits par des irradiations externes à savoir cassures de l'ADN et arrêt de cycle. Les altérations moléculaires sont cependant différentes en fonction du statut du gène *p53* des cellules tumorales. Le traitement avec [¹³¹I]ICF01012 induit un contrôle tumoral limité dans le temps, l'utilisation de radiosensibilisants est donc d'intérêt. Le coDbait est une petite molécule d'ADN qui mime une cassure double-brin d'ADN et sert ainsi de leurre pour les enzymes de réparation. Les modèles B16Bl6 et SK-Mel 3 ont été traités par [¹³¹I]ICF01012 associé à des injections intratumorales de coDbait. Les résultats obtenus sur la croissance tumorale et la survie des animaux montrent que l'association des deux molécules est synergique dans le modèle SK-Mel 3 à croissance lente et additive dans le modèle B16Bl6. Nous avons ainsi montré la possibilité d'augmenter les effets de la RIV dans les modèles précliniques par la déstabilisation des processus de réparation. Des travaux préliminaires montrent également un effet positif des nanoparticules de gadolinium sur l'efficacité d' [¹³¹I]ICF01012 dans le modèle B16Bl6. Les mécanismes mis en jeu restent à être définis. En conclusion, nos travaux montrent que la molécule [¹³¹I]ICF01012 constitue une thérapie alternative aux traitements conventionnels pour le mélanome métastatique pigmenté. [¹³¹I]ICF01012 est en cours de transfert clinique chez l'homme.

Abstract

Melanoma is a highly aggressive skin cancer and despite the significant progress in its therapeutic management, the research keeps on developing new strategies for non-eligible patients for targeted chemotherapy or without successful therapy. The UMR990 is working on targeted radiotherapy (TRT) using ICF01012 vector labeled with iodine 131, with a high affinity for melanin and therefore for pigmented melanoma. [¹³¹I]ICF01012 induces a significant decrease of the tumoral growth in syngenic B16 models and human melanoma xenografts and a significant improvement of the survival median. The aims of the present work were i) to evaluate the dosimetry in human melanoma model, ii) to study mechanisms after TRT injection in xenografts and murin pigmented melanoma, iii) to potentiate the efficiency of this strategy using radiosensitizer. The dosimetric study showed that in SK-Mel 3 model, less pigmented than B16Bl6 tumors, the tumoral growth was significant controlled by 3 successive injections of 25 MBq. The theranostic approach is then necessary to characterize the available quantity of targets in the patient before treatment. The melanin content demonstrated that repeated injections of [¹³¹I]ICF01012 in xenografts induced an increase of melanin without any enrichment of the pheomelanin, an oxydant pigment. Interestingly, the treatment with [¹³¹I]ICF01012 reduced the number of spontaneous metastases or lung colonies in the B16Bl6 model. This treatment was then effective on small tumors or circulating cells. Consecutive mechanisms to the TRT were similar to those induced by external irradiation: DNA breaks and cell cycle arrest. However, they differed depending on *p53* status of tumoral cells. The tumor regression was uncompleted after [¹³¹I]ICF01012 treatment and co-injection with radiosensitizers could improve its efficiency. We used small DNA molecules, called coDbait, mimicking the double-strand breaks to trap repairing enzymes. Syngenic model B16Bl6 and xenograft SK-Mel 3 were treated by [¹³¹I]ICF01012 and coDbait intratumoral injection. A synergistic effect of the two molecules was observed on SK-Mel 3 model, while the effect was additive in B16Bl6, a model with a fast doubling time. The coDbait destabilized the repairing process after treatment with [¹³¹I]ICF01012. Preliminary studies showed a positive effect of gadolinium nanoparticles on the efficiency of [¹³¹I] ICF01012 towards B16Bl6 tumors. The mechanisms involved remained to be defined. In conclusion, these data suggest that [¹³¹I]ICF01012 is a promising treatment for patients with pigmented metastatic melanoma.

Sommaire

Publications & Posters	9
Abréviations	11
Figures & Tableaux	15
Introduction	19
Bibliographie	21
La peau	21
I. Le derme	22
II. L'épiderme	22
1. Les couches de l'épiderme	23
2. Les cellules de l'épiderme	23
Les mélanocytes	25
I. Fonction et origine	25
II. Les mélanosomes.....	28
III. MITF, mélanogenèse et mélanine.....	29
1. Le facteur MITF	29
2. La mélanogenèse	31
3. La mélanine.....	32
Le mélanome	34
I. Epidémiologie	34
II. Dépistage	35
1. Détection du mélanome primitif	35
a. Critères ABCDE.....	35
b. Différenciation entre mélanome/naevus grâce à la pigmentation.....	36
2. [¹⁸ F]-FDG : radiotracteur de référence pour l'imagerie du mélanome métastasé.....	36

Du mélanocyte au mélanome	38
I. Progression des mélanocytes en mélanome	38
II. Voies impliquées dans la tumorigenèse du mélanome	40
1. La voie des MAP-Kinases	40
2. La voie PI3K/PTEN/AKT	43
3. La β -caténine dans la voie de signalisation Wnt/Frizzled.....	44
4. Les protéines régulant le cycle cellulaire (INK4A/ARF)	46
a. La voie p16 ^{INK4A} -CDK4/6-Rb	47
b. La voie ARF-p53	47
5. L'immortalité répliquative	49
6. Echappement à la réponse immunitaire.....	50
7. L'Angiogenèse	52
8. Invasion des tissus et métastases : molécules d'adhésion et protéases.....	55
a. De l'E-cadhérine à l'N-cadhérine	55
b. Les métallo-protéases matricielles (MMPs).....	56
Traitements du mélanome	59
I. L'exérèse chirurgicale.....	59
II. La chimiothérapie.....	59
1. La dacarbazine.....	59
2. Le temozolomide	60
3. Inhibiteurs de la voie MAPK.....	61
III. L'immunothérapie.....	63
1. Interleukine-2	63
2. L'interféron- α	64
3. Anti-cytotoxique T-lymphocyte antigène 4 (CTLA-4).....	64
4. Anti PD1 et PD-L1	65
IV. La radiothérapie.....	66
1. La radiothérapie externe	66
2. La radiothérapie interne vectorisée.....	66
3. Emissions radioactives utilisées en radiothérapie interne	67

a.	Les particules α	68
b.	Les rayonnements β -.....	68
c.	Les émetteurs d'électrons Auger.....	69
d.	Etude de la dosimétrie.....	69
	Réponses cellulaires après une radiothérapie	71
I.	Signalisation des cassures doubles-brins.....	72
II.	Arrêt du cycle cellulaire	74
III.	Mécanismes de réparation des cassures doubles-brins.....	76
1.	La jonction d'extrémités non-homologues	76
2.	La recombinaison homologue	78
IV.	Les différentes morts cellulaires	80
1.	Apoptose	81
2.	Nécrose/Nécroptose	81
3.	Catastrophe mitotique.....	82
4.	Sénescence	82
5.	Autophagie	83
	Molécules ciblant les caractéristiques intrinsèques des mélanocytes.....	84
I.	Radiothérapie interne vectorisée avec des benzamides.....	84
1.	Première génération de radiotracer développée par le laboratoire : BZA2	85
2.	ICF01012 : nouveau radiotracer du mélanome pigmenté.....	86
a.	Caractéristiques de la molécule ICF01012 :.....	86
b.	Imagerie et radiothérapie avec ICF01012 :.....	87
c.	Effets secondaires d'une radiothérapie avec [^{131}I]ICF01012 :.....	91
3.	Le vecteur MIP-1145.....	93
4.	Le radiotracer BA-52	94
II.	Radiothérapie interne vectorisée avec des nicotinamides.....	96
1.	Les radiotraceurs MEL.....	96
2.	L'iochlonicotinamide.....	96
III.	Anticorps radiomarqués	98
1.	Anticorps ciblant la mélanine	98
2.	Anticorps ciblant la MCSP	101

IV.	Peptides radiomarqués ciblant MC1R.....	103
	Radiosensibilisation du mélanome.....	104
I.	Le coDbait : Leurre de la réparation	104
1.	Structure et mécanismes	104
2.	Tests précliniques	105
3.	Etude de la toxicité.....	106
4.	Etude de Phase I.....	107
II.	Les nanoparticules	107
1.	Structure et caractéristiques des nanoparticules à base de gadolinium	107
2.	Efficacité des GBN.....	109
III.	Inhibiteurs de protéines impliquées dans la réparation.....	110
1.	Les inhibiteurs de PARP	110
2.	Les inhibiteurs du cycle cellulaire.....	111
	Les cellules souches cancéreuses du mélanome	113
I.	Définition des cellules souches cancéreuses.....	113
II.	Modèles pour le développement et la croissance tumorale	113
III.	Marqueurs de CSC de mélanome	115
1.	CD20	115
2.	CD133.....	116
3.	Les transporteurs ABC.....	116
4.	CD271.....	117
IV.	Traitement ciblant les cellules souches cancéreuses	117
	Objectifs de thèse.....	119
	Matériels et Méthodes	121
I.	Lignées cellulaires.....	121
1.	Culture en sphéroïde.....	122
2.	Invasion et migration	122
3.	Colony Forming.....	123

4.	Transfection avec le vecteur Luc ou ShRNA.....	123
a.	Tester la sensibilité des cellules à l'antibiotique.....	123
b.	Transfection et sélection des cellules avec le vecteur d'intérêt	124
5.	Traitement pour la dépigmentation.....	124
II.	Cellules souches	125
1.	Mise en évidence des marqueurs de cellules souches.....	125
2.	Irradiation externe et évaluation de la radiosensibilité par colony forming	125
III.	Animaux	127
1.	Inoculation des cellules aux animaux.....	127
a.	En sous-cutanée	127
b.	En intraveineuse	128
2.	Techniques d'imagerie <i>in vivo</i>	128
a.	Imagerie scintigraphique plane	128
b.	Imagerie optique.....	128
3.	Traitements et radiosensibilisation du mélanome.....	129
a.	Radiothérapie vectorisée avec [¹³¹ I]ICF01012	129
b.	Injection de coDbait et de nanoparticules de gadolinium	129
4.	Contrôle des différents paramètres et prélèvements.....	131
a.	Suivi de la croissance et prélèvement tumoral	131
b.	Évaluation du nombre de métastase.....	131
c.	Prélèvement de sang et quantification de la luciférase par PCR.....	132
IV.	Analyses moléculaires	133
1.	Analyse de l'expression des protéines	133
a.	Préparation des lysats tumoraux	133
b.	Dosage des protéines	133
c.	Dosage du VEGF par la technique ELISA	133
d.	Détection de l'expression des protéines par Western Blot.....	134
e.	Marquage immunoflorescent de γ H2AX <i>in vitro</i>	134
f.	Études anathomopathologiques	135
2.	Cycle cellulaire.....	135
3.	Dosage de la mélanine	135

a.	Dosage par spectrophotométrie	136
b.	Dosage par HPLC.....	136
	Résultats.....	139
	Caractéristiques de la RIV avec [¹³¹I]ICF01012	141
I.	Dosimétrie et traitement de mélanome humain par multidoses d’[¹³¹ I]ICF01012	141
1.	Publication 1.....	141
a.	Présentation de l’article	141
b.	Détection de mélanomes pigmentés par [¹²³ I]ICF01012 (Figure 2).....	141
c.	Etude dosimétrique (Table 1).....	142
d.	Efficacité d’[¹³¹ I]ICF01012 sur le modèle SK-Mel 3 (Figure 3&4).....	142
e.	Discussion.....	143
	ARTICLE 1 : [¹²³I]ICF01012 melanoma imaging and [¹³¹I]ICF01012 dosimetry allow adapted internal targeted radiotherapy in preclinical melanoma models	144
2.	Effet de trois injections d’[¹³¹ I]ICF01012 sur la croissance de mélanomes humains	152
a.	Evolution tumorale de la lignée M2Gen.....	152
b.	Evolution tumorale de la lignée M4Beu.....	153
c.	Discussion.....	153
II.	Effet d’[¹³¹ I]ICF01012 sur la pigmentation	154
1.	Analyse de la pigmentation des tumeurs SK-Mel 3	154
2.	Analyse de la pigmentation des tumeurs M2Gen.....	155
3.	Analyse de la pigmentation des tumeurs M4Beu.....	156
4.	Relation entre pigmentation et agressivité tumorale	156
5.	Discussion.....	157
III.	[¹³¹ I]ICF01012 et dissémination.....	158
1.	Effets sur les colonies pulmonaires.....	158
2.	Mise en place de la lignée B16Bl6 luminescentes.....	160
a.	Etudes <i>in vitro</i>	160
b.	Croissance tumorale et métastases de la lignée B16Bl6-Luc	161
c.	Détection des cellules circulantes B16Bl6-Luc	163

3. Discussion.....	163
Mise en évidence des cellules souches de mélanome	164
I. Détection des cellules souches de mélanome.....	164
1. Mise en évidence dans une culture 2D	164
2. Mise en évidence des CSC en sphéroïde	165
II. Discussion.....	167
Utilisation de radiosensibilisants pour potentialiser l'effet d' [¹³¹I]ICF01012	168
I. Potentialisation de la RIV par le coDbait.....	168
1. Présentation de l'article	168
2. Résultats.....	168
a. Effet sur la croissance tumorale et la survie des animaux.....	169
b. Evaluation des effets secondaires dans le modèle syngénique B16Bl6	169
c. Mécanismes moléculaires associés à la RIV	170
3. Discussion.....	171
ARTICLE 2 : Combining DNA repair inhibitor coDbait and targeted radionuclide therapy in melanoma preclinical models	173
II. Radiosensibilisation du mélanome avec les nanoparticules de gadolinium	198
1. Injections de nanoparticules de gadolinium associées à [¹³¹ I]ICF01012	198
a. Effet sur un modèle de mélanome murin B16Bl6.....	198
b. Analyses anatomopathologiques.....	200
2. Discussion.....	201
Discussions et perspectives	203
ARTICLE 3 : Evaluation of two (125)I-radiolabeled acridine derivatives for Auger-electron radionuclide therapy of melanoma	209
ARTICLE 4 : Radiolabeled dendritic probes as tools for high <i>in vivo</i> tumor uptake: application to melanoma	221
Références bibliographiques.....	235

Publications & Posters

Publications

Evaluation of two (125)I-radiolabeled acridine derivatives for Auger-electron radionuclide therapy of melanoma

Gardette M, **Viallard C**, Paillas S, Guerquin-Kern JL, Papon J, Moins N, Labarre P, Desbois N, Wong-Wah-Chung P, Palle S, Wu TD, Pouget JP, Miot-Noirault E, Chezal JM, Degoul F.

Aug;32(4):587-97. Invest New Drugs 2014

[¹²³I]ICF01012 melanoma imaging and [¹³¹I]ICF01012 dosimetry allow adapted internal targeted radiotherapy in preclinical melanoma models

Viallard C, Perrot Y, Boudhraa Z, Jouberton E, Miot-Noirault E, Bonnet M, Besse S, Mischellany F, Cayre A, Maigne L, Rbah-Vidal L, D'Incan M, Cachin F, Chezal JM, Degoul F.

Feb 1;25(1):29-35. European Journal of Dermatology 2015

Radiolabeled dendritic probes as tools for high *in vivo* tumor uptake: application to melanoma

Parat A, Kryza D, Degoul F, Taleb J, **Viallard C**, Janier M, Garofalo A, Bonazza P, Heinrich L, Cohen R, Miot-Noirault E, Chezal JM, Billotey C, Felder-Flesch D (3), 2560-2571. *Journal of Materials Chemistry 2015*

Combining DNA repair inhibitor coDbait and targeted radionuclide therapy in melanoma preclinical models

Viallard C, Chezal JM, Mischellany F, Ranchon-Cole I, Pereira B, Herbette A, Besse S, Boudhraa Z, Jacquemot N, Cayre A, Miot-Noirault E, Sun JS, Dutreix M, Degoul F

Submitted

Annexin A1 localization and its relevance to cancer

Boudhraa Z, Bouchon B, **Viallard C**, D'Incan M, Degoul F

Submitted

Posters

Targeted radionuclide therapy for pigmented melanomas

Viallard C, Bonnet M, Besse S, Mishellany F, Cayre A, Labarre P, Miot-Noirault E, Chezal JM, Sun YS, Dutreix M, Degoul F

- European Society Pigment Cell Research (ESPCR) | 2012 | Genève (Switzerland)

DNA repair inhibitor, Dbait, enhances internal radiotherapy efficacy in melanoma preclinical models

Viallard C, Dirat B, Mishellany F, Ranchon-Cole I, Jacquemot N, Pereira B, Besse S, Labarre P, Miot-Noirault E, Chezal JM, Sun YS, Dutreix M, Degoul F

- European Melanoma | 2013 | Marseille (France)
- Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA) | 2014 | Lyon (France)
- Les Oncoriales (CLARA) | 2015 | Andrézieux-Bouthéon (France)

Efficiency of targeted radionuclide therapy with a melanin tracer [¹³¹I]ICF01012, on lung colonies and melanoma metastases

Viallard C, Jouberton E, Barrière D, Mishellany F, Besse S, Chezal JM, Miot-Noirault E, Degoul F

- Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA) | 2015 | Lyon (France)

Melanin status in melanomas irradiated by [¹³¹I]ICF01012

Quintana M, Benalouane R, **Viallard C**, Witkowski T, Bouchon B, Miot-Noirault E, Chezal JM, Degoul F

- European Society Pigment Cell Research (ESPCR) | 2015 | Edinburgh (England)

Communications orales

DNA repair inhibitor, Dbait, enhances internal radiotherapy efficacy in melanoma preclinical models

- European Association of Nuclear Medicine (EANM) | 2013 | Lyon (France) | Congrès international | Présentation en anglais
- Congrès Annuel de la société de Recherche Dermatologique (CARD) | 2014 | Brest (France)

Abréviations

[¹⁸F]- FDG : [¹⁸F]-2-fluoro-2-desoxy-D-glucose

7-AAD : 7-Aminoactinomycin D

AACR : American Association of Cancer Research

ABC : transporteurs à l'ATP Binding Cassette

AC : Adenylyl Cyclase

AFA : Alcool Formolé Acétique

AIF : Apoptosis-Inducing Factor

AKT : Protein Kinase B

Ang-1 : Angiopoïétine 1

Ang-2 : Angiopoïétine 2

ASIP : Protéine de signalisation Agouti

ATCC : American Type Collection

ATM : *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATV : α -Thérapie Vectorisée

BA-52 : benzo(1,3)dioxolo-5-carboxylic acid (4-(2-diethylamino-ethylcarbamoyl)-2-iodo-5-methoxy-phenyl)-amide

BSA : Albumine de Sérum de Bœuf

BZA2 : 1-N-(2-diethylaminoethyl)-2-iodobenzamide

CDK : Cyclin Dependent Kinase

CDKN2A : cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor 2A gene

CE : Cellule Endothéliale

Chk2 : human check-point kinase 2

CK1 : Casein Kinase 1

CSC : Cellules Souches Cancéreuses

CSPG4 : Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4

CTC : Cellules Tumorales Circulantes

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

DD : Death Domaine

DED : Death Effecteur Domaine

DHI : 5,6-dihydroxyindole

DHICA : 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA-PKcs : DNA-dependent Protein Kinase, catalytic subunit

DQ : DOPA-Quinone

DSB : Double-Strand Breaks

Dvl : Dishevelled

EMA : European Medicine Agency

EPR : Epithélium Pigmentaire Rétinien	MEC : Matrice ExtraCellulaire
FADD : Fas Associated Death Domain	MEL008 : I-N-(2-(diethylamino)ethyl)-5-iodonicotinamide
FDA : Food Drug Administration	MEL050 : F-6-fluoro-N-((2-(diethylamino)ethyl)pyridine-3-carboxamide
FGF : Fibroblaste Growth Factor	MEM : Minimum Essential Media
GBN : Nanoparticules à Base de Gadolinium	MIP-1145 : N-(2-diethylamino-ethyl)-4-(4-fluoro-benzamido)-5-iodo-2-methoxybenzamide
GRB2 : Growth factor Recepteur-Bound protein 2	MIRD : Medical Internal Radiation Dose
GSK3β : Glycogen Synthase Kinase 3β	MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor
Gy : Gray	MMP : Métallo-Protéase Matricielle
HIF1/2α : Hypoxia-Inducible Factors	MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance	NF1 : Neurofibrine 1
ICF01012 : N-(2-Diethylaminoethyl)-6-iodoquinoxaline-2-carboxamide	NGFR : Nerve Growth Factor Receptor
IFN-α : Interféron-α	NHEJ : Jonction d'Extrémité Non Homologue
Ig : ImmunoGlobulines	NHEJ : Non-Homologous End Joining
IL-2 : Interleukine 2	NK : Natural Killer
Iochlonicotinamide : 6-chloro-N-(4((2-(diethylamino)ethyl)carbamoyl)-2-iodo-5-methoxyphenyl)nicotinamide,	NRG1 : Neuréguline 1
JDE : Jonction Dermo-Epidermique	PAR : Poly(ADP-ribose)
KOH : Hydroxyde de potassium	PAR1 : Protease-Activated Receptor 1
LIG 4 : DNA-ligase IV	PBND : PCR Buffer with Nonionic Detergents
LRP : Lipoprotein receptor-related protein	PD-1 : Programmed cell Death 1
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase	PDCA : Acide pyrrole-2,3-dicarboxylique
MC : Méthylcellulose	PDGCF-B : Platelet-Derived Growth Factor B
MC1-R : MelanoCortin 1 Receptor	
MCSP : Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan	

PDGFR-B : Platelet-Derived Growth Factor Recepteur B	TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
PFA : Paraformaldéhyde	TEMP : Tomographie par Emission MonoPhotonique
PHD2 : Prolyl Hydroxylase Domain proteins 2	TEP : Tomographie par Emission de Positons
PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase	TERT : TELomerase Reverse Transcriptase
PIP2 : Phosphoinositide bis phosphate	TF : Facteur de Transcription
PIP3 : Phosphoinositide triphosphate	TGF : Transforming Growth Factor
PKA : Protéine Kinase A	TIMP : inhibiteurs de métallo-protéases tissulaires
PIGF : Placenta Growth Factor	Treg : Lymphocytes T régulateurs
POMC : Proopiomelanocortin	TRP1 : Tyrosinase-Related Protéine 1
PTCA : Acide pyrrole-2,3,5-tricarboxylique	TRP2 : Dopachrome tautomerase
PTEN : Phosphatase and tensin homolog	TTCA : Acide thiazole-2,4,5-tricarboxylique
PTU : N-phenylthioré	TYR : Tyrosinase
Rb : Retinoblastoma Protein	UV : Ultra Violet
RH : Recombinaison Homologue	VE-cadhérine : Vascular Endothelial cadhérine
RIP : Recepteur-Interacting Protein	VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
RIT : RadioImmunoThérapie	VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
RIV : Radiothérapie Interne Vectorisée	VPG : Vertical Growth Phase
ROS : espèces réactives de l'oxygène	Wnt : Wingless integration site
RPG : Radial Growth Phase	α-MSH : α -Melanocyte Stimulating Hormone
SCF : Stem Cell Factor	
SOS : Son of Sevenless	
SVF : Sérum de Veau Fœtal	
TCF : T-cell factor	
TDCA : Acide thiazole-4,5-dicarboxylique	
TEL : énergie de transfert linéique	

Figures & Tableaux

Figures

Figure 1 : Structure de la peau.....	21
Figure 2 : Structure de l'épiderme.....	24
Figure 3 : Schéma représentant les voies de transfert des mélanosomes aux kératinocytes.....	27
Figure 4 : La voie d'endocytose et la biogenèse des mélanosomes.....	28
Figure 5 : Voie de signalisation induisant une production de mélanine après une exposition UV.....	29
Figure 6 : Le facteur de transcription MITF.....	30
Figure 7 : Voie de synthèse de l'eumélanine et la phéomélanine.....	32
Figure 8 : Polymères de phéomélanine et d'eumélanine.....	33
Figure 9 : Incidence et mortalité du mélanome en 2012.....	34
Figure 10 : Les critères ABCDE pour la détection d'un mélanome.....	35
Figure 11 : Réponse au ¹⁸ F-FDG chez un patient traité au vemurafenib.....	37
Figure 12 : Modèle d'apparition et de propagation du mélanome cutané.....	39
Figure 13 : Voie des MAPK.....	41
Figure 14 : Pourcentage des mutations de BRAF, NRAS et NF1 retrouvées chez des mélanomes primitifs et leurs métastases.....	42
Figure 15 : Voie de signalisation de PI3K.....	43
Figure 16 : Voie de signalisation Wnt et complexe de destruction de la β -caténine.....	45
Figure 17 : Voie de signalisation Wnt au niveau nucléaire.....	45
Figure 18 : Les loci du gène INK4A/ARF codent pour les protéines P16 ^{INK4A} et p14 ^{ARF}	46
Figure 19 : Modifications post-traductionnelles de p53.....	48
Figure 20 : Les différents mécanismes mis en oeuvre par la cellule tumorale pour échapper au contrôle du système immunitaire.....	51
Figure 21 : Facteurs impliqués dans la prolifération anarchique ou la normalisation de l'angiogenèse tumorale.....	52
Figure 22 : Les différentes MMPs exprimées par les cellules tumorales ou stromales pendant la progression du mélanome.....	57
Figure 23 : Activation de la dacarbazine par le cytochrome p450.....	60
Figure 24 : Structure du temozolomide.....	60
Figure 25 : Mécanismes de résistance de la voie MAPK suite à l'inhibition de BRAF.....	62
Figure 26 : Liste des inhibiteurs de la voie des MAPK.....	63
Figure 27 : Rôle de PD1 dans l'inhibition de la réponse immunitaire.....	65
Figure 28 : Représentation schématique des densités d'ionisation produites par les différents rayonnements.....	67
Figure 29 : Réponses cellulaires à un dommage à l'ADN.....	71
Figure 30 : Signalisation des cassures double-brin.....	73

Figure 31 : Contrôle et arrêt du cycle cellulaire.....	75
Figure 32 : La jonction d'extrémité non-homologue.	77
Figure 33 : La recombinaison homologue.	79
Figure 34 : Les différentes morts cellulaires induites par un rayonnement ionisant.....	80
Figure 35 : Structure de la molécule BZA2.....	85
Figure 36 : Structure de la molécule ICF01012.....	86
Figure 37 : Liaisons entre la molécule ICF01012 et la mélanine.	86
Figure 38 : Biodistribution D'ICF01012 marqué à l'iode 125 après une injection i.v. de 3 MBqs sur un modèle murin porteur de mélanome B16	87
Figure 39 : Effet significatif de la radiothérapie vectorisée sur la croissance des tumeurs B16F0 et B16Bl6	88
Figure 40 : Caractérisation de la pigmentation dans des lignées cellulaires de mélanome humain.	88
Figure 41 : Détermination de la quantité de mélanine in vitro et in vivo et relation entre la captation d' [¹²⁵ I]ICF01012 avec la quantité de mélanine in vivo.....	89
Figure 42 : Effet de la radiothérapie vectorisée sur la croissance de mélanome humain.....	89
Figure 43 : Toxicité hématologique de l' [¹³¹ I]ICF01012 sur les globules blancs et les plaquettes.....	91
Figure 44 : Coupe histologique et coloration PS100 des mélanocytes des animaux traités et contrôles	91
Figure 45 : Evaluation de la toxicité à la rétine sur un modèle très pigmenté.....	92
Figure 46 : Structure de la molécule MIP-1145	93
Figure 47 : Effet de l' [¹³¹ I]MIP-1145 sur la croissance de mélanome humain SK-Mel 3 et sur la survie des animaux.....	93
Figure 48 : Structure de la molécule BA-52.....	94
Figure 49 : Efficacité du radiotraceur [¹³¹ I]BA-52.	95
Figure 50 : Structure des nicotinamides MEL développés pour l'imagerie et/ou la radiothérapie du mélanome.....	96
Figure 51 : Structure de l'iochloronicotinamide.	96
Figure 52 : MicroSPECT de souris C57BL/6 porteuses de mélanome pigmenté B16F0 et de souris BALB/c porteuses de mélanome amélanotique A375.....	97
Figure 53 : Schéma récapitulatif des mécanismes de la RIT ciblant la mélanine.....	98
Figure 54 : Effets de l'anticorps ¹⁸⁸ Re-6D2 sur des mélanomes métastatiques humains MNT1 ou A2058.....	99
Figure 55 : Réponse tumoral au ¹⁸⁸ Re-6D2 chez un patient atteint de mélanome métastatique pigmenté ayant reçu 0,74 GBq/16 mg d' ¹⁸⁸ Re-6D2.....	100
Figure 56 : Voies de signalisation activées par la MCSP	101
Figure 57 : Structures de deux analogues d'α-MSH.....	103
Figure 58 : Effet du traitement ¹⁸⁸ Re-(Arg11)CCMSH sur la croissance de mélanome humain	103
Figure 59 : Structure du coDbait.....	104
Figure 60 : Radiosensibilisation de Hep2, Lu1205 et SK28 avec du Dbait.....	105
Figure 61 : Radiosensibilisation des tumeurs SK-Mel 28 par le coDbait (DT01) associé à la radiothérapie externe.	106
Figure 62 : Structure et caractéristiques des nanoparticules de gadolinium.....	108

Figure 63 : Effet radiosensibilisant des GBN combinées avec irradiation externe de 10 Gy sur des souris porteuses de tumeur SQ20B.....	109
Figure 64 : Mécanisme d'action de PARP et inhibition par l'Olaparib.....	110
Figure 65 : Liste non exhaustive des différents composés développés et utilisés en clinique ciblant les acteurs du cycle cellulaire.	112
Figure 66 : Deux modèles de progression tumorale.	114
Figure 67 : Stratégies potentielles pour cibler les CSC.....	118
Figure 68 : Visualisation par fluorescence DAPI des cellules B16Bl6.	123
Figure 69 : Protocole de l'étude associant [¹³¹ I]ICF01012 avec le coDbait sur le modèle murin B16Bl6 ou le modèle de xénogreffe SK-Mel 3.	130
Figure 70 : Protocole de l'étude associant [¹³¹ I]ICF01012 avec les nanoparticules de gadolinium sur le modèle murin B16Bl6.	130
Figure 71 : Photographie de poumon envahi par des métastases spontanées B16Bl6Luc.	131
Figure 72 : Marqueurs de dégradation de l'eumélanine et de la phéomélanine.....	137
Figure 73 : Effet de la radiothérapie sur la lignée M2Gen.	152
Figure 74 : Effet de la radiothérapie interne sur les mélanomes humains M4Beu.....	153
Figure 75 : Quantification par HPLC de l'eu/phéomélanine sur des tumeurs SK-Mel 3 traitées avec différentes doses d' [¹³¹ I]ICF01012.	155
Figure 76 : Effet de la diminution de la tyrosinase sur la prolifération cellulaire et l'invasion.....	157
Figure 77 : Effet d' [¹³¹ I]ICF01012 sur des colonies pulmonaires B16Bl6.....	159
Figure 78 : Histologie des colonies pulmonaires B16Bl6 et du tissu adjacent..	160
Figure 79 : Quantité de signal bioluminescent émis en fonction du nombre de B16Bl6-Luc.....	161
Figure 80 : Signal bioluminescent émis par les B16Bl6-Luc après inoculation sous-cutanée.	161
Figure 81 : Signal bioluminescent au niveau pulmonaire après une inoculation sous-cutanée de cellules B16Bl6-Luc.....	162
Figure 82 : Photographie des différents ensemencements des flasques T75 cm ² avec des cellules SK-Mel 28.	165
Figure 83 : Pourcentage des cellules SK-Mel 28 marquées CD133+ ou CD271+ en fonction de leur confluence en flasque T75 cm ²	165
Figure 84 : Photographie des sphéroïdes SK-Mel 28 à différents jours après l'ensemencement en plaque 96 puits.....	166
Figure 85 : Pourcentage des cellules SK-Mel 28 marquées CD133+ ou CD271+ en fonction du jour de la formation des sphéroïdes.	166
Figure 86 : Effet radiosensibilisant des nanoparticules de gadolinium sur un modèle de mélanome murin B16Bl6 traité avec une irradiation d' [¹³¹ I]ICF01012.....	199
Figure 87 : Effet des nanoparticules de gadolinium sur la survie et l'invasion pulmonaire des animaux traités avec [¹³¹ I]ICF01012 ± Nanoparticules.	200
Figure 88 : Histologie des tumeurs B16Bl6 après différents traitements	201

Tableaux

Tableau 1 : Les facteurs paracrines secrétées par les kératinocytes après une exposition UV modifient la biologie des mélanocytes.....	26
Tableau 2 : Caractéristiques générales des différents rayonnements étudiés en radiothérapie.....	67
Tableau 3 : Principaux émetteurs de particules α utilisés en radiothérapie interne.....	68
Tableau 4 : Principaux radioéléments émetteurs β - utilisés en radiothérapie interne.....	68
Tableau 5 : Principaux émetteurs d'électrons Auger étudiés en radiothérapie.....	69
Tableau 6 : Performance du radiotracer $[^{123}\text{I}]\text{BZA2}$ comparée à celle du ^{18}F -FDG pour le diagnostic par imagerie du mélanome métastasé.....	85
Tableau 7 : Extrapolation de la dose délivrée aux organes pour l'injection de 18,5 MBq d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$	90
Tableau 8 : Conditions de culture et caractéristiques des différentes lignées de mélanome.....	121
Tableau 9 : Concentration des différents antibiotiques nécessaires pour la sélection des cellules transfectées.....	123
Tableau 10 : Jours et moyenne des volumes tumoraux lors de la première injection avec $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$	129
Tableau 11 : Concentration en mélanine totale dans les tumeurs SK-Mel 3 contrôles et traitées avec différentes doses d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$	154
Tableau 12 : Concentration en mélanine totale dans les tumeurs M2Gen contrôles et traitées avec 3 doses d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$	156

Introduction

L'UMR 990 Inserm/Uda travaille sur le développement de molécules théranostiques ciblant des caractéristiques spécifiques des cellules tumorales. Les deux grands axes de recherche sont d'une part les pathologies du cartilage, avec le ciblage spécifique des protéoglycanes et d'autre part le mélanome ciblé via la mélanine, pigment présent dans 90% des cas de lésions primitives et 50% des métastases. La molécule ICF01012 est un vecteur ayant une affinité spécifique pour la mélanine. Il peut être couplé à un isotope radioactif émettant des rayonnements détectables en imagerie ou létal pour une utilisation thérapeutique.

Le mélanome cutané est un cancer très agressif dont l'incidence a fortement augmenté au cours des dernières décennies. Malgré le développement de nouvelles stratégies en chimiothérapie, sa mortalité reste élevée avec environ 55 000 décès dans le monde en 2012. Il est nécessaire de poursuivre la recherche afin de proposer des traitements aux patients résistants ou non éligibles aux thérapies actuelles.

Les travaux de cette thèse, intitulée « Traitement du mélanome disséminé par radiothérapie interne vectorisée : mécanismes et potentialisation » s'inscrivent dans le projet de transfert clinique de la molécule ICF01012. L'objectif de la thèse a été de réaliser des études de dosimétrie sur un modèle de mélanome humain, d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes liés à la réponse cellulaire après une radiothérapie et enfin de potentialiser l'effet de cette stratégie par l'utilisation de radiosensibilisants.

Ce manuscrit commencera par un rappel bibliographique reprenant les principales informations sur les caractéristiques du mélanome cutané ainsi que le dérèglement des voies de signalisation impliquées. Par la suite, les différents traitements utilisés seront exposés, incluant les nouvelles stratégies de radiothérapie interne. Nous rapporterons de façon non exhaustive les mécanismes liés aux rayons ionisants ainsi que la possibilité d'utiliser des radiosensibilisants pour augmenter l'efficacité de la radiothérapie. Une partie

des résultats obtenus dans le cadre du travail de thèse seront décrits sous forme de deux articles. Des expériences réalisées pour mettre en évidence la modification des tumeurs irradiées en termes de capacité de dissémination, de colonies pulmonaires ou de présence de cellules souches cancéreuses seront présentées. Ces résultats préliminaires n'ont pu être totalement entérinés en raison du déménagement du laboratoire (novembre 2013 – juin 2015) qui a entraîné l'absence de marquage de la molécule ICF01012. Enfin, une discussion générale développera les hypothèses et perspectives qu'offrent l'ensemble de ce travail.

Bibliographie

La peau

Le corps humain est protégé de son environnement par l'un de ses plus grands organes : la peau. Sa superficie varie entre 1,2 et 2,2 m² et elle pèse environ 4kg (ou 7% de la masse corporelle). Elle fait office de barrière naturelle contre les facteurs microbiens, chimiques et mécaniques qui peuvent perturber la physiologie de l'organisme. De plus, à travers ses pigments, la peau fournit un système de protection unique contre les rayonnements UV (UltraViolet). La peau, dont l'épaisseur varie entre 1,5 et 4 mm en fonction des régions du corps, est composée de deux couches tissulaires distinctes : le derme et l'épiderme (**Figure 1**) (McLafferty et al., 2012) . L'hypoderme est un tissu sous-cutané qui se trouve juste sous le derme. Il ne fait pas véritablement partie de la peau, mais il est en interaction avec celle-ci et lui permet d'assurer certaines fonctions de protection.

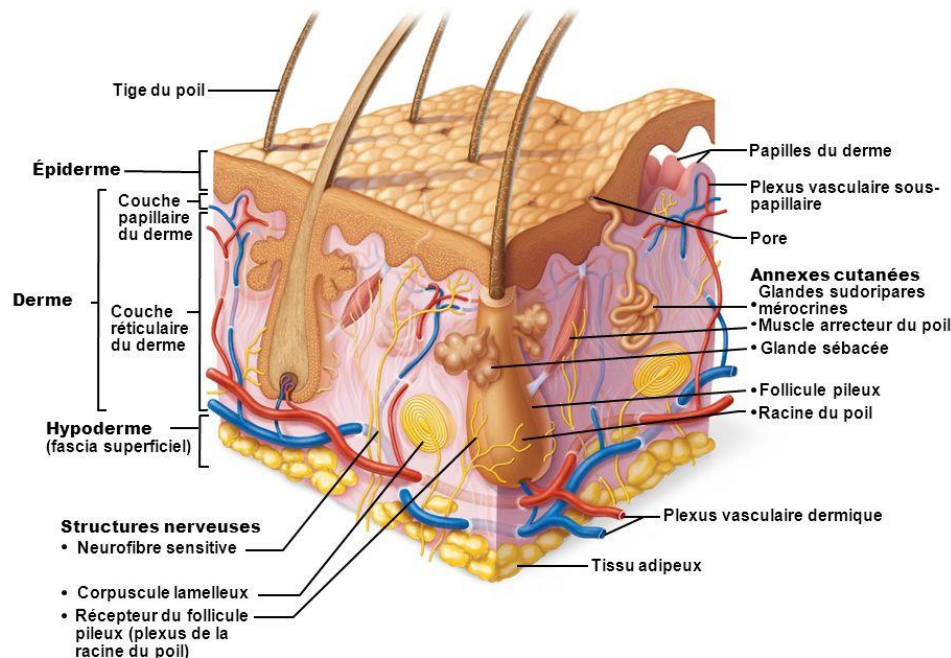


Figure 1 : Structure de la peau. Vue tridimensionnelle de la peau et des tissus sous-cutanés. L'épiderme a été soulevé dans le coin supérieur droit pour montrer les papilles du derme.

I. Le derme

Le derme est constitué de tissu conjonctif à la fois résistant et flexible. On y rencontre donc majoritairement des fibres de collagène et d'élastine entrelacées qui permettent le passage et la cohésion des neurofibres, des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les follicules pileux, les glandes sudoripares et sébacées résident dans le derme mais proviennent de l'épiderme.

Les neurofibres. Elles sont divisées en deux catégories : les terminaisons nerveuses libres qui sont les récepteurs à la douleur et les corpuscules de Meissner et de Rufini qui perçoivent le toucher.

Les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Seul le derme est vascularisé ; les nutriments diffusent à partir des capillaires par le liquide interstitiel jusqu'aux cellules de l'épiderme.

Les glandes sébacées et sudoripares. Les glandes sébacées sécrètent du sébum qui a pour fonction d'assouplir la peau et diminuer l'évaporation d'eau, il possède aussi une action bactéricide. Les glandes sudoripares produisent de la sueur qui est composée à 99% d'eau et de quelques sels minéraux. Elles contribuent au refroidissement du corps en cas de chaleur excessive.

Les follicules pileux. La base du bulbe pileux est situé environ 4 mm sous la peau. Un enchevêtrement de terminaisons sensibles s'enroule autour de chaque follicule et il suffit d'effleurer les poils pour stimuler ces terminaisons. Les poils jouent donc un rôle dans le toucher. Les cheveux protègent la tête contre les blessures, la déperdition de chaleur et la lumière du soleil.

II. L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus externe de la peau. Il est formé d'un épithélium stratifié constitué de plusieurs types cellulaires effectuant un vaste éventail de fonctions (McLafferty et al., 2012).

1. Les couches de l'épiderme

L'épiderme est organisé en cinq couches (**Figure 2**) qui sont de l'intérieur vers l'extérieur :

- **La couche basale (stratum basale)** fixée au derme sous-jacent et se composant d'une seule épaisseur de cellules. Elle est essentiellement constituée des kératinocytes les plus jeunes, on retrouve également quelques cellules de Merkel, les mélanocytes quant à eux représentent environ 10 à 25 % des cellules de la couche basale.

- **La couche épineuse (stratum spinosum)** renfermant un réseau de filaments intermédiaires de prékéatine. On trouve disséminés parmi les kératinocytes, des granules de mélanine et des cellules de Langerhans.

- **La couche granuleuse (stratum granulosum)** composée de plusieurs strates de kératinocytes qui ont changé d'aspect. Les cellules sont aplaties, leur noyau et leurs organites commencent à se désintégrer, et elles accumulent de la kératine. Les kératinocytes « s'endurcissent » dans le but de créer une matrice externe renforcée.

- **La couche claire (stratum lucidum)**, fine bande translucide juste au-dessus de la couche granuleuse. Cette couche n'existe que dans la peau épaisse.

- **La couche cornée (stratum corneum)**, couche la plus superficielle. La couche cornée est composée de cellules mortes, appelées cornéocytes, entièrement remplies de kératine et empilées les unes sur les autres. Elles forment un « mur de briques » qui protègent les cellules profondes contre les agressions extérieures.

2. Les cellules de l'épiderme

L'épiderme contient quatre types cellulaires (**Figure 2**). Les cellules les plus nombreuses sont les kératinocytes, présents dans toutes les couches de l'épiderme. On trouve ensuite les mélanocytes puis en plus faible proportion les cellules de Merkel et de Langerhans.

Les kératinocytes ont pour rôle de produire de la kératine, protéine fibreuse qui confère des propriétés protectrices. Ils proviennent de cellules qui se divisent de façon quasi continue et qui sont situées dans la couche basale. Au fur et à mesure que des nouvelles cellules sont produites, les kératinocytes sont poussés vers la surface de la peau, ils commencent alors à produire de la kératine. Les cellules meurent dans la couche granuleuse, où ce ne sont plus que des membranes plasmiques remplies de kératine. Des millions de cellules mortes tombent chaque jour, notre épiderme est totalement renouvelé tous les 25 à 40 jours.

Les mélanocytes sont situés dans la couche basale de l'épiderme et au niveau des follicules pileux (Tobin, 2008). Ce sont des cellules en forme d'étoile dont les dendrites se prolongent dans la couche épineuse. Les propriétés et fonctions des mélanocytes seront développées dans les chapitres précédents.

Les cellules de Langerhans, aussi appelées macrophagocytes intraépidermiques, sont des cellules produites dans la moelle osseuse avant de migrer vers l'épiderme. Elles contribuent à l'activation des cellules de notre système immunitaire.

Les cellules de Merkel, présentes à la jonction de l'épiderme et du derme, sont liées à la terminaison d'une neurofibre sensitive et jouent un rôle dans la transmission de la sensation du toucher.

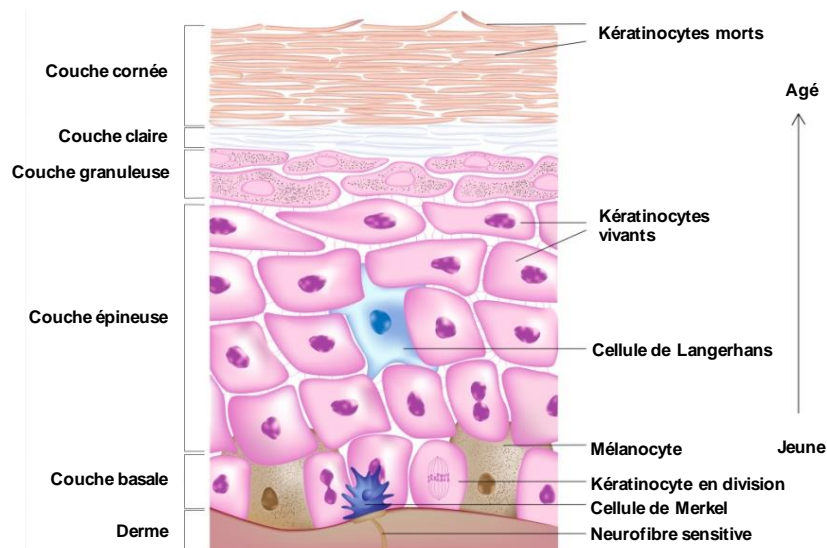


Figure 2 : Structure de l'épiderme. Schéma montrant les couches et la quantité relative des différents types cellulaires.

Les mélanocytes

I. Fonction et origine

Les mélanocytes sont issus de la différenciation de cellules progénitrices appelées mélanoblastes. Les mélanoblastes proviennent de la crête neurale. Entre les semaines 9 et 12 du développement embryonnaire humain, les mélanoblastes migrent tout au long du mésenchyme embryonnaire pour atteindre au final la couche basale de l'épiderme et les follicules pileux. A la fin du troisième mois, la densité de mélanocytes s'élève à environ 2300 cellules/mm³, pour finalement atteindre la valeur finale de 800 cellules/mm³, ce qui représente la proportion de cellules de l'épiderme d'un adulte (Ernfors, 2010). Il est important de noter que les mélanocytes ne se trouvent pas uniquement dans la peau mais également dans le cerveau ou encore l'œil, générant parfois des mélanomes uvéaux. Dans l'œil, les mélanocytes présents dans les corps ciliaires, l'iris et la choroïde dérivent de la crête neurale, comme leurs homologues cutanés. Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien proviennent du neuroectoderme. Ces cellules constituent une monocouche de cellules pigmentées, située entre la choroïde et la rétine contenant les photorécepteurs (Hu et al., 2008). Durant l'embryogenèse, les interactions entre les récepteurs de l'éphrine et de l'endothéline des mélanoblastes permettent leur migration le long de la matrice extracellulaire contenant l'éphrine et l'endothéline-3 (Dupin and Sommer, 2012). Une fois leur destination finale atteinte, ils se différencient et acquièrent la propriété principale des mélanocytes : l'expression de l'enzyme tyrosinase (Cichorek et al., 2013; Larue et al., 2013).

Les mélanocytes résidant dans la couche basale de l'épiderme, possèdent des dendrites qui s'étendent et établissent des contacts avec environ 40 kératinocytes. Leur homéostasie est contrôlée par les kératinocytes au travers des communications paracrines (via les facteurs de croissance), intracellulaires (signaux de transduction et seconds messagers), et intercellulaires (adhésion cellules-cellules ou cellules-matrice) (Haass and Herlyn, 2005). Par ailleurs, l'exposition des kératinocytes à des radiations UV augmente la sécrétion de facteurs qui influencent l'activité biologique des mélanocytes (**Tableau 1**) (Park et al., 2009).

	bFGF	ET-1	IL-1 α /1 β	ACTH	α MSH	PGE ₂ /PGF _{2α}	GM-CSF	NO	NGF
Prolifération	↑	↓	↑	↑		↑			
Mélanogénèse		↓	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓
Survie			↑	↑					
Dendricité		↑		↑	↑				
Transfert des mélanosomes					↑				

Tableau 1 : Les facteurs paracrines secrétées par les kératinocytes après une exposition UV modifient la biologie des mélanocytes. bFGF : basic fibroblast growth factor, ET-1 : endothelin 1, IL : Interleukine, ACTH : adrenocorticotrop hormone, α -MSH : melanocyte-stimulating hormone, PGE₂ et PGF_{2 α} : prostaglandin E₂ et F_{2 α} , GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, NO : nitric oxide, NGF : nerve growth factor. *D'après Cichorek et al., 2013*

La biologie de mélanocytes est aussi contrôlée par des facteurs sécrétés par les fibroblastes dermiques : tel que SCF (Stem Cell Factor) et la neuréguline 1 (NRG1). Ces cytokines influencent non seulement la croissance et la pigmentation des mélanocytes, mais aussi leur forme, leur dendricité, leur mobilité et leurs propriétés d'adhésion. Les mélanocytes stimulés libèrent également des facteurs de stimulation : MSH- α et TGF- β (Cichorek et al., 2013). Ainsi, les mélanocytes et les kératinocytes forment des unités bien organisés dans l'épiderme qui coopèrent entre eux. Les mélanocytes sont l'élément stable dans chaque unité, tandis que les kératinocytes meurent et sont éliminés par desquamation.

Les mélanocytes sont des cellules spécialisées dans la synthèse de la mélanine, pigment qui définit la couleur de la peau et des cheveux. La mélanine est un polymère naturel qui est produit dans des organites spécifiques appelés mélanosomes (Delevoeye et al., 2011; Raposo and Marks, 2007). Les mélanosomes sont transférés aux kératinocytes et se répartissent autour du noyau de ces derniers afin de protéger leur ADN contre les effets mutagènes des rayons UV (Sturm, 2006). Trois mécanismes de transfert des mélanosomes aux kératinocytes sont décrits (**Figure 3**). Le premier est l'inoculation directe dans les kératinocytes grâce à la formation de nanotubules (**Figure 3A**). Les mélanosomes peuvent aussi être exocytés individuellement des mélanocytes, sans membrane, et capturés par les kératinocytes par endocytose (e) ou phagocytose (p) (**Figure 3B**). Le dernier concept est la cytophagocytose des extrémités dendritiques des mélanocytes par les kératinocytes adjacents (**Figure 3C**) (Ando et al., 2011). Un nouveau mécanisme de transfert a récemment été proposé. Les mélanosomes sont enveloppés dans des vésicules formés par la membrane plasmique des mélanocytes. Ils sortent dans l'espace extracellulaire à partir des dendrites, sont phagocytés par les kératinocytes environnants pour être ensuite dispersés dans la zone périnucléaire (**Figure 3D**) (Ando et al., 2012).

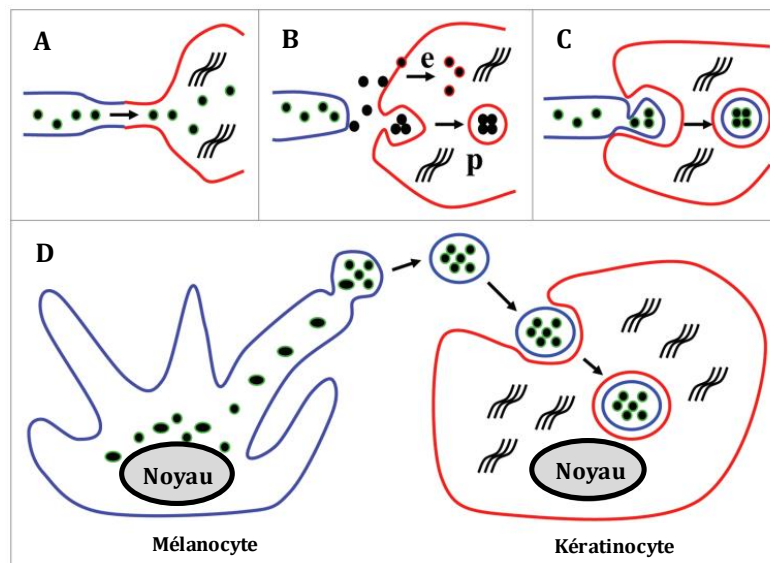


Figure 3 : Schéma représentant les voies de transfert des mélanosomes aux kératinocytes. A) Inoculation directe des mélanosomes dans les kératinocytes par la formation de nanotubules. **B)** Exocytose des mélanosomes sans membranes et capture par les kératinocytes par endocytose (e) ou phagocytose (p). **C)** Cytophagocytose des mélanocytes par les kératinocytes adjacents. **D)** Exocytose de vésicules contenant les mélanosomes qui sont ensuite phagocytées par les kératinocytes. *D'après Ando et al., 2011*

II. Les mélanosomes

Les mélanosomes sont des organites spécialisés dans la synthèse de la mélanine. Ils passent par quatre stades de maturation (I-IV) (**Figure 4**) qui sont déterminés sur la base de leur morphologie mais aussi la quantité, la qualité et l'arrangement de la mélanine produite. La mélanogénèse débute par la formation d'organites non pigmentés ou prémélanosomes (stade I et II). Ils sont assemblés dans la région périnucléaire à partir d'endosomes primitifs et de vésicules de l'appareil de Golgi. Les mélanosomes de stade I sont des vacuoles sphériques dépourvues de protéines de structures et de tyrosinase, enzyme essentielle à la mélanogénèse. Les prémélanosomes de stade II adoptent une forme ellipsoïdale particulière dite en ballon de rugby. Cette particularité morphologique est due à la présence de fibres protéiques qui servent de support à la séquestration de la mélanine. Le constituant principal de ces fibres est une protéine transmembranaire appelée Pmel17. Les enzymes impliquées dans la synthèse de mélanine (tyrosinase, tyrp1, tyrp2) sont adressées depuis des intermédiaires endosomiaux aux mélanosomes en cours de maturation (stade II et III), permettant ainsi l'évolution de ces derniers vers le stade IV. Les mélanosomes matures, contenant la mélanine, sont transportés grâce au réseau de microtubules vers la périphérie de la cellule, dans les extrémités dendritiques, avant d'être transférés aux kératinocytes (Delevoye et al., 2011; Raposo and Marks, 2007).

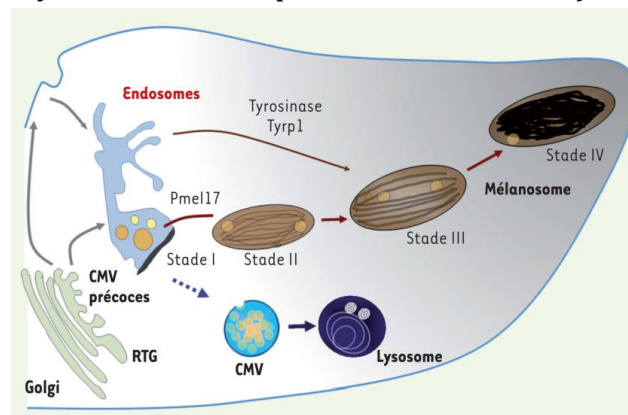


Figure 4 : La voie d'endocytose et la biogénèse des mélanosomes. Les mélanosomes proviennent de d'endosomes émanant de l'appareil de Golgi. La protéine prémélanosomale Pmel17 transite par les endosomes précoces afin de produire les fibres intraluminales caractéristiques des mélanosomes de stade II. Les enzymes tyrosinase et Tyrp1, sont adressées depuis des intermédiaires endosomiaux aux mélanosomes en cours de maturation (stades II et III). Les mélanosomes matures, contenant la mélanine (stade IV), sont transportés dans les extrémités dendritiques, avant d'être transférés aux kératinocytes. CMV : corps multi vésiculaires ; RTG : réseau *trans-golgien*. Delevoye et al., 2011

III. MITF, mélanogénèse et mélanine

La mélanogénèse est la fonction caractéristique des mélanocytes. La synthèse de la mélanine se produit au sein des mélanosomes, sous la régulation du facteur de transcription MITF (microphthalmia-associated transcription factor).

1. Le facteur MITF

Le facteur de transcription MITF est exprimé dans les cellules pigmentées, on le retrouve principalement dans les mélanocytes et l'épithélium pigmentaire rétinien.

Après une exposition des kératinocytes à des rayonnements UV, des dommages d'ADN apparaissent entraînant l'activation de p53. P53 induit la transcription de la proopiomelanocortin (POMC). POMC peut être clivée par voie enzymatique pour produire plusieurs dérivés physiologiquement importants notamment α -melanocyte stimulating

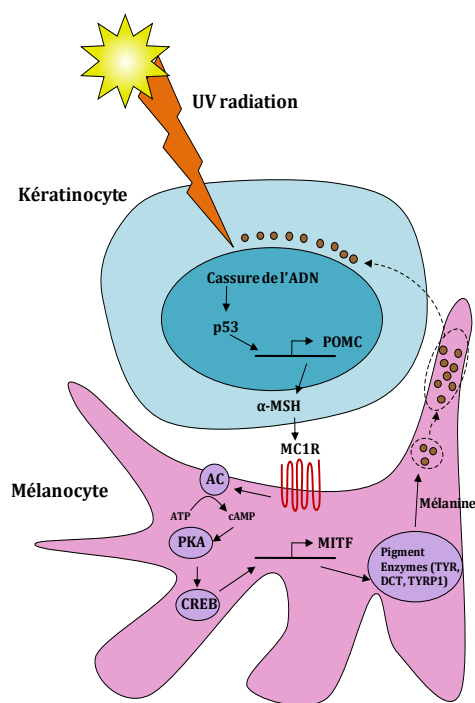


Figure 5 : Voie de signalisation induisant une production de mélanine après une exposition aux UV. D'après Hsiao and Fisher, 2014

hormone (α MSH). L' α MSH va se lier au récepteur MC1R (MelanoCortin 1 Receptor) des mélanocytes entraînant une activation de l'adénylyl cyclase (AC) puis la production de cAMP et l'activation de la protéine kinase A (PKA). Cette dernière provoque à son tour la phosphorylation de CREB, qui induit l'expression du facteur de transcription MITF après fixation au niveau de son promoteur (**Figure 5**) (Hsiao and Fisher, 2014).

MITF régule les enzymes responsables de la synthèse de la mélanine. Les enzymes sont les suivantes : la tyrosinase (TYR), la dopachrometautomerase (TRP2, appelé aussi DCT) et la tyrosinase-related protéine 1 (TRP1). L'activation du facteur MITF entraîne donc une production de mélanine.

De plus, MITF est un facteur de transcription modifiant de nombreux processus cellulaires dont le cycle cellulaire, la survie, la mobilité, l'invasion, le métabolisme et le stress oxydatif (**Figure 6**).

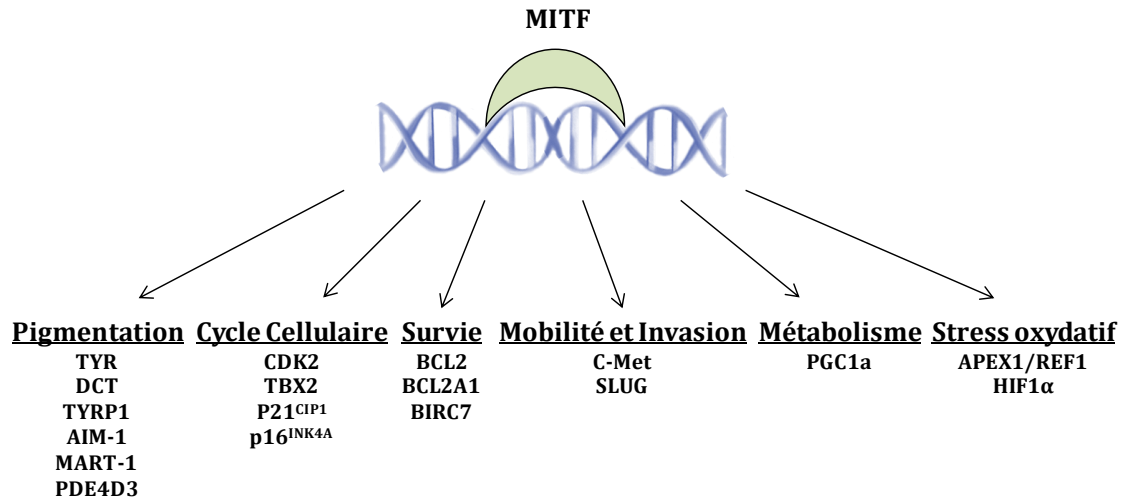


Figure 6 : Le facteur de transcription MITF est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation des mélanocytes et du mélanome. D'après Hsiao and Fisher, 2014

Dans le développement et la progression du mélanome, MITF a un rôle controversé. Les fonctions paradoxales de MITF peuvent être expliquées par la variation de son niveau d'expression, de ses différents co-facteurs et de ses modifications post-traductionnelles. Selon son niveau d'expression, MITF pourrait jouer un rôle pro ou anti-tumoral. En effet, lorsque MITF est inhibé de façon transitoire, un phénotype type « cellules souches » apparaît avec l'augmentation des marqueurs Oct4 et Nanog (Cheli et al., 2011), ainsi qu'une augmentation de la fibronectine et Snail, deux marqueurs mésenchymateux qui sont responsables d'une augmentation de l'invasion (Cheli et al., 2012). Tandis qu'un taux modéré de MITF est lié à la prolifération et un taux élevé à la différenciation cellulaire. Par ailleurs, une expression soutenue de MITF est associée à de la sénescence (Bertolotto, 2013).

2. La mélanogenèse

La mélanine est en réalité composée d'eumélanine et de phéomélanine dont les deux voies de synthèse sont bien caractérisées (**Figure 7**). La tyrosine est le précurseur commun à la production des deux mélanines. Il est tout d'abord converti en un réactif intermédiaire, la DOPA-Quinone (DQ) par l'action de l'enzyme tyrosinase. L'enzyme de la tyrosinase se retrouve dans presque toutes les espèces de la planète. L'évaluation de sa séquence et sa longueur a montré une grande diversité et hétérogénéité mais son site actif reste très conservé (Selinheimo et al., 2007). Une fois la DQ produite, les deux voies se séparent. Dans la synthèse d'eumélanine, le dopachrome, produit à partir de la DQ, peut être utilisé par TRP1 et TRP2 pour former un carboxyle intermédiaire : DHICA (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid). Le dopachrome peut aussi être transformé en DHI (5,6-dihydroxyindole) puis catalysé par la tyrosinase pour former de l'eumélanine. Dans la voie de la phéomélanine, la disponibilité de la cystéine et donc du soufre est un élément déterminant pour la synthèse. La DQ formée en amont peut immédiatement réagir avec un groupe sulfhydryle pour former la cysteinyl-DOPA et ensuite la quinone qui sera convertie en benzothiazine et benzothiazol. Ces produits se polymérisent pour former la phéomélanine (Nasti and Timares, 2015; Videira et al., 2013). La synthèse d'eumélanine requière une consommation en O₂ plus importante que celle de la phéomélanine.

La mélanogenèse produit un mélange d'eumélanine et de phéomélanine à différents ratios. Cette composition est déterminée par l'activité de la tyrosinase ainsi que la concentration et la disponibilité en tyrosine et cystéine (Simon et al., 2009).

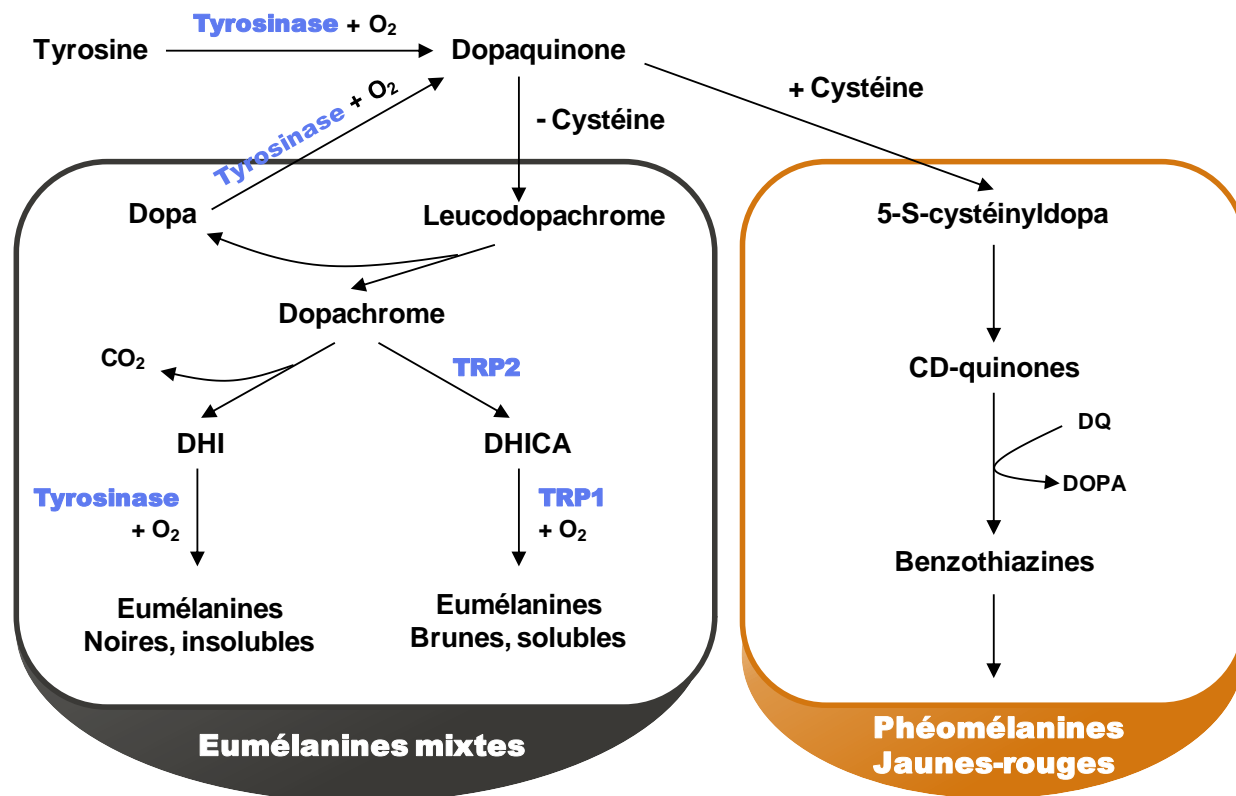


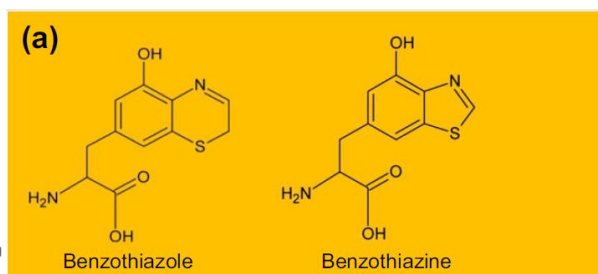
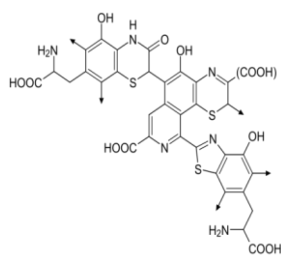
Figure 7 : Voie de synthèse de l'eumélanine et la phéomélanine. Les deux voies de synthèse commencent par la transformation de la tyrosine en dopaquinone sous l'action de la tyrosinase. Puis les deux voies se séparent. La présence de cystéine, induit la synthèse de phéomélanine par une succession de réactions chimiques. Dans le cas de l'eumélanine, l'action d'autres enzymes (TRP1 et TRP2) est nécessaire pour aboutir, après plusieurs étapes, à la synthèse finale d'eumélanine. *D'après Nasti and Timares, 2015*

3. La mélanine

Les deux pigments de mélanine sont de couleur différente : l'eumélanine est plutôt marron-noire tandis que la phéomélanine est de couleur jaune-rouge. La densité des mélanocytes est similaire et constante dans tous les types de peau (Nasti and Timares, 2015), il s'agit en réalité de l'activité de la tyrosinase ainsi que de la concentration en tyrosine et cystéine (Simon et al., 2009) qui va déterminer le ratio phéo/eumélanine et par conséquent la couleur de la peau et des cheveux.

La phéomélanine est composée principalement de benzothiazine et de benzothiazole contenant du soufre. La L-cystéine est la principale source de soufre et est essentielle pour la synthèse de phéomélanine. L'eumélanine est quant à elle un polymère très hétérogène composé de 5,6-dihydroxyindole (DHI) et de 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) (**Figure 8**). Ces deux types de mélanine ont des réponses différentes à une irradiation UV. L'eumélanine agit comme un agent photoprotecteur antioxydant alors que la phéomélanine qui contient beaucoup de soufre est un agent phototoxique pro-oxydant (Ito and Wakamatsu, 2008).

Phéomélanine



Eumélanine

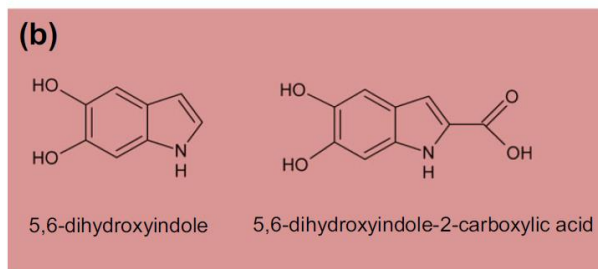
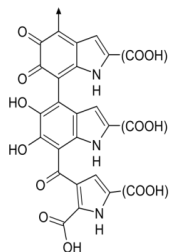


Figure 8 : Polymères de phéomélanine et d'eumélanine. Le benzothiazole et le benzothiazine (a) sont les monomères qui composent la phéomélanine. Le 5,6-dihydroxyindole et le 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid montrés en (b) se polymérisent pour former l'eumélanine. *Nasti and Timares, 2015*

La production d'eumélanine est régulée de part l'activité de la tyrosinase par la voie de signalisation MC1R. Deux ligands différents peuvent se lier à ce récepteur avec des activités opposées : l' α -MSH est un agoniste, tandis que la protéine de signalisation Agouti (ASIP) est un antagoniste. Comme décrit précédemment, la liaison avec α -MSH active la production de mélanine. L'ASIP entre en concurrence directe pour la liaison au récepteur MC1R, inhibant ainsi la synthèse de l'eumélanine (Nasti and Timares, 2015). Les animaux porteurs du gène « Agouti » produisent uniquement de la phéomélanine, leur pelage roux en témoigne.

Le mélanome

I. Epidémiologie

Le mélanome malin compte 232 000 nouveaux cas par an dans le monde. Ce qui représente 1,6% des cas de cancer. Les principales régions du globe affectées sont celles peuplées avec une communauté à la peau claire. L'Australie et la Nouvelle-Zélande sont les pays les plus touchés avec une incidence respective de 40,3 et 30,5 cas pour 100 000 individus, suivis par l'Amérique de Nord et l'Europe du Nord-Ouest avec une incidence de 10 pour 100 000. Le taux d'incidence estimé dans l'Asie du Centrale et du Sud-Est est très faible avec 0,5 cas pour 100 000 (**Figure 9**) (Ferlay et al., 2014).

Le taux de mortalité varie entre 0,1 chez les femmes asiatiques à environ 6 décès pour 100 000 chez les hommes australiens. Le mélanome a tué, dans le monde, environ 55 000 personnes en 2012. Parmi eux, 2 personnes sur 3 étaient dans une région développée (**Figure 9**).

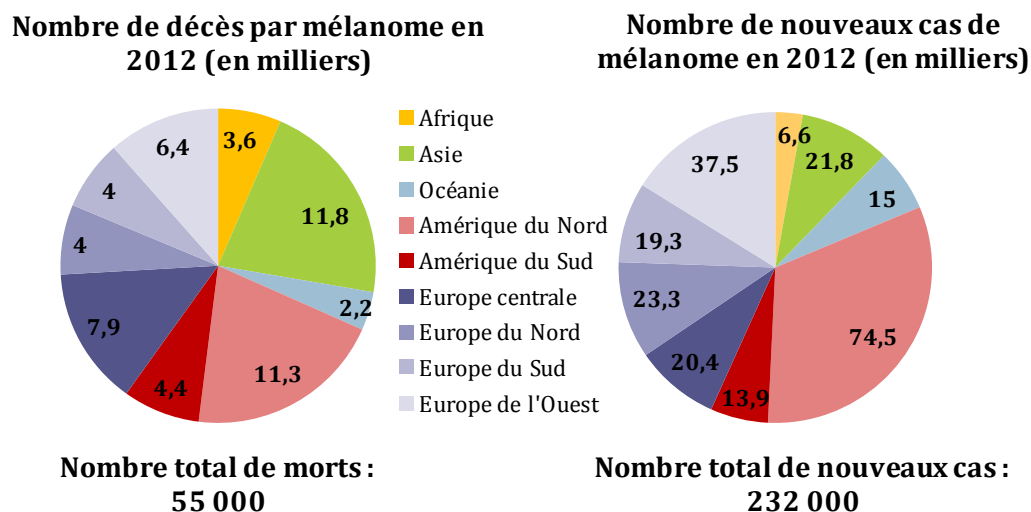


Figure 9 : Incidence et mortalité du mélanome en 2012. D'après Ferlay et al., 2014

II. Dépistage

1. Détection du mélanome primitif

a. Critères ABCDE

Depuis bientôt 30 ans, les critères ABCDE sont des paramètres simples utilisés à l'échelle mondiale pour évaluer la présence d'un mélanome. Afin d'éduquer le public et les personnels de santé sur la détection du mélanome à un stade précoce, Friedman et al. (Friedman et al., 1985) a publié en 1985 le mnémotechnique ABCD (asymétrie, bord irrégulier, variation de la couleur, diamètre > 6 mm). En 2004 (Abbasi et al., 2004), la lettre E (pour évolution) a été rajoutée comme critère de reconnaissance, du fait que l'évolution ou l'apparition d'un grain de beauté peut traduire la présence d'un mélanome (**Figure 10**). La mise en place de ce mnémotechnique n'est pas de fournir un modèle complet de toutes les caractéristiques de mélanome mais d'être un outil simple et direct. La prise en charge, et donc la détection, précoce d'un cas de mélanome est essentielle. En effet, un mélanome détecté tardivement sera difficilement éliminé efficacement par chirurgie ou aura déjà atteint un stade métastatique. Ainsi, dans 40 à 47 % des cas, les patients détectent eux-mêmes les lésions, et dans la majorité des cas, ils connaissaient la règle ABCDE. Malgré tout, cette évaluation a des limites, notamment dans la détection de mélanome de taille inférieure à 6 mm ou de tumeurs amélaniques (Tsao et al., 2015).

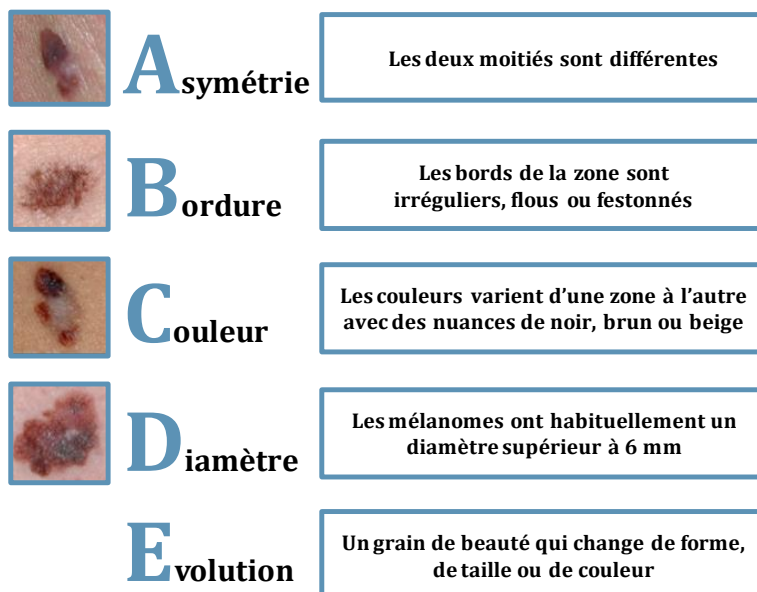


Figure 10 : Les critères ABCDE pour la détection d'un mélanome.

b. Différenciation entre mélanome/naevus grâce à la pigmentation

Le diagnostic précoce du mélanome est un challenge. En effet, dans les premiers stades, différencier un naevus d'un mélanome est difficile mais essentiel pour une prise en charge rapide et efficace. La mélanine fournit des informations sur le métabolisme et la mélanogénèse des mélanocytes. Ainsi, la distribution en eu/phéomélanine pourrait être un marqueur tumoral en raison de la phototoxicité de la phéomélanine (Ito and Wakamatsu, 2008). Les progrès récents en science du laser ont permis l'imagerie des tissus, notamment de la mélanine totale et des microvaisseaux dans des lésions pigmentées (Matthews et al., 2011). L'imagerie a réussi à discriminer optiquement l'eumélanine et la phéomélanine. Les analyses de lésions pigmentées ont montré que les mélanomes ont des quantités plus élevées en eumélanine par rapport au naevus mélanocytaire (Matthews et al., 2011). Les naevi dysplasiques semblent avoir une pigmentation avec une prédominance phéomélanique. Lorsque la lésion progresse en mélanome, l'équilibre se déplace vers l'eumélanine. Ces données démontrent que les changements de pigmentation sont pertinents pour la différenciation précoce du mélanome et du naevus. De plus, cette approche non invasive a permis d'examiner les changements histopathologiques qui marquent la transition entre le naevus pigmenté et le mélanome malin. Cette technique a permis de discriminer les naevus ordinaires des dysplasiques par l'observation de la morphologie des kératinocytes épidermiques, l'apparition de foyer de mélanocytes entourées de fibres de collagène, et la structure de la jonction dermo-épidermique (Balu et al., 2014).

2. [¹⁸F]-FDG : radiotracteur de référence pour l'imagerie du mélanome métastaté

En cas d'atteinte des réseaux vasculaire et lymphatique par les cellules tumorales, il est nécessaire de réaliser un bilan d'extension afin de déterminer la localisation des métastases. Actuellement, le radiotracteur de référence en oncologie est le [¹⁸F]-2-fluoro-2-desoxy-D-glucose ([¹⁸F]-FDG) marqué au fluor 18 (émetteur β+, demi-vie : 110 minutes). Le [¹⁸F]-FDG est un analogue du glucose, il est donc capable de pénétrer dans les cellules par les transporteurs GLUT-1. Le [¹⁸F]-FDG suit ensuite les premières étapes du processus

de métabolisation du glucose et s'accumule dans les cellules tumorales qui possèdent un fort métabolisme glucidique. Il est alors visualisé à l'aide d'une caméra de tomographie par émission de positons (TEP).

Récemment, le [^{18}F]-FDG a prouvé qu'il était un outil intéressant pour évaluer la réponse tumorale chez des patients traités avec le Vemurafenib. Une diminution de la fixation du [^{18}F]-FDG quelques jours après le traitement prédit donc l'efficacité du traitement (**Figure 11**) (McArthur et al., 2012).

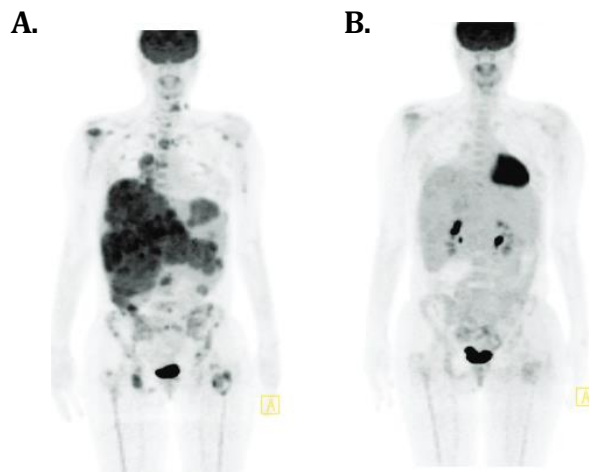


Figure 11 : Réponse au ^{18}F -FDG chez un patient traité au vemurafenib. A) Niveau métabolique de base. B) 15 jours après traitement. McArthur et al., 2012

Cependant, ce radiotracteur présente certains inconvénients. Du fait de l'activité hautement glycolytique du cerveau, le [^{18}F]-FDG présente une accumulation importante dans ce tissu. Les métastases cérébrales sont donc difficilement détectables. De plus, le [^{18}F]-FDG se fixe aussi sur les tissus non tumoraux tels que les sites inflammatoires entraînant des résultats faux positifs. Dans le cas du mélanome, le [^{18}F]-FDG ne permet pas la discrimination entre les lésions secondaires du mélanome et les éventuelles métastases d'une autre origine tissulaire (Cachin et al., 2009). Le développement de nouveaux traceurs spécifiques du mélanome reste un axe de recherche important. L'UMR 990 Inserm/Uda travaille sur des vecteurs présentant une affinité spécifique pour la mélanine, l'étude de ces radiotraceurs est développée ultérieurement.

Du mélanocyte au mélanome

L'exposition intense au soleil est souvent la cause de l'évolution des mélanocytes en mélanome. En effet, les rayonnements UV induisent des mutations génétiques qui conduisent à la production de facteurs de croissance, l'altération des fonctions immunitaires et la diminution de l'apoptose (Miller and Mihm, 2006). Ces anomalies conduisent à l'apparition de mélanocytes malins qui échappent alors au contrôle rigoureux des kératinocytes et prolifèrent de manière anarchique (Gray-Schopfer et al., 2007). Le mélanome évolue en plusieurs étapes : l'immortalité des cellules, la capacité de créer une vascularisation, l'invasion tumorale et la formation de métastases (Thompson et al., 2005).

I. Progression des mélanocytes en mélanome

Le modèle de Clark (**Figure 12**) décrit en plusieurs phases histologiques la progression des mélanocytes en mélanomes malins. Le premier changement phénotypique est généralement le développement d'un naevus bénin en naevus dysplasique (lésion pré maligne). Seulement un nombre restreint de naevi progresse en cancer. La seconde étape est caractérisée par une prolifération intra-épidermale des cellules qui peut impliquer des lésions locales de micro-invasion du derme, elle correspond à la croissance horizontale « Radial Growth Phase » (RPG). Les cellules acquièrent des propriétés prolifératives et deviennent résistantes à l'apoptose. Par la suite, les mélanocytes évoluent vers la phase de croissance verticale « Vertical Growth Phase » (VPG). La perte de contrôle des kératinocytes sur le nombre de mélanocytes induit des changements au niveau des interactions cellulaires, notamment le changement des E-cadherines en N-cadherines qui contribue à une forme de pseudo transition épithélio-mésenchymateuse (Kreiseder et al., 2013; Miller and Mihm, 2006). D'autre part, les cellules acquièrent la propriété de traverser la membrane basale et d'envahir le derme grâce à la synthèse d'enzymes telles que les métalloprotéases de la matrice (MMP), les cathepsines ou les glycosidases (Christofori, 2006). La dernière étape de ce modèle se traduit par une dissociation des cellules et une migration jusqu'aux capillaires sous-cutanés et aux vaisseaux lymphatiques (Bandarchi et

al., 2010; Gray-Schopfer et al., 2007; Miller and Mihm, 2006). Une fois au niveau de la circulation, une grande partie des cellules tumorales est éliminée par des contraintes mécaniques et immunitaires. Les cellules survivantes vont arriver à l'organe cible, adhérer à la membrane basale endothéliale, extravaser, migrer à travers la matrice extracellulaire (MEC) et former des colonies au niveau du nouveau site métastatique. Une induction de la néoangiogenèse est alors requise pour assurer la survie des cellules métastatiques (Fidler, 2002).

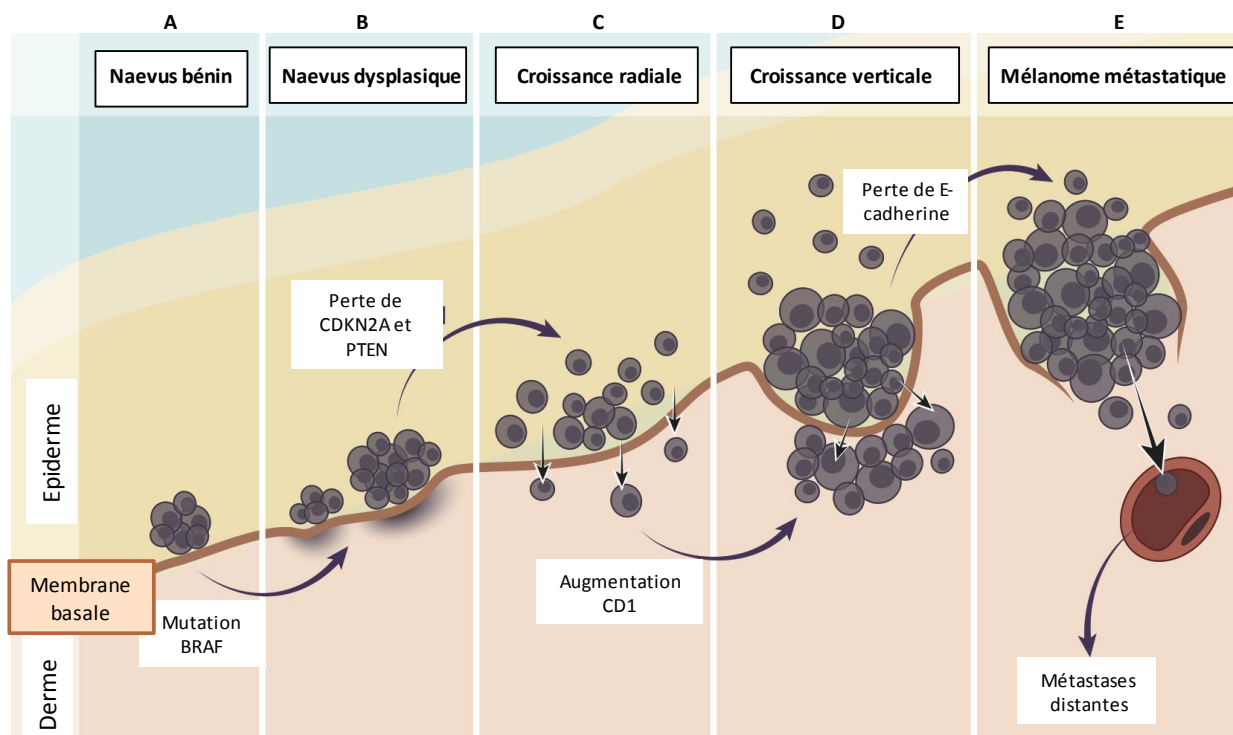


Figure 12 : Modèle d'apparition et de propagation du mélanome cutané. Le naevus bénin (A) a une croissance contrôlée. Un changement dans son génome, telle qu'une mutation BRAF (voir par la suite chapitre II, les mutations somatiques présentement décrites), entraîne une prolifération anarchique des cellules (B). Il y a ensuite une phase de croissance radiale (C), où les cellules peuvent se différencier. Puis une phase de croissance verticale (D), les cellules expriment N-cadhérines ou les MMPs, progressent dans l'épiderme et franchissent la membrane basale. Après avoir atteint la lymphe et la circulation sanguine, les cellules tumorales envahissent d'autres sites distants (E). Il faut noter que le mélanome peut se développer aussi à partir de mélanocytes non agrégés en naevus. *D'après Miller and Mihm, 2006*

II. Voies impliquées dans la tumorigenèse du mélanome

Le développement tumoral est dû, en général, à des dérégulations des voies de signalisation. Les cellules cancéreuses présentent des caractéristiques particulières : une immortalité répliquative, une prolifération importante et la résistance à la mort cellulaire. Dans le cas du mélanome, plusieurs voies sont impliquées dans la progression des mélanocytes en tumeur : MAPK, PI3K/PTEN, β -caténine ou encore p53. Cependant, la transformation d'une cellule isolée en tumeur solide nécessite des processus supplémentaires. L'angiogenèse et/ou la néovascularisation, l'échappement au système immunitaire ainsi que l'augmentation du potentiel métastatique sont des mécanismes impliqués dans l'apparition de tumeurs.

1. La voie des MAP-Kinases

La voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) joue un rôle clé dans le développement du mélanome. Dans les mélanocytes normaux, cette voie de signalisation est activée par des facteurs de croissance, des hormones ou des neurotransmetteurs qui viennent se lier aux récepteurs à activité tyrosine kinase. Cette liaison déclenche l'activation de la GRB2 (Growth factor Recepteur-Bound protein 2) et de SOS (Son of Sevenless) qui convertit la RAS-GDP inactive en RAS-GTP active. A ce niveau, RAS peut aussi être régulé négativement par l'activité GTPase de la protéine NF1 (Neurofibrine 1) (Glitza and Davies, 2014). La protéine RAS activée provoque la formation du « complexe MAPK » avec la phosphorylation successive des protéines RAF, MEK1/2 et ERK1/2 jusqu'à la transcription de gènes au niveau nucléaire, conduisant *in fine* à différentes réponses cellulaires telles que la croissance, la différenciation, la survie, la migration ou encore l'angiogenèse (**Figure 13**). La voie MAPK affecte aussi l'apoptose en phosphorylation des protéines telles que BAD, MCL-1, caspase-9 ou encore BCL-2 (Inamdar et al., 2010).

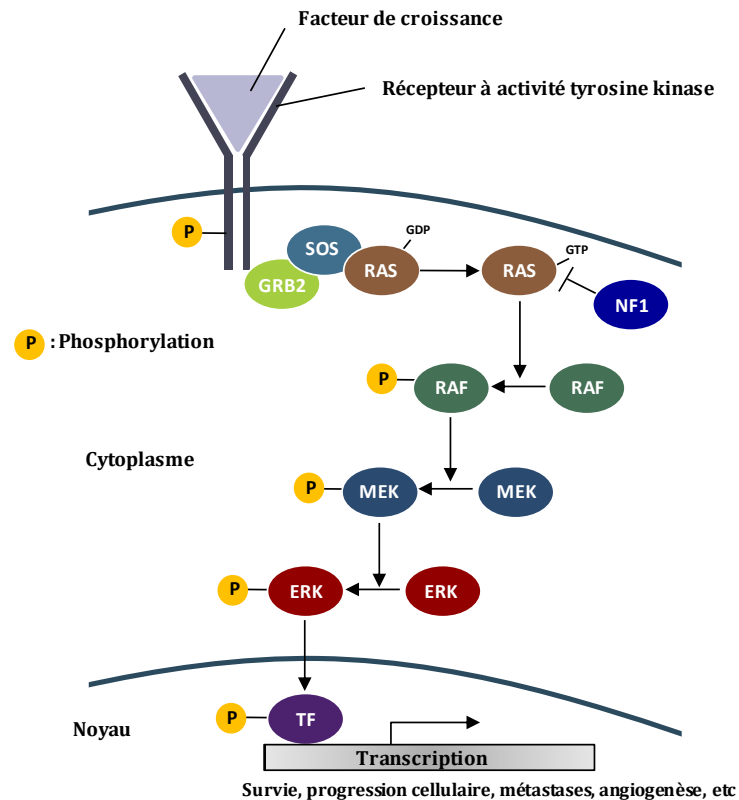


Figure 13 : Voie des MAPK. La signalisation des facteurs de croissances est transmise par les récepteurs à activité tyrosine kinase. A la suite de la fixation d'un ligand, le récepteur s'autophosphoryle et se lie à RAS par l'intermédiaire de différentes protéines adaptatrices. Quand RAS est activé, il enclenche une cascade de phosphorylation impliquant RAF, MEK et ERK. ERK activé passe au niveau nucléaire et active différents facteurs de transcription (TF) nécessaires pour la prolifération cellulaire. *D'après Dahl and Guldborg, 2007*

Dans de nombreux cancers, la dérégulation de la voie MAPK est fréquente. Elle est souvent la conséquence des mutations des gènes B-RAF ou RAS (**Figure 14**). Dans le mélanome, la mutation de NRAS est retrouvée dans 30% des cas (Lau and Haigis, 2009). Il s'agit dans 40% des cas d'une substitution de la glutamine 61 par une arginine (Q61R). Cette mutation perturbe l'hydrolyse du GTP et maintient la protéine sous une forme constitutivement active. Les gènes KRAS et HRAS sont quant à eux mutés plus rarement dans le mélanome, ils représentent environ 1-2% des patients. RAF est l'effecteur en aval de RAS. Dans le génome humain, il existe trois gènes de RAF : ARAF, BRAF et CRAF (Wellbrock et al., 2004). BRAF est retrouvé muté dans 50-70% des cas de mélanome. Dans

environ 80% des cas des mutations de BRAF, il s'agit de la substitution de l'acide glutamique par la valine sur l'acide aminé à la position 600 (V600E) (Akbari et al., 2015; Cheng et al., 2013; Davies et al., 2002).

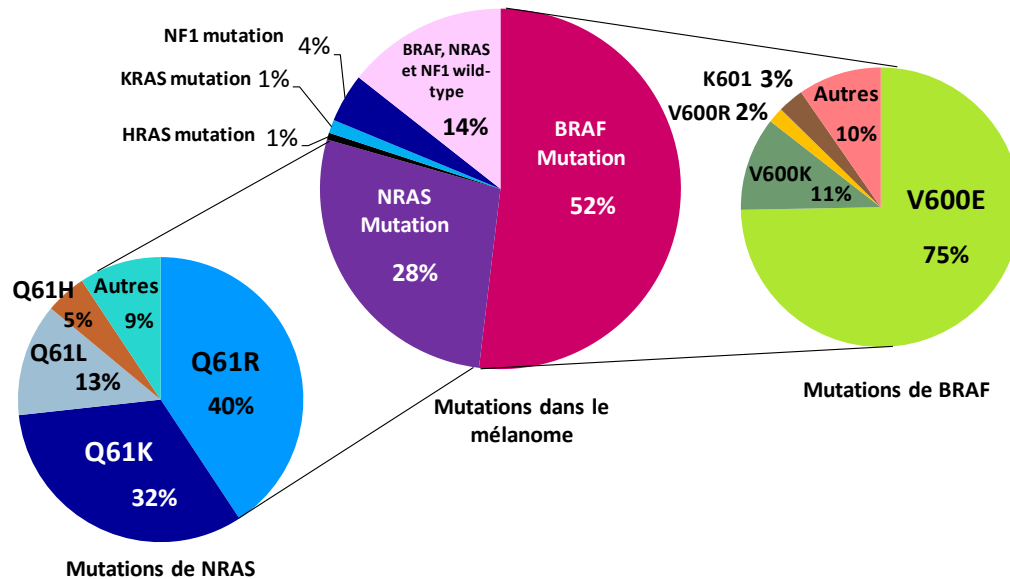


Figure 14 : Pourcentage des mutations de BRAF, NRAS et NF1 retrouvées chez des mélanomes primitifs et leurs métastases. D'après Akbari et al., 2015

Les mutations BRAF provoquent un changement d'acide aminé (Valine en position 600) modifiant la conformation de la kinase au niveau de son site actif, lui conférant une activité constitutive (Wan et al., 2004). L'ensemble des mutations de la voie MAPK est à l'origine d'une activité accrue de cette voie de signalisation, favorisant ainsi la prolifération cellulaire, l'invasion, les métastases, la migration, la survie ou encore l'angiogenèse (Inamdar et al., 2010; Wang and Qi, 2013). La mutation de BRAF V600E coïncide rarement avec celle de RAS dans la même tumeur (Goel et al., 2006) suggérant que ces deux mutations sont toutes les deux efficaces pour l'activer l'axe MEK-ERK. Il a été montré que l'inactivation de l'oncogène *braf* seul peut bloquer la croissance tumorale et la formation de métastases dans des modèles de xénogreffe et chez des patients atteints de mélanomes métastatiques (Sala et al., 2008). NF1 inhibe RAS par son activité GTPase, une mutation de NF1 a pour conséquence l'activation de la voie de signalisation MAPK (Akbari et al., 2015).

2. La voie PI3K/PTEN/AKT

La voie PI3K/AKT est impliquée dans différents processus biologiques tels que la prolifération, la survie ou encore le cycle cellulaire. Des ligands extracellulaires, tels que des facteurs de croissance, vont se lier aux récepteurs à activité tyrosine kinase et activer la voie via RAS. En réponse à ces signaux, la PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) phosphoryle le phosphoinositide bis phosphate (PIP2) localisé au niveau membranaire et le convertit en un second messenger, le phosphoinositide triphosphate (PIP3). Le PIP3 phosphoryle et active AKT (Protein Kinase B), qui à son tour stimule de nombreux facteurs contrôlant la prolifération et la survie cellulaire. PTEN (phosphatase and tensin homolog) est un régulateur négatif des facteurs de croissance. PTEN a une activité phosphatase qui contrecarre PI3K en déphosphorylant PIP3 et inhibe ainsi le rôle d'AKT dans la survie et la prolifération (**Figure 15**) (Dahl and Guldborg, 2007; Jazirehi et al., 2012; Steelman et al., 2011).

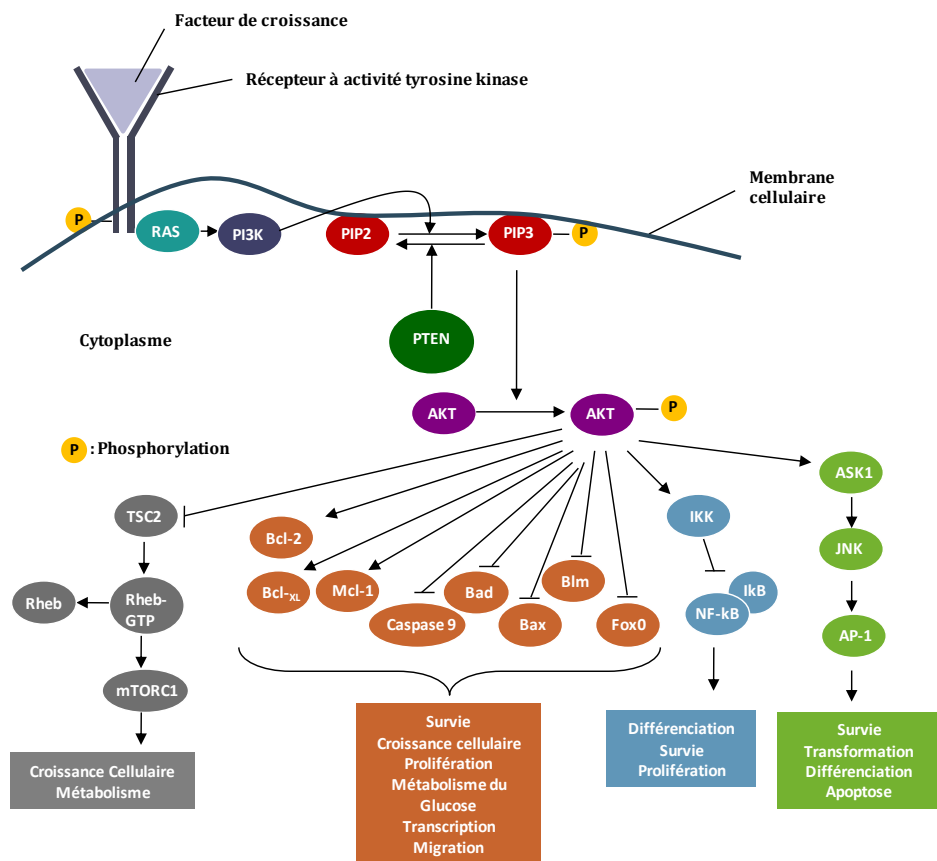


Figure 15 : Voie de signalisation de PI3K. Le récepteur à activité tyrosine kinase est activé par un ligand et active à son tour la PI3K. PI3K entraîne la phosphorylation finale d'AKT qui active plusieurs voies telles que la survie ou la prolifération cellulaire. *D'après Jazirehi et al., 2012*

Dans le cas du mélanome, l'hyperactivité de la voie PI3K/AKT est fréquemment observée. Le gène *PTEN* peut subir des modifications inhibitrices (mutation par délétion ou insertion) qui enlèvent le contrôle sur PI3K et favorisent ainsi la croissance tumorale. Le gène codant pour la PI3K peut aussi subir des mutations, la rendant constitutivement active. Cependant, PTEN est muté dans moins de 30% des cas et les mutations de PI3K sont très rares (3% des mélanomes métastatiques). Cela suggère la présence d'autres aberrations permettant l'activation d'AKT. En effet, il a été montré que la voie PI3K peut être activée par une mutation activatrice de NRAS, qui est une protéine située en aval de PI3K. L'augmentation de l'activité de la voie PI3K peut résulter de l'amplification du nombre de copies d'AKT3. Cette aberration est présente dans environ 60% des cas de mélanome (Fecher et al., 2007; Gray-Schopfer et al., 2007; Stahl et al., 2004).

3. La β -caténine dans la voie de signalisation Wnt/Frizzled

La β -caténine est un composant clé de la voie de signalisation induite par la glycoprotéine Wnt (wingless integration site) se fixant sur le récepteur Frizzled, récepteur à 7 domaines transmembranaires. Cette voie contrôle une large gamme de fonctions cellulaires, et une dérégulation peut-être à l'origine du développement et de la propagation de différents cancers. En absence de la fixation de Wnt sur le récepteur Frizzled, la β -caténine se lie à un complexe de dégradation composé de plusieurs protéines : APC (Adematous Polyposis Coli), Axine, CK1 (Casein Kinase 1) et GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β). La GSK3 β phosphoryle la β -caténine au niveau de sa partie N-terminale. Cette modification permet l'ubiquitination de la protéine par β TrCP et son adressage vers le protéasome pour sa dégradation (**Figure 16**). La fixation de Wnt sur le récepteur Frizzled provoque le recrutement de la protéine Dvl (Dishevelled) qui à son tour recrute l'Axine, formant ainsi un complexe multiprotéique à la membrane plasmique. Wnt phosphoryle également les protéines LRP 5/6 (Lipoprotein receptor-related protein) pour améliorer le recrutement de l'Axine à la membrane. Ce processus conduit à l'inhibition du complexe APC/GSK3 β /Axine/ β -caténine. La β -caténine ainsi libérée s'accumule au niveau cytoplasmique et transloque dans le noyau (**Figure 16**) (Clevers and Nusse, 2012).

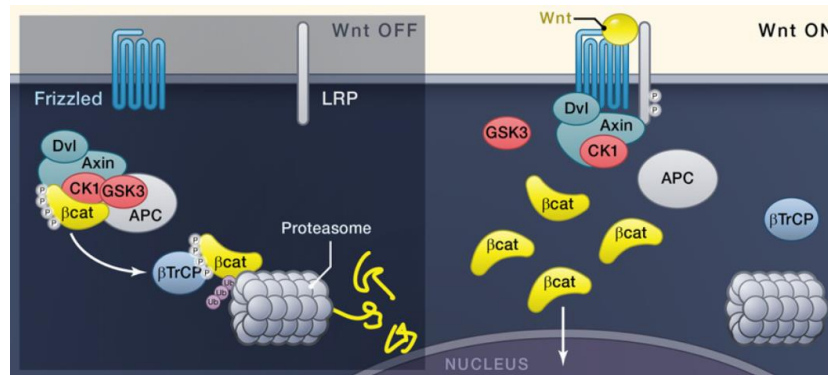


Figure 16 : Voie de signalisation Wnt et complexe de destruction de la β -caténine. Clevers and Nusse, 2012

Au niveau nucléaire, en absence de signal Wnt, le facteur de transcription TCF (T-cell factor) interagit avec le répresseur transcriptionnel Groucho empêchant ainsi la transcription des gènes cibles. Lorsque Wnt active la voie, la β -caténine remplace Groucho au niveau de TCF et recrute des activateurs transcriptionnels tels que Brg1, CBP, Cdc47, Bcl9 et Pygopus. Ces derniers vont diriger l'expression de gènes comme *c-Myc* et *cycline D1* qui interviennent dans la prolifération et la survie cellulaire (**Figure 17**) (Clevers and Nusse, 2012).

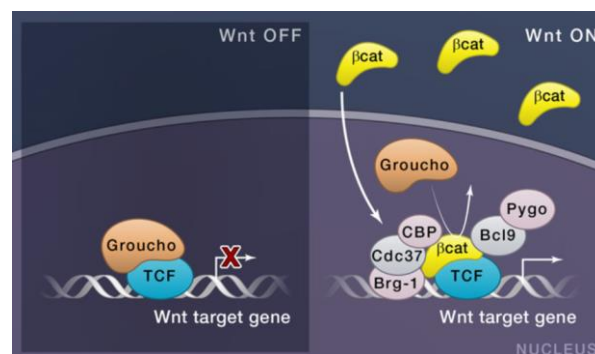


Figure 17 : Voie de signalisation Wnt au niveau nucléaire. Clevers and Nusse, 2012

Le rôle de la voie Wnt et de la β -caténine dans le mélanome est controversé. En effet, si cette voie de signalisation est fréquemment activée dans le cas du mélanome, il semble que l'accumulation de la β -caténine dans le noyau ne soit pas un signe d'agressivité des tumeurs (Atkinson et al., 2015). En dépit de son rôle positif sur la migration et l'invasion

des cellules de carcinome, la β -caténine diminue la migration des mélanocytes et des cellules de mélanome (Gallagher et al., 2013). De plus, une étude (Chien et al., 2009) a démontré que l'expression de Wnt3 et l'activation de la voie Wnt avaient pour conséquence une diminution de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale sur des modèles de mélanomes murins et humains. Le Riluzole est un médicament actuellement en étude clinique et approuvé par la FDA pour le traitement du mélanome. Il active la voie Wnt/ β -caténine et a montré une diminution du nombre de métastases dans un modèle B16 (Biechele et al., 2010).

4. Les protéines régulant le cycle cellulaire (INK4A/ARF)

CDKN2A (cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor 2A gene) est un gène qui code pour des protéines régulant le cycle cellulaire. Lorsque ce gène est muté, le risque de développer un mélanome est considérablement augmenté, et il a été observé que 25 à 50% des mélanomes familiaux sont associés à la mutation de *CDKN2A* (Goldstein et al., 2007). Le gène *CDKN2A* code pour deux suppresseurs de tumeurs $P16^{INK4A}$ et $p14^{ARF}$, appelé également ARF. Les gènes des deux protéines ont en commun l'exon 2 du locus *CDKN2A*. La différence réside dans l'épissage alternatif, qui se produit au niveau de l'exon 1 afin d'attribuer l'exon 1 α à $P16^{INK4A}$ et l'exon 1 β à $p14^{ARF}$ (Figure 18) (Nelson and Tsao, 2009).

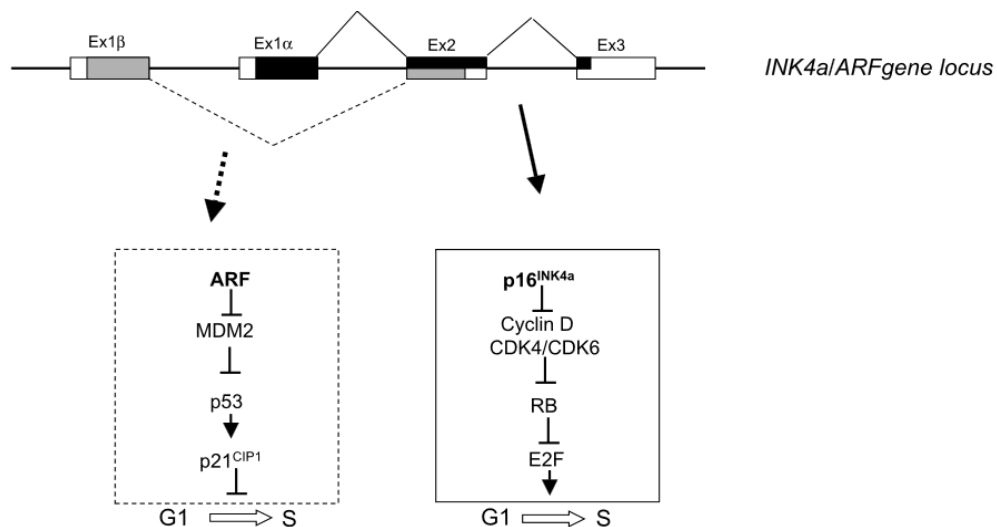


Figure 18 : Les loci du gène *INK4A/ARF* codent pour les protéines $P16^{INK4A}$ et $p14^{ARF}$, régulatrices des voies Rb et p53 respectivement. D'après Ohtani et al., 2004

a. La voie p16^{INK4A}-CDK4/6-Rb

P16^{INK4A} inhibe la division cellulaire en bloquant les cellules en phase G1. En effet, P16^{INK4A} séquestre CDK4 et CDK6 (cyclin-dépendent kinases) et permet au suppresseur de tumeur Rb (retinoblastoma protein) de rester sous sa forme active non phosphorylée. L'inactivation de P16^{INK4A} va permettre aux CDK de phosphoryler Rb et libérer le facteur de transcription E2F. E2F est à l'origine de l'entrée de la cellule dans la phase S du cycle cellulaire (**Figure 18**) (Ohtani et al., 2004). L'inactivation du gène *INK4A* par mutation ponctuelle, délétion ou par méthylation de son promoteur est retrouvée dans la majorité des mélanomes sporadiques et dans 30% des mélanomes familiaux (Rother and Jones, 2009). L'inactivation de la voie P16^{INK4A}-CDK4/6-Rb peut se produire aussi par la mutation du gène *cdk4* rendant la protéine insensible à P16^{INK4A}. Deux mutations ont été décrites pour *cdk4*, toutes les deux consistent à la substitution de l'arginine 24 par une cystéine ou une histidine (Ward et al., 2012). Des cas d'amplication de *cdk4* ont été observées dans certains mélanomes sporadiques, particulièrement dans les mélanomes muqueux et acraux, avec une activité inchangée P16^{INK4A} (Muthusamy et al., 2006).

b. La voie ARF-p53

La voie p53 est responsable du maintien de l'intégrité du génome, de la fidélité de la réplication de l'ADN, de la séparation des chromosomes et de la division cellulaire. La protéine 53 est un facteur de transcription couramment nommé « suppresseur de tumeur ». En effet, en réponse à un stress cellulaire, la fonction de p53 est d'initier la réparation de l'ADN, de stopper le cycle cellulaire ou d'engager la sénescence ou l'apoptose en cas de dégâts trop importants. Ces réponses empêchent la propagation de cellules comportant un ADN endommagé et présentant un potentiel oncogénique. Les différentes activités de p53 sont régulées par de nombreuses modifications post-traductionnelles (**Figure 19**) (Fecher et al., 2007; Leblanc and May, 2002).

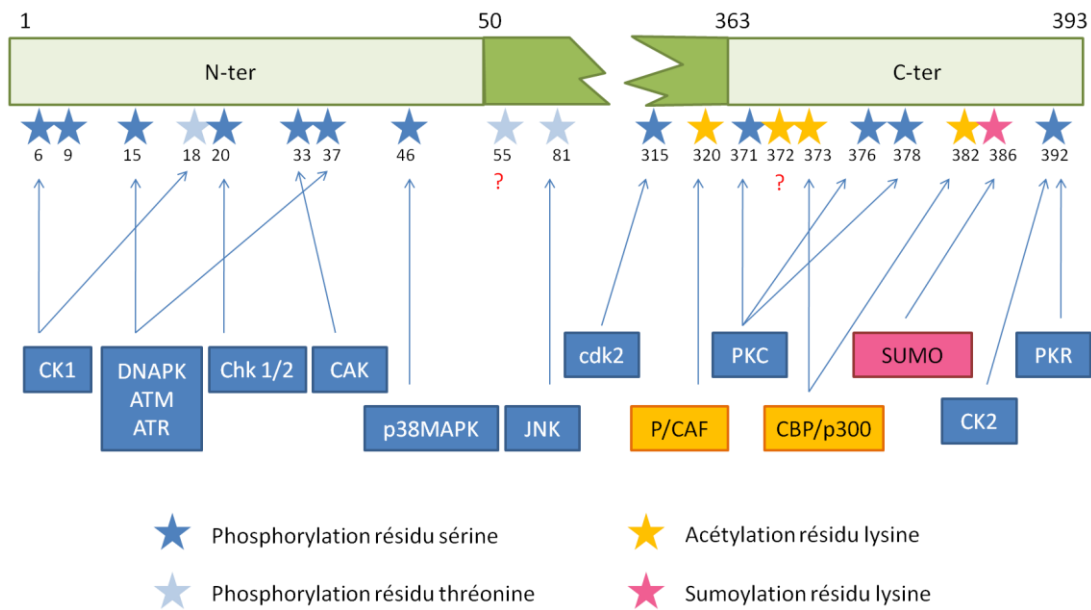


Figure 19 : Modifications post-traductionnelles de p53. D'après Leblanc and May, 2002

ARF régule positivement p53 en se liant à MDM2 et entraînant ainsi son inhibition. MDM2 interagit avec une ubiquitine ligase pour marquer les protéines par une ubiquitine. Les protéines ainsi identifiées sont adressées au protéasome pour être dégradées. Une mutation sur *ARF* va altérer la liaison avec MDM2. Sous sa forme libre, MDM2 va augmenter la dégradation de p53 et ainsi diminuer la reconnaissance des dommages de l'ADN (Nag et al., 2013). P53 est muté dans environ la moitié des cas de cancer. Cependant, la fréquence des mutations varie en fonction des types de cancer. En effet, alors que le taux de mutation est d'environ 50-70 % pour le cancer du poumon, il n'est que de 10 à 20% pour le mélanome (Olivier et al., 2010). La faible proportion de mutation de P53 peut être expliquée par le fait que les aberrations génétiques touchent préférentiellement les gènes régulant p53. En effet, la plupart des mutations affectent ARF, engendrant une extinction de p53. Il a aussi été démontré que MDM4, qui est un autre régulateur négatif de p53, est surexprimé dans près de 65% des mélanomes (Gembarska et al., 2012). La restauration des fonctions de p53 est l'une des dernières stratégies développées pour lutter contre le mélanome. Une molécule, la Nutlin 3 se lie au site de liaison de M2MD sur p53, perturbe spécifiquement la liaison MDM2-p53 et stabilise ainsi p53 dans les tumeurs surexprimant MDM2. La Nutlin 3 n'a montré qu'une modeste réactivation de la mort cellulaire médiée par p53, suggérant la présence d'autres inhibiteurs (Vassilev et al., 2004). En effet, MDM4 agit

également négativement sur p53 et tout comme MDM2, sa liaison peut être inhibée par une molécule : la SAH-p53-8. La restauration de fonction de p53 en parallèle de l'inhibition de la voie BRAFV600E par le Vemurafenib présente une nouvelle opportunité thérapeutique (Lu et al., 2014).

5. L'immortalité répllicative

Une étape clé dans la transformation maligne est l'acquisition d'une capacité répllicative illimitée. Après un certain nombre de cycles de division, une cellule normale entre en sénescence. Ce mécanisme a besoin d'un groupe de protéines codées par des gènes dits « suppresseurs de tumeur » (par exemple *p53*). Ces gènes régulent de façon négative la croissance et/ou la prolifération cellulaire. Une mutation de ces gènes peut ainsi soutenir à la fois l'immortalisation et la prolifération effrénée.

Une autre condition préalable à l'immortalité répllicative est la capacité de la cellule à protéger ses télomères. Dans les cellules non-immortalisées, la réplication non contrôlée est limitée par le raccourcissement successif des télomères. La télomérase est une enzyme qui stabilise les télomères et conserve la longueur des chromosomes. Elle est très peu exprimée dans les cellules « normales », en revanche, dans les cellules cancéreuses, son expression est élevée. Elle contrecarre l'érosion des télomères et par conséquent, l'entrée des cellules en sénescence ou en apoptose. Elle est donc responsable de l'immortalité des cellules tumorales (Genescà et al., 2006). Deux mutations, C228T et C250T, présentes sur le promoteur de la télomérase : TERT (TElomerase Reverse Transcriptase) ont été retrouvées dans 71% des mélanomes. En comparaison avec le promoteur TERT non-muté, ces deux mutations augmentent d'environ deux à quatre fois l'activité transcriptionnelle dans les lignées de mélanome étudiées (Huang et al., 2013).

6. Echappement à la réponse immunitaire

Chez un individu sain, il y a en permanence une immunosurveillance qui limite la formation et la progression des cellules tumorales. Lorsqu'une cellule aberrante apparaît, le système immunitaire la détecte, via plusieurs mécanismes et l'élimine. Généralement, ce sont les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ qui vont freiner le développement du cancer par des mécanismes impliquant la production d'interféron (IFN) et de cytotoxines (Zamarron and Chen, 2011). Néanmoins, les cellules cancéreuses développent des mécanismes qui leur permettent d'échapper à l'immuno-surveillance.

L'absence ou la diminution des antigènes de surface est une des premières caractéristiques des cellules cancéreuses. En supprimant les antigènes de reconnaissance, les cellules cancéreuses deviennent « invisibles ». L'inhibition de la liaison avec les lymphocytes T permet donc aux les cellules cancéreuses de se soustraire au contrôle immunitaire (**Figure 20A**) (Schatton et al., 2008). Les tumeurs peuvent également inactiver les LT via des cytokines produites directement par les cellules cancéreuses, ou indirectement par d'autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes T régulateurs (Treg) (**Figure 20B**). TGF- β ainsi qu'IL-10 sont deux médiateurs clés qui contribuent de manière significative à la croissance tumorale (Vinay et al., 2015). De plus ces cytokines immunosuppressives inhibent la maturation des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques immatures ne présentent plus l'antigène lors de la co-stimulation avec les LT. La protéine PD-1 (Programmed cell death 1) est exprimée au niveau membranaire par les LT. Son ligand, PDL-1, est quand à lui retrouvé sur les cellules tumorales et inhibe l'action des LT lors de sa liaison avec PD-1 (**Figure 20C**) (Gatalica et al., 2014). L'échappement à la réponse tumorale est vaste et la liste n'est pas exhaustive.

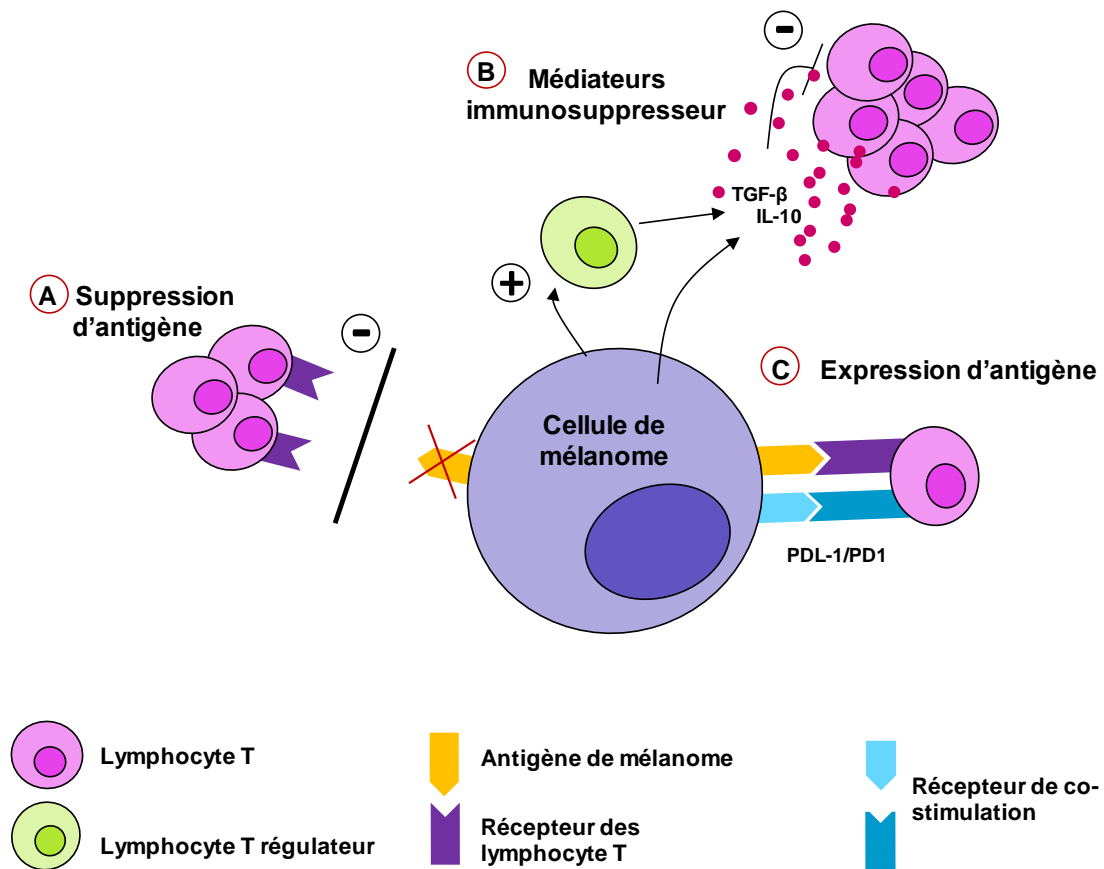


Figure 20 : Les différents mécanismes mis en oeuvre par la cellule tumorale pour échapper au contrôle du système immunitaire. D'après Schatton and Frank, 2009

7. L'Angiogenèse

Il a été observé que lorsque les tumeurs atteignent une taille supérieure à 1-2 mm, la limite de diffusion des nutriments était atteinte. En raison d'un approvisionnement insuffisant en éléments nutritifs ainsi qu'une mauvaise clairance des déchets métaboliques une hypoxie et une acidose apparaissent.

L'hypoxie est un des principaux facteurs responsables de l'angiogenèse des tumeurs. En normoxie, la PHD2 (prolyl hydroxylase domain proteins 2) utilise l'oxygène pour hydrolyser les facteurs de transcription HIF1 α et 2 α (Hypoxia-Inducible Factors), les ciblant ainsi pour la dégradation par le protéasome. La PHD2 devient inactive dans des conditions hypoxiques, permettant ainsi aux HIFs d'échapper à la dégradation et de transcrire les gènes pour lutter contre l'hypoxie, notamment VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)(Cao et al., 2013; Semenza, 2010). La production de VEGF par les tumeurs peut également être favorisée par l'acidose, les cytokines inflammatoires, les facteurs de croissance et les mutations d'oncogènes responsables du développement cancéreux (Figure 21) (Ferrara, 2009).

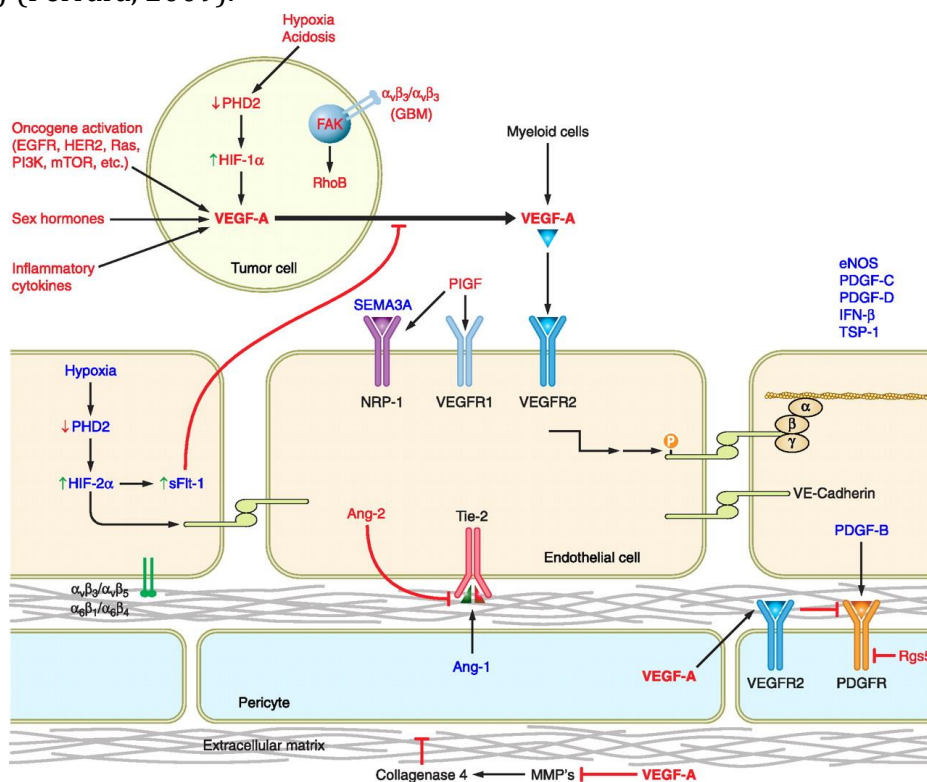


Figure 21 : Facteurs impliqués dans la prolifération anarchique (en rouge) ou la normalisation (en bleu) de l'angiogenèse tumorale. Goel et al., 2011

La surexpression de VEGF et d'autres facteurs pro-angiogéniques tels que l'angiopoïétine 2 (Ang-2) ou le PlGF (Placenta Growth Factor) entraînent la formation d'une vascularisation tumorale anormale (**Figure 21**). Les vaisseaux tumoraux sont dilatés, tortueux, désorganisés et hautement perméables. La tumeur est également hétérogène avec des zones hautement vascularisées et d'autres avec une densité de vaisseaux très faible (Baish et al., 2011).

Dans une vascularisation normale, les cellules endothéliales (CE) qui composent la paroi des vaisseaux, sont connectées entre elles par le biais de VE-cadhérines (Vascular Endothelial cadhérine). Les VE-cadhérines sont des récepteurs transmembranaires des CE dont le domaine extracellulaire se lie à la VE-cadhérine voisine et le domaine intracellulaire est attaché au cytosquelette des CE. L'interaction du VEGF avec son récepteur le VEGFR2 (VEGF récepteur 2) entraînent une contraction du cytosquelette des CE, fragilisent les jonctions VE-cadhérine et par conséquent diminuent l'association des CE entre elles (**Figure 21**)(Lampugnani, 2012). Les CE tumorales sont faiblement connectées, par conséquence les vaisseaux sont très perméables. En outre, les cellules périvasculaires, composées des péricytes et des cellules musculaires vasculaires lisses, montrent une structure anormale. Elles se situent normalement dans la membrane des vaisseaux et enveloppent normalement les CE pour prévenir leur dissociation. Elles sont recrutées en réponse à différentes voies de signalisation. Le PDGF-B (Platelet-Derived Growth Factor B), secrété par les CE, facilite le recrutement des péricytes par sa liaison avec son récepteur PDGFR-B (Platelet-Derived Growth Factor Recepteur B). L'angiopoïétine-1 (Ang-1) est un facteur de stabilisation vasculaire et facilite les connections péricyte-CE (**Figure 21**) (Carmeliet and Jain, 2011a). Les mécanismes de détachement des péricytes dans les tumeurs sont multiples : le VEGF inhibe l'activité de PDGFR-B, et la surexpression d'Ang-2, un antagoniste de Ang-1, se lie au récepteur Tie-2 (**Figure 21**)(Carmeliet and Jain, 2011b; Potente et al., 2011).

En conclusion, la vascularisation anormale des tumeurs favorise leur progression, la dissémination des cellules tumorales ainsi qu'une réduction de la diffusion et de l'efficacité des traitements anticancéreux.

Le premier traitement anti-angiogénique approuvé par la FDA est le bevacizumab, un anticorps dirigé contre le VEGF. L'idée initiale était d'affamer les tumeurs en éliminant les vaisseaux qui approvisionnent les cellules en nutriment et oxygène. Mais l'effet de la monothérapie avec des anti-VEGF n'a eu que peu ou pas d'effet sur les tumeurs. De plus, la privation du réseau vasculaire entraînait des tumeurs plus agressives avec la sélection de clones résistants à l'hypoxie (Potente et al., 2011). En revanche, lorsque les anti-VEGF était couplés à une chimiothérapie, une diminution significative de la tumeur était observée par rapport aux tumeurs traitées uniquement avec la chimiothérapie. L'hypothèse de la « normalisation vasculaire » a permis d'expliquer ces résultats paradoxaux. Dans une angiogenèse anormale, il y a un déséquilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques, menant à une création aberrante et incessante des vaisseaux. En inhibant le VEGF, la restauration de l'équilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques permet de retrouver une vascularisation uniforme de la tumeur permettant l'adressage d'agents thérapeutiques ainsi que la diminution de la perméabilité des vaisseaux (Jain, 2005). Des études précliniques et cliniques suggèrent la présence d'une « fenêtre » de normalisation vasculaire. En effet, il est nécessaire d'avoir une dose d'anti-angiogénique suffisant pour obtenir un effet sur la vascularisation mais un dosage excessif ou prolongé de la thérapie peut conduire à une absence de vascularisation dans la tumeur et donc une absence d'efficacité des traitements anti-cancéreux et une agressivité augmentée des tumeurs (Goel et al., 2011). Les traitements anti-angiogéniques peuvent cibler différents acteurs de l'angiogenèse. Les plus employés sont les anti-VEGF, mais on retrouve également des stratégies ciblant : le récepteur VEGFR2, PlGF qui est un membre de la famille de VEGF ou encore la voie de l'angiopoïétine 2 (Goel et al., 2011). Une étude récente (Agrawal et al., 2014) a montré que la restauration de la jonction des CE par la régulation des VE-cadhérines permettait d'améliorer l'intégrité vasculaire et d'inhiber la perfusion vasculaire. L'effet anti-tumoral de la cisplatine sur un modèle de mélanome B16Bl6 a été amélioré avec la restauration des VE-cadhérines. Les tumeurs normalisées sont moins hypoxiques, il y a une réduction du nombre de métastases et des facteurs de transcription de la transition épithélio-mésenchymateuse ainsi qu'une diminution des cellules souches cancéreuses. Ces

résultats montrent l'importance de la normalisation vasculaire dans les traitements anticancéreux.

8. Invasion des tissus et métastases : molécules d'adhésion et protéases

En plus de leur capacité à former des tumeurs primaires, les cellules malignes acquièrent aussi la propriété de pénétrer dans la circulation lymphatique et sanguine, d'infiltrer les tissus voisins et de former des métastases. Ce processus, appelé transition pseudo épithélio-mésenchymateuse (TEM) fait intervenir plusieurs mécanismes. Habituellement, la formation de métastases commence par le détachement des cellules tumorales à partir du site de la tumeur primaire, facilitée par la répression de facteurs qui interviennent dans l'adhésion cellulaire et par la sécrétion d'enzymes qui réorganisent la matrice extracellulaire des cellules tumorales. Il existe différentes molécules d'adhésion qui sont classées en trois grandes catégories : les cadhérines, les intégrines et les immunoglobulines. Nous focaliserons notre attention sur les cadhérines.

a. De l'E-cadhérine à l'N-cadhérine

Les cadhérines sont des molécules d'adhésion cellulaire calcium dépendantes. Elles établissent préférentiellement des interactions homophiles (entre deux molécules d'adhésion identiques). Dans la peau saine, les interactions entre les mélanocytes et les kératinocytes sont importantes dans l'épiderme. La prolifération des mélanocytes est contrôlée par les kératinocytes *via* les E-cadhérines. Les domaines extracellulaires de deux molécules d'E-cadhérine sont liés ensemble, et les domaines intracellulaires interagissent avec les fibres d'actine du cytosquelette *via* un complexe de caténine. Ainsi, en reliant les cytosquelettes de deux cellules adjacentes, les E-cadhérines maintiennent l'intégrité du tissu en le protégeant des forces mécaniques qui pourraient autrement détacher les cellules du tissu (Harris and Tepass, 2010).

La transformation maligne des mélanocytes coïncide souvent avec la perte de l'expression des E-cadhérines, entraînant à son tour une perte de la régulation des kératinocytes sur les mélanocytes. La perte de l'expression des E-cadhérines est en générale

remplacée par l'expression des N-cadhérines, qui confèrent de nouvelles propriétés adhésives aux cellules. Les mélanocytes exprimant ainsi la N-cadhérine peuvent former des contacts avec les fibroblastes et les cellules endothéliales pendant la migration et l'invasion dans le stroma tumoral, le derme, les vaisseaux lymphatiques et sanguins. Les interactions entre les N-cadhérines sont plus faibles que les E-cadhérines, ce qui pourrait être à l'origine de la forte motilité des cellules tumorales par rapport aux mélanocytes sains (Kuphal and Bosserhoff, 2012).

Les E-cadhérines sont régulées négativement par le facteur de transcription SNAIL. Une surexpression de SNAIL, détectée dans de nombreuses lignées de mélanome, entraîne une diminution des E-cadhérines au profit des N-cadhérines. De plus, le répresseur transcriptionnel SNAIL réprime également l'expression de l'enzyme de CYLD. Cette perte va provoquer l'activation de l'oncogène BCL-3, qui une fois transloqué au niveau nucléaire va stimuler le promoteur des N-cadhérines (Massoumi et al., 2009). SLUG est également un facteur de transcription impliqué dans la formation de métastase. Il agit comme un activateur transcriptionnel direct du promoteur *ZEB1*. SLUG et *ZEB1* collaborent pour réprimer l'expression des E-cadhérines (Wels et al., 2011). Une autre étude a démontré que TWIST est également un régulateur impliqué dans le processus de l'EMT du mélanome (Hoek et al., 2004). Les trois facteurs de transcription SNAIL, SLUG et TWIST sont tous trois responsables de la répression de la transcription E-cadhérine dans le mélanome. Une corrélation a été établie entre ces molécules dont l'expression est élevée dans le mélanome (Koefinger et al., 2011).

b. Les métallo-protéases matricielles (MMPs)

Les MMPs sont des métallo-protéases qui dépendent du zinc pour leurs activités enzymatiques et qui sont capables de dégrader certains composants de la matrice extracellulaire (MEC). Elles sont classées dans plusieurs groupes, en fonction de leurs caractéristiques structurelles mais également selon le substrat qu'elles digèrent préférentiellement. Elles sont au nombre de 24 chez l'humain. Dans les tissus sains, l'activité des métalloprotéases est étroitement contrôlée, elles demeurent principalement inactives. Les enzymes sont maintenues en latence par l'inhibition de leur site actif par une

liaison avec un résidu de cystéine. Elles sont également régulées par des inhibiteurs endogènes : les TIMPs (inhibiteurs de métallo-protéases tissulaires) (Page-McCaw et al., 2007).

En raison de leur diversité structurale, les MMPs jouent de multiples fonctions dans tous les stades de développement tumoral. La plupart des étapes de dissémination du mélanome (transition de la croissance horizontale/verticale, invasion,...) requièrent la production de MMPs, aussi bien par les cellules tumorales que par les cellules stromales adjacentes (fibroblastes et cellules du système immunitaire). La plupart des MMPs jouent un rôle central dans l'invasion, mais certaines possèdent également des propriétés antitumorales (**Figure 22**) (Moro et al., 2014).

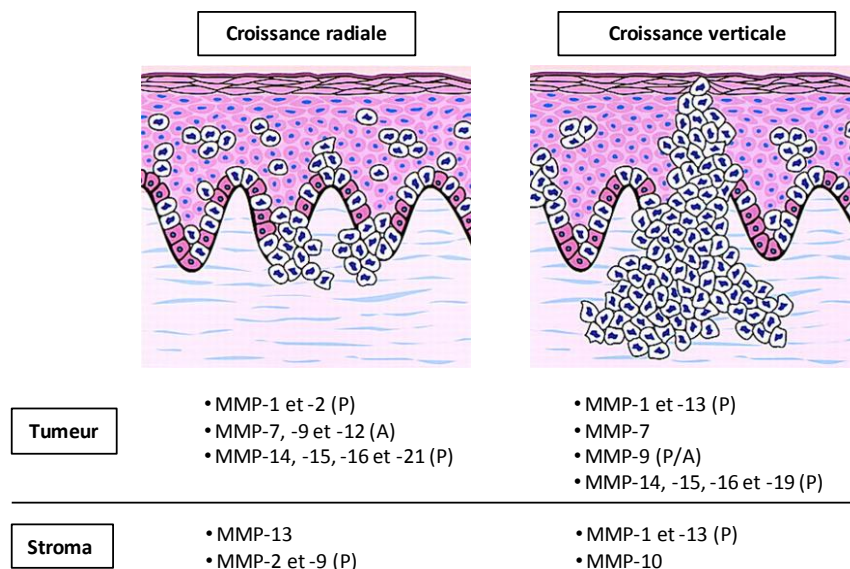


Figure 22 : Les différentes MMPs exprimées par les cellules tumorales ou stromales pendant la progression du mélanome. Certaines MMPs peuvent être pro-tumorales (P) ou anti-tumorales (A). D'après Moro et al., 2014

La MMP-1 est une collagénase interstitielle qui clive le collagène de type I, II, et III. Initialement, la MMP-1 a été détectée, associée avec la MMP-13, en phase de croissance verticale lors d'un mélanome particulièrement invasif. La MMP-1 et -13 sont principalement libérées par les fibroblastes péri-tumoraux, mais la MMP-1 a également été détectée dans les cellules de mélanome (Blackburn et al., 2007). L'activation de MMP-1 est

impliquée dans la transformation de PAR1 (Protease-Activated Receptor 1), un récepteur qui favorise le potentiel métastatique des cellules cancéreuses par sa liaison avec la thrombine, ainsi que la création d'un environnement pro-inflammatoire (Boire et al., 2005). L'expression de la MMP-13 est élevée lorsque la tumeur commence à envahir les tissus environnants. La MMP-13 a un rôle important dans la promotion de la vascularisation de la tumeur, avec la libération de VEGF (Lederle et al., 2010). Ainsi, chez des souris dépourvues de MMP-13, la croissance du mélanome est réduite à cause d'une vascularisation faible de la tumeur (Zigrino et al., 2009).

La MMP-2 et MMP-9 sont également connues sous le nom de : gélatinases A et B. L'activité de la MMP-2 est nécessaire pour dégrader le collagène de type I, cliver la fibronectine et favoriser la migration des cellules de mélanome (Jiao et al., 2012). L'expression de la MMP-2 caractérisée par IHC a été proposée comme marqueur pronostique pour les patients atteints de mélanome (Rotte et al., 2012). Une méta-analyse confirme la pertinence de l'augmentation de la MMP-2 (IHC) comme marqueur prédictif d'agressivité, ce qui n'est pas le cas de la MMP-9 (Gould-Rothberg et al., 2009). La MMP-9 est dirigée sur le collagène de type IV de la membrane basale. Cette dégradation de la matrice s'accompagne d'une sécrétion de facteur pro-angiogénique (VEGF, FGF) favorisant ainsi la vascularisation tumorale (Yabluchanskiy et al., 2013).

Traitements du mélanome

Il existe plusieurs traitements pour le mélanome. Ils dépendent de la taille de la tumeur, mais aussi de sa localisation, de son développement et de la présence ou non de métastases.

I. L'exérèse chirurgicale

La première étape du traitement du mélanome cutané consiste en l'exérèse chirurgicale de la tumeur primitive. Une marge d'excision variant de 0,5 à 2 cm est réalisée en fonction de l'étendue et de l'épaisseur du mélanome. Elle permet d'éviter les éventuelles récurrences locales. Dans la plupart des cas, cette intervention suffit pour éliminer et stopper le développement du mélanome (Testori et al., 2009; Thompson et al., 2005). Pour les tumeurs avec un indice de Breslow élevé, une exérèse du ganglion sentinelle est pratiquée afin de déterminer s'il y a eu une dissémination dans l'organisme. En cas d'évolution du mélanome vers un stade métastatique, la chirurgie est la première solution proposée. Dans le cas où les métastases sont trop nombreuses ou inaccessibles, des traitements complémentaires sont administrés au patient.

II. La chimiothérapie

1. La dacarbazine

La dacarbazine (5-(3,3-diméthyl-1-triazène-1-yl)-1H-imidazole-4-carboxamide) (**Figure 23**) a longtemps été la molécule de référence pour le traitement du mélanome métastatique. Il s'agit d'un agent alkylant de l'ADN, injecté par voie intraveineuse au patient sous forme de prodrogue, il est métabolisé au niveau du foie par le cytochrome p450 réductase en un composé actif (**Figure 23**) qui induit l'apoptose des cellules tumorales (Rooseboom et al., 2004).

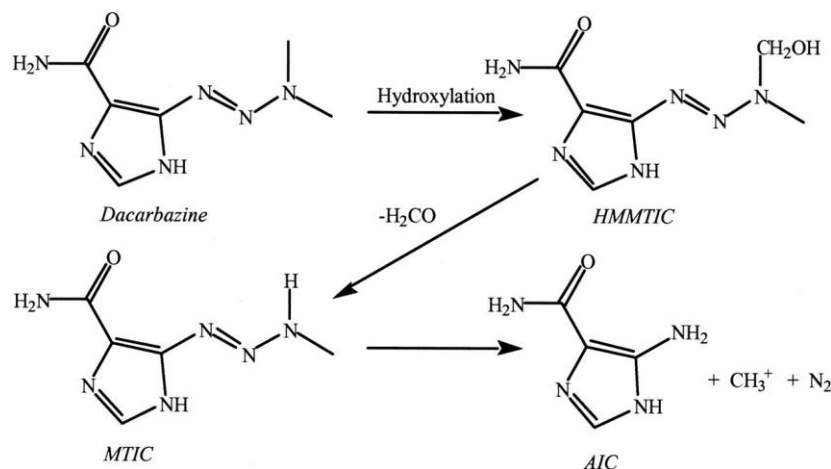


Figure 23 : Activation de la dacarbazine par le cytochrome p450. L'hydroxylation de la dacarbazine par le cytochrome P450 forme le HMMTIC. Le MTIC est ensuite généré par voie non-enzymatique par la perte du formaldéhyde. Le MTIC est rapidement décomposé en carboxamide aminoimidazole (AIC), CH₃⁺, et N₂. D'après Rooseboom et al. 2004

Le traitement à la dacarbazine conduit à des taux de réponses pour 15 à 25% des patients, parmi eux, seulement 5% de réponse complète et une survie moyenne de 4 à 6 mois. Une étude avec un recul de six ans après le traitement a montré que moins de 2% des patients étaient encore en vie (Tarhini and Agarwala, 2006). Les stratégies impliquant une association d'agents anti-tumoraux avec la dacarbazine obtiennent des taux de réponse plus élevés. Une étude couplant l'imexon, qui est un médicament sélectionné pour sa capacité à induire une accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), avec un traitement à la dacarbazine a montré un effet synergique inhibiteur sur la croissance des tumeurs mélaniques humaines A370 (Samulitis et al., 2011). Malgré sa faible efficacité, elle reste une molécule de référence.

2. Le temozolomide

Le temozolomide (**Figure 24**) est un agent alkylant semblable à la dacarbazine administré par voie orale. Cette molécule a pour avantages qu'elle ne requiert pas de clivage au niveau hépatique et qu'elle a la capacité de traverser la barrière hémato encéphalique. Les lésions cytotoxiques développées sont supposées entraîner une réparation aberrante de l'ADN. Une étude

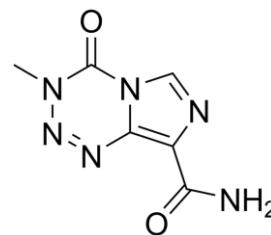


Figure 24 : Structure du temozolomide

comparant le temozolomide par rapport à la dacarbazine sur des mélanomes de stade IV a montré une efficacité égale entre les deux produits avec une bonne tolérance au traitement dans le groupe temozolomide (Middleton et al., 2000). Une équipe a montré un effet additif sur la mort cellulaire lorsqu'il était associé avec le Vemurafenib, inhibiteur de l'activité BRAF (voir paragraphe suivant) (Roos et al., 2014).

3. Inhibiteurs de la voie MAPK

Comme vu précédemment, la mutation V600E est présente dans environ 50% des cas de mélanome (Cheng et al., 2013). Cette mutation active la voie des MAPK, entraînant entre autre une augmentation de la prolifération, la survie ou encore la migration. Ainsi, des stratégies ciblant spécifiquement cette voie sont développées. Des composants commercialisés sous le nom de Vemurafenib ou de Dabrafenib sont des puissants inhibiteurs de BRAF possédant la mutation V600E. Dans une étude clinique, le Dabrafenib montre des résultats de réponse (53 vs 19%) et une survie (5,3 vs 2,7 mois) augmenté par rapport à la dacarbazine. Le Vemurafenib, quant à lui, est le premier traitement approuvé par FDA (Food Drug Administration) pour traiter les patients porteurs de mélanome métastatique BRAF-muté. Les études cliniques de phase III montrent des taux de réponses et de survie supérieurs pour le Vemurafenib comparé à la Dacarbazine (Cheng et al., 2013). Cependant, des effets indésirables non négligeables peuvent apparaître. En effet, le Vemurafenib ou le Dabrafenib sont à l'origine d'hyperkératoses, de carcinomes à cellules squameuses, ou encore d'arthralgie. Il a même été observé dans une minorité de patients, le développement de nouveaux mélanomes primitifs (Zimmer et al., 2012). Le problème majeur de cette molécule reste l'apparition de mécanismes de résistance (**Figure 25**) (Wellbrock, 2014) avec notamment l'activation de la voie PI3K qui suppléente la voie MAPK dans la prolifération des cellules cancéreuses. Des travaux démontrent également que le Vemurafenib active ERK et ainsi augmente la prolifération et la migration des cellules de mélanome BRAF V600E (Halaban et al., 2010). Par ailleurs, ces traitements ont l'inconvénient de se restreindre uniquement aux porteurs de la mutation V600E (Flaherty et al., 2010).

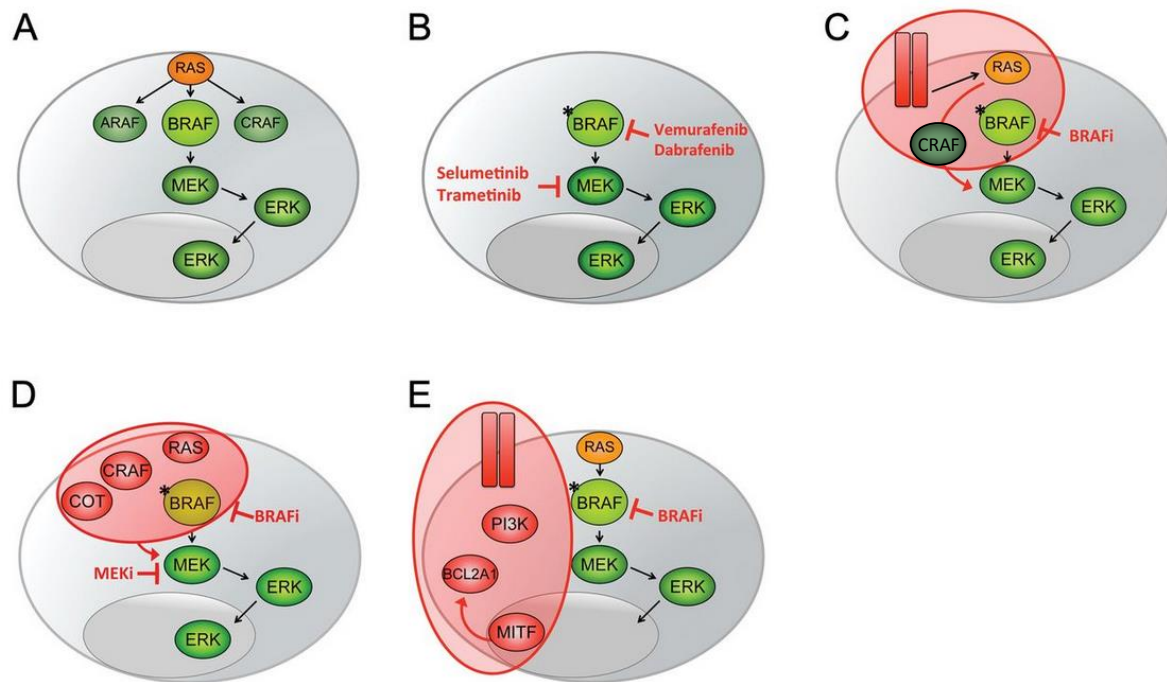


Figure 25 : Mécanismes de résistance de la voie MAPK suite à l'inhibition de BRAF. A) La voie de signalisation MAPK est activé en aval par RAS. **B)** BRAF mutée (*) conduit à l'activation constitutive de MEK et ERK, elle peut être ciblée par les inhibiteurs indiqués. **C)** La voie est réactivée malgré la présence d'inhibiteur. La fixation de différents facteurs de croissance au récepteur active RAS. RAS phosphoryle MEK en passant par CRAF, qui est des protéines kinases de la famille RAF. Elle contourne ainsi l'inhibition de BRAF. **D)** Les voies de réactivation reposent sur des changements en amont de MEK, tel que la surexpression de COT ou l'activation par CRAF. Ainsi, un traitement combiné avec des inhibiteurs de BRAF et MEK pourrait permettre de contrecarrer les résistances. **E)** Dans certaines cellules, l'activité d'AKT est régulée à la hausse en réponse directe à l'inhibition de MEK. La voie PI3K relaie donc la voie MAPK dans la prolifération des cellules. Une autre raison de la résistance est la surexpression des protéines de survie telle que MITF. En effet, MITF peut surmonter les effets cytotoxiques des inhibiteurs de BRAF car elle régule de nombreux gènes, notamment des anti-apoptotiques. *D'après Wellbrock, 2014.*

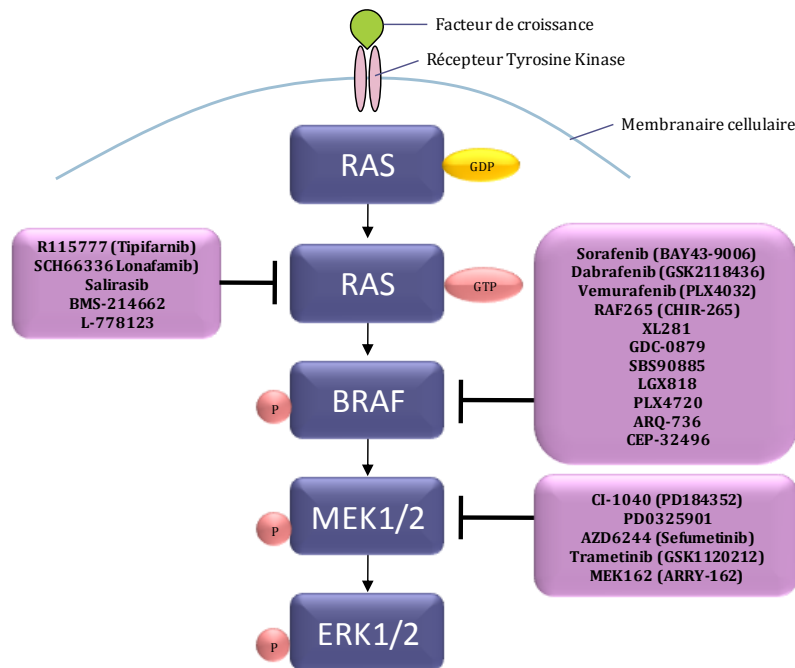


Figure 26 : Liste des inhibiteurs de la voie des MAPK. D'après Cheng et al., 2013

Des inhibiteurs de RAS et de MEK1/2 existent également. On citera ainsi le R115777, le SCH66336 et le Salirasib qui agissent sur RAS, tandis que le Trametinib, MEK162 ou encore le PD98059 ont une action sur MEK1/2 (Figure 26).

III. L'immunothérapie

Le système immunitaire joue un rôle important dans le contrôle de nombreux cancers. Depuis longtemps, il a été mis en évidence qu'une réponse spécifique ciblant un antigène tumorale pouvait se mettre en place. L'immunité anti tumorale implique les lymphocytes T cytotoxiques, mais également les cellules présentatrices de l'antigène ainsi que les lymphocytes de Helper.

1. Interleukine-2

L'interleukine-2 (IL-2) est principalement produite par les lymphocytes CD4 activés. Elle agit sur leur prolifération et les incite à synthétiser d'autres cytokines. L'IL-2 active également les lymphocytes Natural Killer (NK), augmente leur potentiel de destruction et stimule les lymphocytes B à produire des anticorps.

L'analyse de huit études cliniques, conduites entre 1985 et 1993, sur des doses importantes d'IL-2 a montré un taux de réponse de 16%. Un petit pourcentage de patients, environ 6%, a une réponse durable et complète au traitement. Mais ces résultats encourageants n'ont pas été approuvés par l'EMA (European Medicine Agency) face à la toxicité importante de ce traitement. Les nombreux effets secondaires incluent notamment de l'hypotension sévère, des oedèmes pulmonaires, des insuffisances rénales et hépatiques ou encore des troubles neurologiques. Des études plus récentes ont essayé de coupler l'IL-2 avec des agents chimiothérapeutiques tels que la dacarbazine ou le temozolomide, mais elles n'ont pas montré un meilleur taux de survie. En résumé, l'IL-2 n'est plus utilisée pour le traitement du mélanome métastatique (Garbe et al., 2011; Schadendorf et al., 2009).

2. L'interféron- α

L'interféron- α (IFN- α) est une glycoprotéine produite par les leucocytes en réponse à une infection virale. En se liant avec son récepteur cellulaire, IFN- α active la transcription du facteur ISGF3, qui initie une stimulation dans la séquence promotrice du gène p53. Cette activation permet la production de p53, augmentant alors l'apoptose des cellules tumorales (Takaoka et al., 2003). Un grand nombre d'études cliniques a testé différentes administrations d'IFN- α pour le traitement du mélanome, en faisant varier la dose, le nombre de prises et la durée du traitement. Les performances du traitement à l'IFN- α sont passables par rapport à sa toxicité et à son coût très élevé. Beaucoup de pays n'ont pas le support financier nécessaire pour proposer un traitement à haute dose d'IFN- α à ses patients (Garbe et al., 2011).

3. Anti-cytotoxique T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4)

L'activation des lymphocytes T nécessite deux signaux, la reconnaissance de l'antigène et également un signal provenant de la liaison de CD28 à B7 (molécule exprimée par les cellules dendritiques). CTLA-4 est une glycoprotéine transmembranaire de type 1, présente à la surface des lymphocytes T et agit comme répresseur de l'activation de ces derniers. CTLA-4 entre en compétition avec les récepteurs CD28 pour la liaison B7. L'interaction entre CTLA-4 et les lymphocytes T peut être bloquée à l'aide d'anticorps

monoclonaux dirigés contre CTLA-4. Ainsi, le signal d'inhibition est levé et l'activité des cellules cytotoxiques augmente (Garbe et al., 2011).

Deux anticorps anti-CTLA-4 sont actuellement disponibles en clinique : l'ipilimumab et le tremelimumab. Les premiers résultats sont prometteurs dans le traitement du mélanome de stade IV, même si le manque d'efficacité récemment rapporté du tremelimumab en tant qu'agent unique tend à l'amener vers une utilisation combinée avec un autre agent (Schadendorf et al., 2009). Du fait du mécanisme d'action des anti-CTLA-4, des effets secondaires avec des cas sévères d'auto-immunité ont été rencontrés. Il faut noter que lors des essais cliniques, 60% des patients ont développé ce type d'effets secondaires.

4. Anti PD1 et PD-L1

La liaison des récepteurs PD-1 des lymphocytes T aux récepteurs PD-L1 des cellules cancéreuses inactive la réponse immunitaire. PD-1 empêche ainsi des réactions d'auto-immunité. L'expression de PD-L1 à la surface des cellules de mélanome inhibe la destruction de ces dernières par les cellules de l'immunité. En bloquant les récepteurs de PD-1 avec des anticorps anti-PD-1 (Nivolumab ou MK-3475) ou en agissant sur le récepteur PD-L1 (BMS-93655), les traitements inhibent la liaison PD-1/PD-L1. Les lymphocytes T reconnaissent alors la cellule tumorale comme étant « anormale » et la détruisent (**Figure 27**). Le nivolumab seul ou en combinaison avec l'ipilimumab a démontré une réelle efficacité contre le mélanome disséminé dans de nombreuses études (Mamalis et al., 2014).

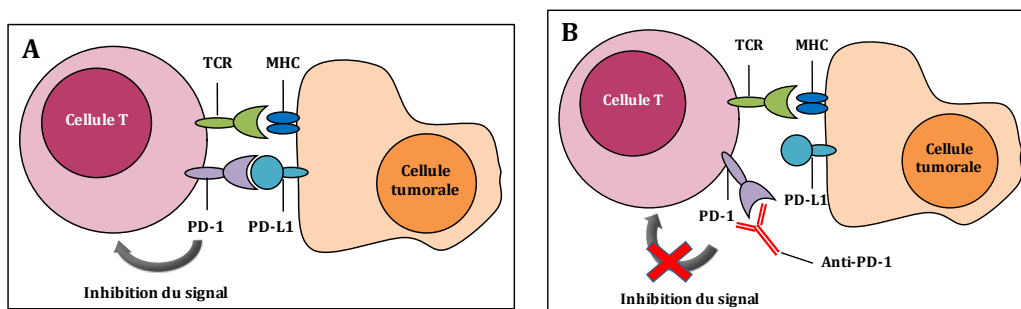


Figure 27 : Rôle de PD1 dans l'inhibition de la réponse immunitaire. A. Les cellules tumorales qui expriment PD-L1 peuvent échapper à la réponse immunitaire en régulant l'activité des lymphocytes T par le biais de PD-1. B. En bloquant le récepteur PD-1 avec un anticorps anti-PD-1, les lymphocytes T peuvent détruire les cellules de mélanome. D'après Mamalis and Garcha, 2014

IV. La radiothérapie

1. La radiothérapie externe

Cette voie thérapeutique consiste à exposer des lésions internes à des rayonnements ionisants de forte énergie produits par un faisceau externe à l'organisme. Les radiations ionisantes ont la propriété d'interagir avec la matière en transférant toute ou une partie de leur énergie. Les radiations ionisantes ont un effet sur l'ensemble des macromolécules biologiques (protéines, lipides, acides nucléiques...)(Pouget et al., 2015). L'ionisation directe de l'ADN et/ou l'interaction avec l'H₂O génère des radicaux libres qui vont induire différents types de dommages du génome entraînant alors une mort cellulaire (mécanismes résumés dans Orth et al., 2014).

Depuis longtemps, le mélanome est considéré comme une tumeur radiorésistante. Cependant ce traitement intervient souvent en complément d'une chirurgie curative quand les marges d'exérèses chirurgicales suffisantes n'ont pas pu être réalisées. La radiothérapie externe est également utilisée pour traiter les zones délicates telles que les métastases cérébrales ou lors de mélanome uvéal. Un curage ganglionnaire peut aussi être associé à de la radiothérapie afin de limiter la récurrence (Khan et al., 2011).

2. La radiothérapie interne vectorisée

La radiothérapie interne vectorisée est l'administration d'un isotope radioactif par voie intraveineuse ou orale. Le radioélément est combiné à un vecteur qui cible une caractéristique des cellules tumorales. Il existe différents vecteurs : les anticorps, les peptides ou encore les molécules de synthèse. Le vecteur idéal doit posséder une affinité la plus spécifique possible pour les cellules cancéreuses, une rétention importante et durable mais également une clairance rapide des cellules non-cibles pour limiter les effets secondaires. Ainsi, dans le cas du mélanome, la cible peut être la mélanine, pigment produit en grande quantité dans les tumeurs mélaniques, ou encore des récepteurs membranaires (MCR-1, MCSP). Les différentes radiothérapies internes vectorisées du mélanome existantes seront décrites plus en détail ultérieurement.

3. Emissions radioactives utilisés en radiothérapie interne

La radioactivité est la propriété qu'ont certains noyaux d'atomes à se désintégrer de manière naturelle et spontanée, pour donner un autre élément, en émettant des particules ou des rayonnements électromagnétiques. Trois types de rayonnements peuvent être utilisés en radiothérapie interne, ils diffèrent par leur parcours et leurs énergies. Ces deux données permettent de définir l'énergie de transfert linéique (TEL), c'est-à-dire l'énergie moyenne délivrée au milieu par unité de longueur de la trajectoire parcourue. Pour pouvoir induire des dommages importants au niveau tissulaire et cellulaire, il faut que l'énergie cédée localement par l'isotope soit élevée, lors du parcours des particules émises (**Tableau 2**) (Kassis, 2008).

Rayonnements	E_{\min} - E_{\max}	Range	TEL
Particules α	5-9 MeV	40-100 μm	80 keV/ μm
Rayonnements β^-	50-2 300 keV	0,05-12 mm	0,2 keV/ μm
Electrons Auger	eV-keV	2-500 nm	4-26 keV/ μm

Tableau 2 : Caractéristiques générales des différents rayonnements étudiés en radiothérapie.
D'après Kassis, 2008

Les particules α produisent de fortes ionisations sur un petit parcours linéaire. Les particules β^- produisent des ionisations sur un grand parcours linéaire. Les électrons Auger induisent des clusters de forte ionisation (**Figure 28**) (Kassis, 2011).

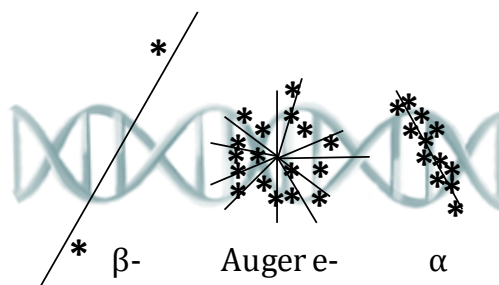


Figure 28 : Représentation schématique des densités d'ionisation produites par les différents rayonnements. D'après Kassis, 2008.

a. Les particules α

Ce sont des particules chargées positivement, qui sont assez facilement stoppées et ne parcourent que quelques centimètres dans l'air. Au niveau des tissus organiques, leur parcours est de l'ordre de la dizaine de micromètre. Le LET des particules α est très intéressant de part son importance : entre 80 et 100 keV/ μm . En raison de son trajet court mais avec un LET élevé, ce rayonnement est utilisé pour le traitement de micrométastases (**Tableau 3**) (Kassis and Adelstein, 2005).

Isotope	Demie-vie	Energie (Mev)
^{211}At	7,2 heures	6,79
^{212}Bi	60,6 minutes	7,80
^{225}Ac	10 jours	6,83

Tableau 3 : Principaux émetteurs de particules α utilisés en radiothérapie interne. D'après Kassis and Adelstein, 2005

b. Les rayonnements β -

Ils sont constitués d'un électron de vitesse élevée. Ce type de rayonnement peut parcourir quelques mètres dans l'air et est arrêté par du plexiglas. Dans les tissus organiques, son parcours est plus long que celui des particules α , et présente un TEL faible d'environ 0,2 keV/ μm (Kassis and Adelstein, 2005). Les émetteurs β - de haute énergie, tels que ^{188}Re et ^{90}Y sont appropriés pour le traitement de larges tumeurs. Les émetteurs β - de moyenne ou faible énergie, comme ^{177}Lu , peuvent être utilisés pour les petites tumeurs ou les métastases (**Tableau 4**) (Miao and Quinn, 2008).

Isotope	Demi-vie	Energie (MeV)
^{67}Cu	61,9 heures	0,57
^{90}Y	2,67 jours	2,28
^{131}I	8,02 jours	0,61
^{177}Lu	6,7 jours	0,50
^{188}Re	17 heures	2,13

Tableau 4 : Principaux radioéléments émetteurs β - utilisés en radiothérapie interne. D'après Kassis and Adelstein, 2005

c. Les émetteurs d'électrons Auger

Ce type d'émission résulte du phénomène de capture électronique. En effet, lorsqu'un noyau instable possède un proton surnuméraire et n'a pas l'énergie suffisante pour émettre un positon, il peut capturer un électron gravitant autour de lui sur une orbitale électronique proche. Ceci va créer une lacune électronique sur l'orbitale concernée. Cette lacune va se combler en prélevant un électron sur l'orbitale supérieure, créant ainsi une nouvelle lacune. Le phénomène se répète ainsi jusqu'aux couches électroniques les plus externes de l'atome. Chaque transition électronique s'accompagne de l'émission d'un rayon X qui va pouvoir arracher un électron des couches électroniques externes de l'atome, c'est l'émission d'électron Auger. Ce type d'isotope émet par désintégration entre 5 et 30 électrons Auger de faible énergie (de quelques eV à 1 keV). Leur parcours dans la matière est par contre très faible, de l'ordre du nm, ce qui leur procure un TEL intéressant (de 4 à 26 keV/ μm)(**Tableau 5**)(Kassis, 2008). Ce type de rayonnement permet une ionisation importante et très localisée, on parle de cluster d'ionisation. Il nécessite une proximité de l'ADN pour produire une efficacité radiothérapeutique (Kassis, 2011).

Isotope	Demi-vie	Energie (keV)	Nombre d'électrons Auger/désintégration
67Ga	3,3 jours	8,4	4,7
111In	67,3 heures	19	14,7
125I	59,9 jours	3,7	24,9

Tableau 5 : Principaux émetteurs d'électrons Auger étudiés en radiothérapie. D'après Kassis, 2008

d. Etude de la dosimétrie

L'étude de la dosimétrie dans les traitements de radiothérapie interne est d'une importance capitale. Cependant, du fait de la complexité de sa mise en œuvre, l'établissement d'un traitement basé sur la dosimétrie n'est que rarement pratiqué. Le comité MIRD (Medical Internal Radiation Dose) a pour objectif de définir les méthodes et modèles mathématiques pour déterminer la dose absorbée par organe suite à l'administration d'un radiopharmaceutique (Bolch et al., 2009). Ils s'intéressent également

à d'autres thématiques telles que : l'évaluation du rôle de la dosimétrie personnalisée pour la radiothérapie interne, la mise à jour des modèles géométriques (fantômes) utilisés en médecine nucléaire et la compréhension de la corrélation entre la dose absorbée et les réponses biologiques à l'échelle tissulaire et cellulaire.

L'unité de mesure de la dose absorbée est le Gray (Gy). Il correspond à la quantité d'énergie cédée à la matière par unité de masse. Cette unité permet de mesurer la quantité de rayonnements absorbés par un organisme exposé aux rayonnements. Un rayonnement ionisant qui cède 1 joule à 1 kilo de matière délivre 1 dose de Gray.

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg de matière irradiée.}$$

Au niveau tumoral, la quantité d'énergie délivrée doit être assez importante pour obtenir un effet anti-tumoral. En revanche, pour les organes non-cibles, la dose doit être la plus faible possible pour éviter les effets secondaires. Des tables d'irradiation sont disponibles pour les irradiations externes. En revanche, pour la dosimétrie de la radiothérapie interne, il n'existe pas de données générales, chaque modèle doit intégrer la biodistribution du radioélément, la nature des rayonnements, l'élimination biologique et le volume des organes. La dosimétrie est ainsi calculée, à partir des données expérimentales de biodistribution par prélèvement et d'imagerie à différents temps, en utilisant le formalisme du MIRD par simulations Mont-Carlo GATE pour la tumeur et les organes à risques (Perrot et al., 2014)

Réponses cellulaires après une radiothérapie

Les radiations ionisantes peuvent générer des mutations, des dégradations de base, des pontages de l'ADN, des cassures simple- ou double-brin de l'ADN. Lors d'une radiothérapie, les principaux dégâts souhaités sont les cassures double-brin (DSB : Double-Strand Breaks) de l'ADN car ce sont les plus létales pour la cellule. Seule la réponse cellulaire face aux DSB sera détaillée. La signalisation des DSB aboutit à l'arrêt transitoire du cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN avant les phases critiques du cycle (la réplication et la mitose). Si la cellule est débordée par le nombre de dommages, elle sera éliminée par mort cellulaire programmée (**Figure 29**) (Houtgraaf et al., 2006). Ce processus permet de limiter la propagation de cellules porteuses de dommages. En effet, des défauts dans la signalisation et la réparation sont associés au développement cancéreux. En revanche, ces mécanismes de réparation entraînent une radiorésistance en limitant l'effet mortel de la radiothérapie.

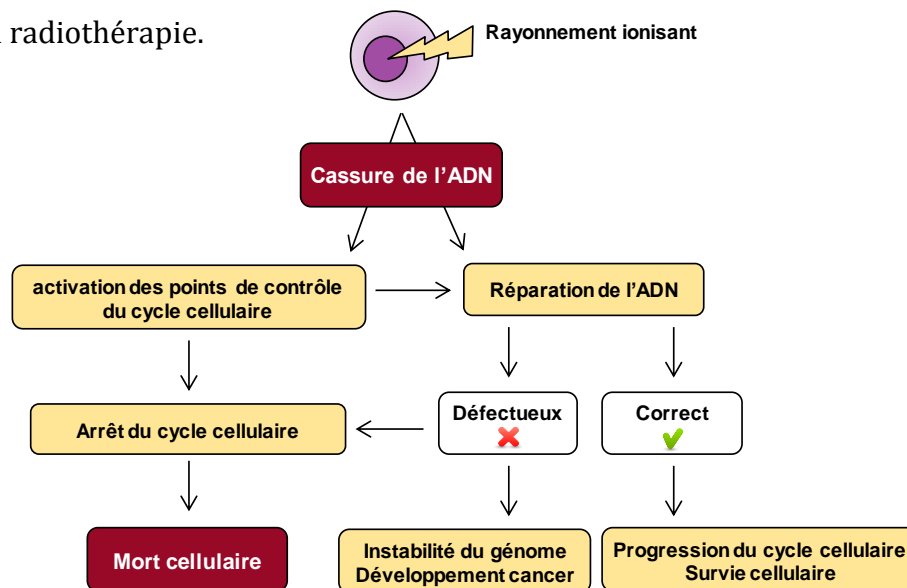


Figure 29 : Réponses cellulaires à un dommage à l'ADN. La signalisation des cassures conduit à un arrêt du cycle cellulaire et l'activation des voies de réparation. Lorsque la réparation est terminée, la cellule peut continuer son cycle et proliférer. Si les cassures ne peuvent pas être réparées ou si il y a trop de dégâts, le cycle cellulaire peut être bloqué de façon permanente, conduisant à un état de sénescence ou d'apoptose. Si les dommages restent inaperçus ou si la réparation est déficiente, cela peut conduire à des mutations et à une instabilité génomique qui peut conduire à l'oncogenèse. *D'après Houtgraaf et al., 2006*

I. Signalisation des cassures doubles-brins

Les cellules eucaryotes répondent aux lésions de l'ADN par un système sophistiqué impliquant de très nombreux acteurs et développé pour détecter, signaler et réparer ces lésions.

Dans le processus de signalisation des DSB, PARP 1/2 détecte les cassures de l'ADN, facilite l'ouverture de la structure de la chromatine par poly(ADP-ribosyl)ation des histones et assure le recrutement des protéines clés telles que ATM (**Figure 30B**) ou l'hétérodimère Ku70/80 (**Figure 30C**) (Dantzer et al., 2011). ATM (ataxia telangiectasia mutated) est une sérine/thréonine protéine kinase essentielle dans la réponse aux dommages cellulaires. L'activation d'ATM est effectuée par une réaction d'autophosphorylation sur le résidu Ser-1981 (**Figure 30C**). Il semble qu'une seule DSB soit insuffisante pour déclencher la réaction d'autophosphorylation, expliquant l'absence d'activation d'ATM aux faibles doses de rayonnement (<100 mGy) (Hennequin et al., 2011). Sinon, l'activation initiale d'ATM se produit dans les minutes qui suivent l'irradiation. ATM contrôle la phosphorylation d'autres acteurs, initiant ainsi l'amplification du signal (γ H2AX), l'arrêt de cycle (Chk1/2), la réparation des lésions (DNA-PKcs, BRCA1) ou encore l'apoptose (p53) (**Figure 30D**).

La phosphorylation de l'histone H2AX sur la Ser 139 (γ H2AX) est indispensable à la réparation des DSB. Survenant quelques minutes après l'irradiation, cette réaction s'étend autour de la DSB. L'agrégation de γ H2AX induit la formation de « foci », favorise l'accumulation de protéine et amplifie le signal de la réponse aux dommages cellulaires (Firsanov et al., 2011). Un autre objectif majeur de la cascade ATM est la protéine p53. Dans un contexte de DSB, p53 est phosphorylée conduisant à sa dissociation avec MDM2 et sa stabilisation. Il régule ainsi l'arrêt de cycle, la réparation, la sénescence ou la mort cellulaire en activant ou réprimant l'expression des gènes cibles qui codent dans ces différents processus.

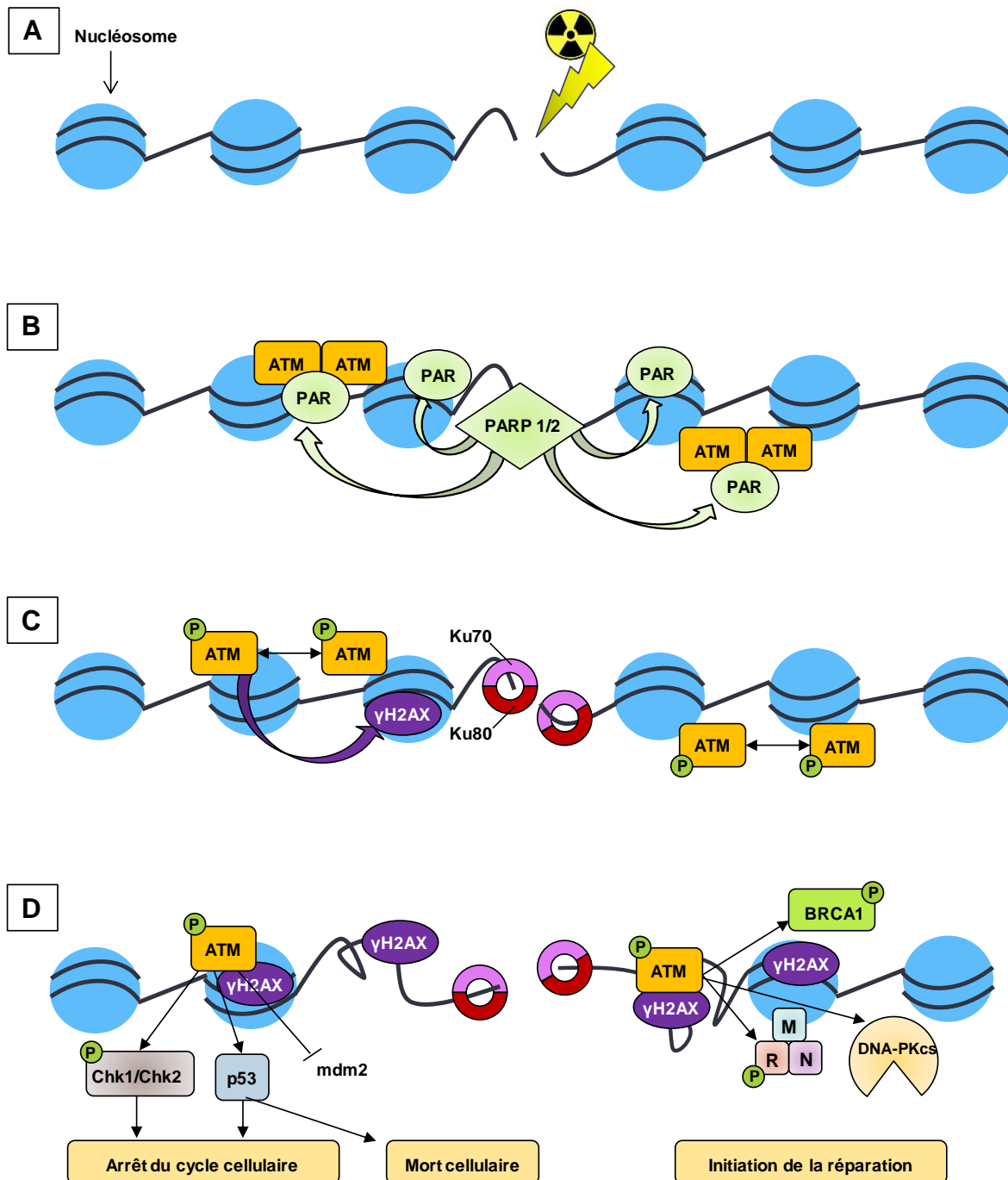


Figure 30 : Signalisation des cassures double-brin. Les rayonnements ionisants induisent des cassures double-brin de l'ADN (A). PARP 1/2 est activée par liaison avec les DSB et attache des poly(ADP-ribose)(PAR) à différents substrats. La ribolysation d'ATM permet son activation (B). PARP 1/2 est également impliquée dans l'accroche de l'hétérodimère KU70/80 (C). L'activation d'ATM entraîne son autophosphorylation. Elle phosphoryle à son tour des acteurs qui participent à la cascade de signalisation, notamment H2AX en γ H2AX (C). La rétention d'ATM-P dans la chromatine permet l'amplification de γ H2AX et la phosphorylation de BRCA1 et du complexe MRN (recombinaison homologue), de Chk1/Chk2 et p53 impliquées dans l'arrêt de cycle cellulaire, le recrutement de la DNA-PKcs (NHEJ) ou p53 pour l'apoptose (D). D'après Thompson, 2012

II. Arrêt du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases survenant selon un ordre établi, chaque phase ne pouvant débuter que si la précédente est totalement terminée. Le déroulement correct des phases successives du cycle cellulaire est assuré par une famille de kinases dépendantes des cyclines (CDK : cyclin dependent kinase) (Vermeulen et al., 2003). L'arrêt du cycle cellulaire après une DSB (**Figure 31**) va permettre d'éviter la prolifération de cellule avec des dommages à l'ADN et ensuite de donner du temps à la réparation de s'effectuer. La phosphorylation d'ATM déclenche la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 et son accumulation par l'inhibition de MDM2 ou MDM4 (voir chapitre précédent). P53S15 induit à son tour l'expression de p21. P21 est indispensable à l'arrêt du cycle cellulaire au point de contrôle G1. Elle inhibe la progression du cycle cellulaire en se liant, par son domaine aminoterminal, aux complexes cycline/CDK de la phase G1 et par son domaine carboxyterminal, à PCNA, bloquant ainsi l'activation de l'ADN polymérase (Viallard et al., 2001). ATM-P phosphoryle également Chk2 (human check-point kinase 2) qui a son tour phosphoryle Cdc25A/C. Cdc25A/C inactive CDK1 et provoque au final un arrêt de cycle en G2/M (Jeggo and Löbrich, 2006; Pawlik and Keyomarsi, 2004).

Une fois le cycle cellulaire en état de veille, la cellule va réparer ses dégâts, via différents systèmes de réparation. En cas de lésions trop nombreuses, elle peut initier sa mort cellulaire. Une vaste gamme d'inhibiteurs de cycle cellulaire ont été développés dans le but de sensibiliser les cellules aux traitements. Ils seront détaillés ultérieurement.

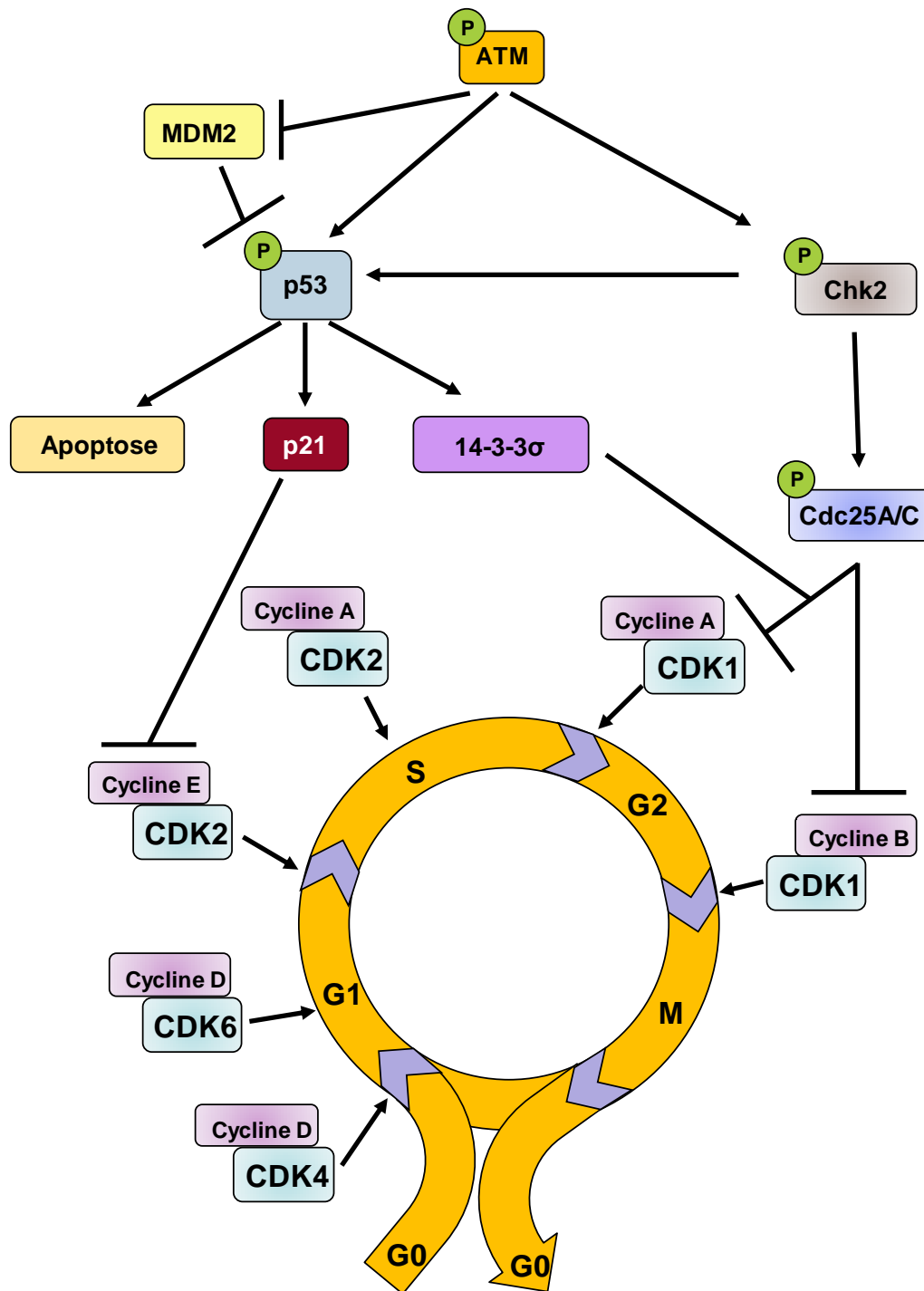


Figure 31 : Contrôle et arrêt du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est contrôlé par des CDK. Chaque CDK est activée par une cycline. Une même CDK s'associe à des cyclines différentes et inversement, une même cycline peut activer des CDK différentes. L'ordre d'intervention des CDK est déterminé par la transcription des cyclines. Lors d'une DSB, ATM-P active à la fois p53 et Chk2, entraînant un blocage du cycle cellulaire en phase G1/S ou G2/M. D'après Pawlik et al., 2004 et Vermeulen et al., 2003

III. Mécanismes de réparation des cassures doubles-brins

Deux mécanismes majeurs entrent en compétition pour la réparation des cassures double-brin de l'ADN : la jonction d'extrémité non-homologue et la recombinaison homologue. Les radiations ionisantes peuvent également créer des cassures simple-brin, réparées par les mécanismes de réparation par excision de base ou de nucléotides, qui ne seront pas détaillés.

1. La jonction d'extrémités non-homologues

La jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ : Non-Homologous End Joining) est la principale voie de réparation des DSB. Elle joue un rôle prédominant pendant la phase G1. Elle n'exige pas une homologie stricte et peut conduire à une perte d'information. La NHEJ peut être divisée en trois étapes: la détection de la DSB, le traitement, et la ligature (**Figure 32**). La première étape est la reconnaissance et la liaison de l'hétérodimère Ku à l'extrémité de la DSB (**Figure 32A**). L'hétérodimère Ku est composé de la sous-unité Ku70 et Ku80. Il agit pour le recrutement des acteurs de la NHEJ, en commençant par la DNA-PKcs (DNA-dependent Protein Kinase, catalytic subunit). Ensemble, la DNA-PKcs et Ku forme un complexe synaptique autour de la DSB (**Figure 32B**). La seconde étape consiste à un traitement enzymatique de la DSB. En effet, les irradiations produisent fréquemment des cassures d'ADN non ligables qui doivent être converties en groupes 3'-hydroxyle et 5'-phosphates avant ligature. Artémis, qui a une activité d'exonucléase 5'-3', permet de préparer les extrémités à la ligature (Lees-Miller and Meek, 2003) (**Figure 32C**). Dans la dernière étape, le complexe XRCC4-LIG 4 (DNA-ligase IV) réalisent la liaison des deux extrémités d'ADN (**Figure 32C**). La sous-unité Ku80 subit une ubiquitination qui entraîne sa dégradation et permet au complexe de réparation NHEJ de se dissocier du brin d'ADN (**Figure 32D**)(Davis and Chen, 2013; Lees-Miller and Meek, 2003; Rass et al., 2012; Thompson, 2012; Wang and Lees-Miller, 2013).

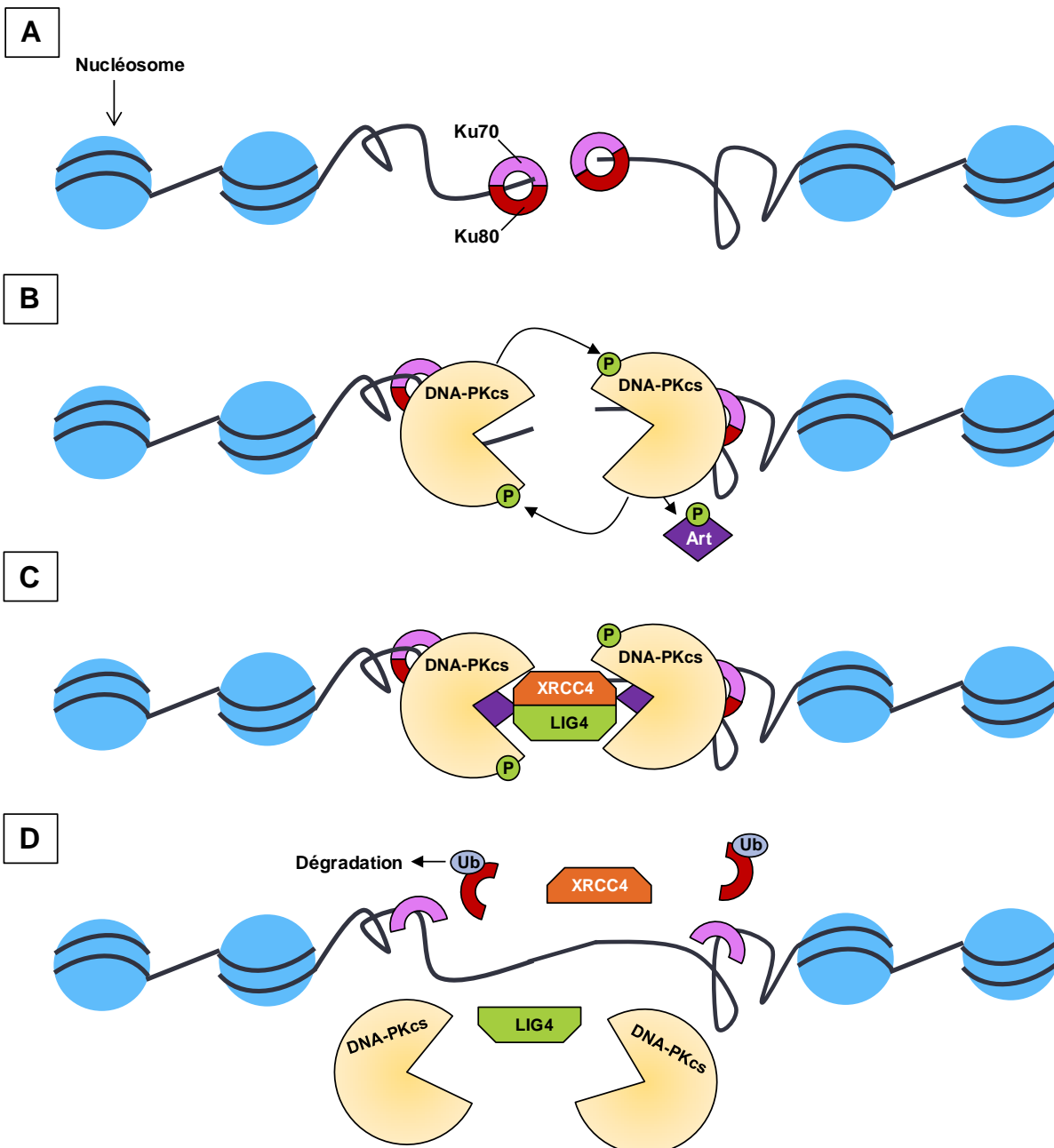


Figure 32 : La jonction d'extrémité non-homologue. **A)** L'hétérodimère Ku70/80 encercle les deux extrémités des DSB. Il protège l'ADN d'éventuelle dégradation et recrute la DNA-PKcs *Davis and Chen 2013*. **B)** La DNA-PKcs s'active en s'autophosphorylant. Elle phosphoryle également Artémis (Art). **C)** Une préparation des extrémités pour la ligation peut être nécessaire, elle est réalisée par Artémis. Ensuite, le complexe XRCC4-LIG4 est recruté par DNA-PKcs et réalise une ligation entre les deux extrémités d'ADN. **D)** L'ADN est réparé. L'ubiquitination de Ku80 entraîne sa dégradation et sa dissociation avec Ku70. Cette séparation permet de détacher le complexe de réparation de l'ADN. *D'après Thompson, 2012*

2. La recombinaison homologue

La recombinaison homologue (RH) utilise l'ADN du chromosome homologue comme matrice pour traiter la DSB et permet ainsi la réparation de la lésion sans générer d'erreurs génétiques. La RH commence par une étape de résection des extrémités 5' d'ADN. Elle est catalysée par le complexe protéique Mre11, Rad50 et Xrs2/NBS1 (MRN) ainsi que par la protéine Sae2. Ces protéines suppriment à l'extrémité de la DSB quelques dizaines de nucléotides. L'extrémité simple-brin formée est alors un substrat préférentiel pour l'exonucléase Exo1. Celle-ci réalise une résection plus importante permettant ainsi la production d'un ADN simple-brin 3' (**Figure 33B**). Les ADN simple -brin 3' sont liés une première fois avec la protéine RPA (**Figure 33C**). RPA est par la suite remplacée par Rad51, qui catalyse la recherche de l'ADN complémentaire (**Figure 33D**). La reconnaissance d'une région homologue permet la formation d'une « boucle-D » par l'appariement du complexe Rad51-ADN simple-brin 3' avec la région de la chromatine sœur (**Figure 33E**). L'ADN simple-brin 3' est allongé par synthèse d'ADN en utilisant le brin complémentaire comme matrice (**Figure 33F**). Une fois synthétisé, le nouveau brin peut être déplacé pour s'hybrider avec la seconde extrémité de la cassure (**Figure 33G**). A son tour, il est utilisé comme matrice pour allonger ce second brin jusqu'à reconstitution complète du génome (**Figure 33H**) (Cannan and Pederson, 2015; Mehta and Haber, 2014).

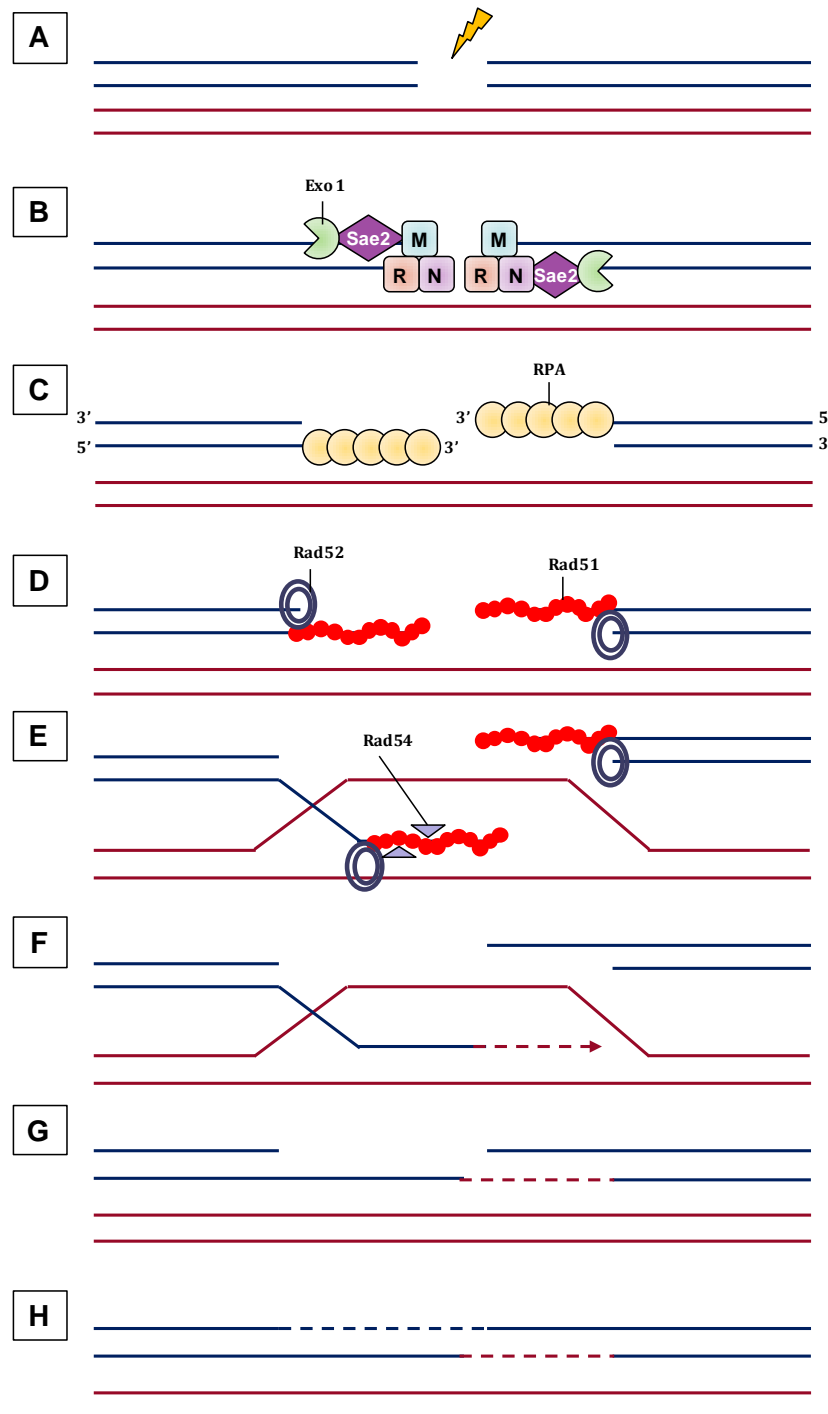


Figure 33 : La recombinaison homologue. Après la formation d'une DSB (A), il y a une résection des extrémités 5' par le complexe MRN associé à Sae2 et Exo1 (B). Les simples brins 3' ainsi créés sont stabilisés par la protéine RPA (C). RPA est remplacé avec l'aide de protéine Rad52 par Rad51 (D). La liaison de Rad51 avec le brin d'ADN entraîne la création d'une « boucle-D » (E). En utilisant la chromatine sœur comme schéma, le brin invasif est capable de synthétiser l'ADN en prolongeant la « boucle-D » (F). Le nouveau brin ainsi fabriqué va se lier au brin original (G). Pour finir, la complémentarité avec ce brin permet de restituer la partie de l'ADN manquant (H). *D'après Cannan and Pederson, 2015 et Mehta and Haber, 2014.*

IV. Les différentes morts cellulaires

La mort des cellules tumorales est le principal objectif d'une radiothérapie. Il existe plusieurs types de mort cellulaire, elle peut être induite comme l'apoptose ou non-programmée (nécrose). On peut également observer un arrêt permanent du cycle cellulaire (sénescence) ou au contraire, une activation du cycle malgré des lésions d'ADN (catastrophe mitotique) (Figure 34) (Orth et al., 2014). L'élimination de ces cellules mortes est ensuite confiée aux cellules du système immunitaire (Lauber et al., 2012).

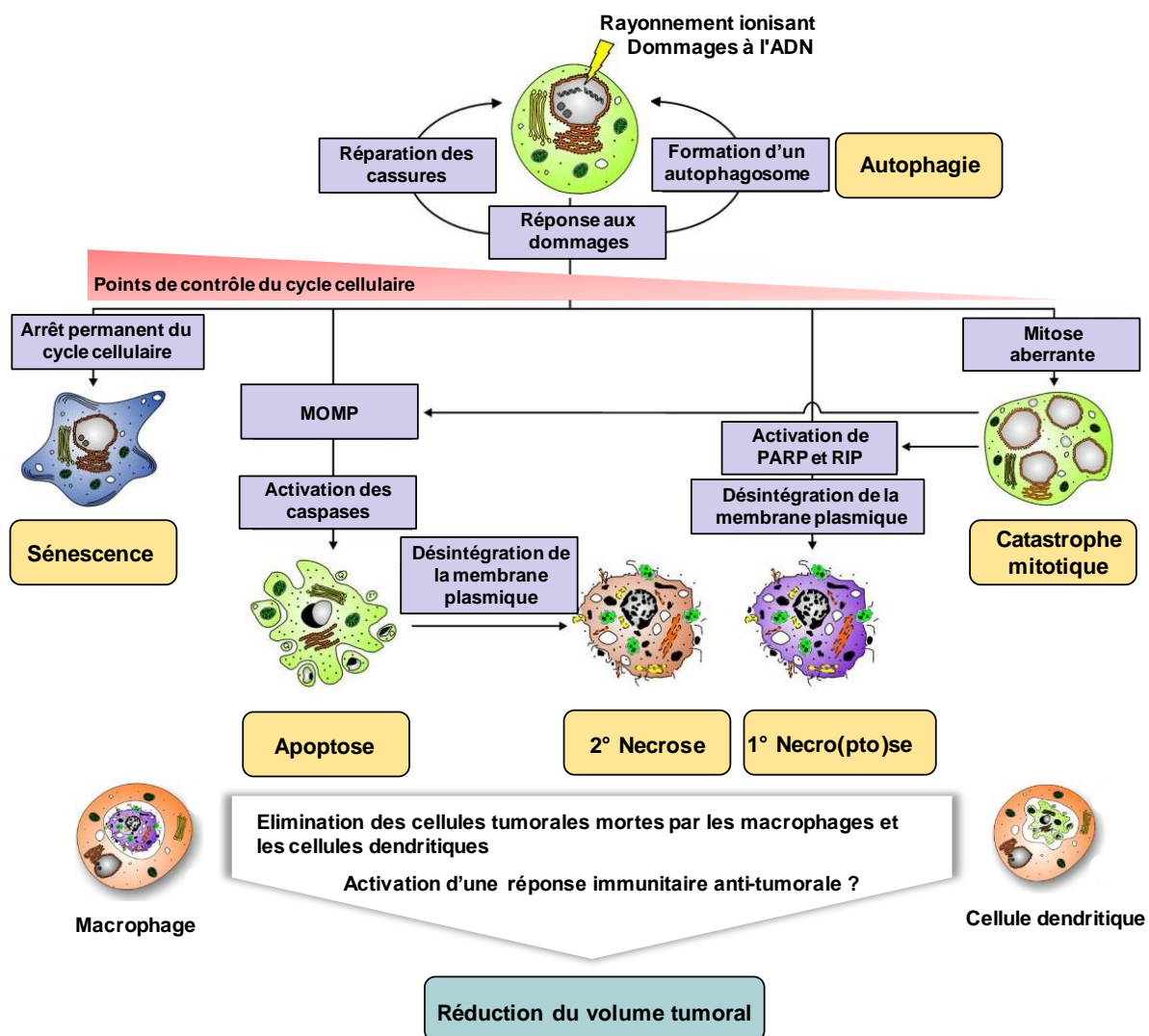


Figure 34 : Les différentes morts cellulaires induites par un rayonnement ionisant. D'après Lauber et al., 2012 et Orth et al., 2014

1. Apoptose

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée, qui est caractérisée par la condensation et la fragmentation de la chromatine, le rétrécissement des cellules et le bourgeonnement de la membrane cellulaire (Elmore, 2007). L'activation de l'apoptose peut se faire par l'intermédiaire de la voie extrinsèque ou de la voie intrinsèque.

L'initiation par la voie extrinsèque est déclenchée par un signal extérieur, par exemple par une cellule du système immunitaire. Dans le cas d'une radiothérapie, la voie intrinsèque est la principale voie responsable de l'apoptose, où elle est induite par des signaux internes à la cellule. Cette voie est déclenchée par l'activation de p53 lors de DSB irréparables. Le premier effet est une phase de perméabilisation de la membrane mitochondriale (MOMP : mitochondrial outer membrane permeabilisation) sous le contrôle d'interaction entre les protéines pro et anti-apoptotique de la famille de Bcl-2. Les membres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) forment des hétérodimères avec les membres pro-apoptotiques Bax et Bak, contrebalancant leur activité et permettant la stabilité/l'intégrité mitochondriale. Lors d'une activation, l'interaction entre Bax, Bak et Bcl-2 est perdue, entraînant la formation de pores et le relargage dans le cytosol du cytochrome C et du facteur AIF (Apoptosis-Inducing Factor) (Lorenzo and Susin, 2007). Le cytochrome C s'associe alors à APAF1 et la procaspase-9 pour former un complexe nommé apoptosome. La caspase-9 s'active au sein de l'apoptosome et active à son tour les caspases effectrices telles que la caspase-3 et la caspase-7 (Ouyang et al., 2012; Portt et al., 2011).

2. Nécrose/Nécroptose

Pendant longtemps, la nécrose a été considérée comme étant une mort cellulaire non programmée et non régulée. Récemment, il apparaît qu'elle peut également se produire de manière régulée. L'initiation de la nécrose programmée, « nécroptose », par des récepteurs de mort (tels que le récepteur du facteur de nécrose tumorale 1) nécessite l'activité de RIP1 et RIP3 (recepteur-interacting protein). Dans un contexte de radiothérapie, l'évènement crucial est l'hyperactivation de PARP ainsi que l'épuisement des taux d'ATP intracellulaires. Le nécrosome RIP1-RIP3 conduit à l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène, la

peroxydation lipidique, l'échec dans l'homéostasie du calcium, le gonflement des organites et la rupture de la membrane plasmique (Feoktistova and Leverkus, 2015; Vandenabeele et al., 2010). Par ailleurs, de fortes doses d'irradiation peuvent créer des ruptures de la membrane plasmique, de telle sorte que le contenu intracellulaire se répand à l'extérieur, détruisant l'intégrité cellulaire.

3. Catastrophe mitotique

Le terme "catastrophe mitotique" désigne une mort cellulaire qui se produit pendant ou à la suite d'une mitose anormale. Elle est généralement considérée comme une conséquence de l'entrée prématurée ou inappropriée d'une cellule en mitose. La catastrophe mitotique est caractérisée par la formation de grandes cellules avec une morphologie nucléaire aberrante, des noyaux multiples caractérisés par l'hyperamplification des centrosomes et/ou plusieurs micronucléi (Roninson et al., 2001).

Deux mécanismes ont été proposés. Tout d'abord une déficience de p53, conduirait à un échec d'arrêt de cycle et permettrait aux cellules d'entrer en mitose prématurément malgré la présence de DSB. La seconde hypothèse est l'hyperamplification du centrosome. Au cours de la mitose, les centrosomes sont les principaux centres d'organisation des microtubules. L'hyperamplification du centrosome peut entraîner un fuseau mitotique multipolaire, générant des cellules avec plusieurs micronoyaux ou des cellules géantes binuclées (Dodson et al., 2007). Ces cellules continuent plusieurs cycle de division jusqu'à atteindre un très grand nombre d'aberrations chromosomiques, pour être finalement être éliminées par apoptose ou necroptose. Ce mécanisme de mort cellulaire par catastrophe mitotique est prédominant dans les réponses aux radiations ionisantes (Eriksson and Stigbrand, 2010)

4. Sénescence

La sénescence cellulaire est un état d'arrêt du cycle cellulaire permanent. Les cellules sénescents sont actives en termes de métabolisme, mais ne montrent pas de progression du cycle cellulaire. Elles présentent des caractéristiques phénotypiques, telles qu'une morphologie plus large et aplatie, avec une augmentation de la granularité et une

coloration positive pour la β -galactosidase. Lors d'une radiothérapie, la sénescence est favorisée par p53 et est généralement accompagnée de l'expression de p21. Les cellules sécrètent également un certain nombre de cytokines qui peuvent renforcer l'arrêt de la croissance et permettre la communication avec leur microenvironnement (Coppé et al., 2010).

5. Autophagie

L'autophagie peut être impliquée à la fois dans la mort cellulaire et également dans la survie. Elle est caractérisée par la séquestration de protéines et/ou d'organites à l'intérieur de grandes vésicules appelées autophagosomes. La fusion de ces vésicules avec les lysosomes conduit à la formation d'autophagolysosomes à l'intérieur desquels les composants cellulaires sont dégradés. Les acides aminés, acides gras et nucléotide émanant de cette dégradation fournissent les matières premières nécessaires pour une nouvelle synthèse. En revanche, une exposition prolongée à un traitement peut induire une activation permanente de ce mécanisme qui conduit à une auto-dégradation cellulaire. Par conséquent, l'autophagie joue un double-rôle et il est difficile de la classer comme un mécanisme de survie ou de mort cellulaire. Elle implique l'activation d'une multitude de protéines kinases telles que PI3KI, des kinases de stress ou encore mTOR (Apel et al., 2009).

Molécules ciblant les caractéristiques intrinsèques des mélanocytes

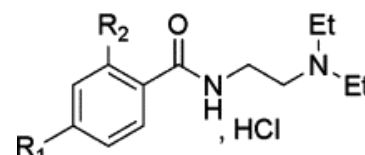
Les mélanocytes possèdent plusieurs caractéristiques bien spécifiques : la production de mélanine par la voie de la mélanogenèse, la présence du récepteur MC1-R ou encore le protéoglycane MCSP. Ces signes distinctifs uniques peuvent être utilisés pour cibler les cellules tumorales dérivant des mélanocytes. Des molécules de synthèse (Chloroquine, bleu de méthylène, benzamides et dérivés), des peptides et des anticorps ont ainsi été utilisés comme vecteurs pour l'imagerie et la radiothérapie du mélanome (Chezal et al., 2008; Miao and Quinn, 2008; Dadachova et al., 2004; Price et al., 2011).

I. Radiothérapie interne vectorisée avec des benzamides

La radiothérapie interne vectorisée (RIV) consiste à adresser spécifiquement un isotope radioactif aux cellules tumorales. Le vecteur idéal doit posséder l'affinité la plus spécifique possible pour les cellules cibles, une accumulation tumorale rapide, suffisante et durable pour avoir un effet mais également une clairance rapide des organes non-cibles afin de limiter les effets secondaires. Dans ce contexte, des molécules, possédant une grande affinité pour la mélanine, ont été développées pour l'imagerie des lésions pigmentées du mélanome, tel que le Mel-50 couplé avec l'¹⁸Fluor pour une utilisation en TEP (Greguric et al., 2009) mais également dans un but thérapeutique (Chezal et al., 2008; Joyal et al., 2010; Mier et al., 2014).

1. Première génération de radiotracteur développée par le laboratoire : BZA2

Le I-*N*-(2-diéthylaminoéthyl)-2-iodobenzamide (BZA2) (**Figure 35**) est un composé de la classe des iodobenzamides qui présente une forte affinité pour les tissus mélaniques (Moins et al., 2002). Ce vecteur associé à l'iode 123 (émetteur γ , demi-vie : 13,21 heures) peut être visualisé au sein de l'organisme grâce à la tomographie par émission monophotonique (TEMP).



$R_1 = H, R_2 = I$ BZA2

Figure 35 : Structure de la molécule BZA2.

Une première étude de l'évaluation de BZA2 dans un essai clinique de phase II sur 40 patients a montré des valeurs de sensibilité, de spécificité, de prédiction positive et de prédiction négative respectives de 100, 95, 86 et 100 %. Ce radiotracteur a permis de visualiser par scintigraphie toutes les lésions métastatiques pigmentées présentes chez les patients (Moins et al., 2002). Plus récemment, une étude multicentrique de phase III a inclus 87 patients entre 2008 et 2010. La molécule [^{123}I]BZA2 a été comparée au radiotracteur de référence pour l'imagerie des lésions cancéreuses : le ^{18}F -FDG. Les valeurs comparatives sont exposées dans le **tableau 6**. La sensibilité et la spécificité d' [^{123}I]BZA2 pour le diagnostic de lésion « mélanine-positif » sont respectivement de 39 et 94 %. A cause de la faible sensibilité d' [^{123}I]BZA2 comparée à celle du ^{18}F -FDG, l'étude clinique a été prématurément arrêtée (Cachin et al., 2014).

Analyses	[^{123}I]BZA2	^{18}F -FDG	Comparaison BZA2 vs FDG
Par patient			
Spécificité	94 %	78 %	BZA2 = FDG
Sensibilité	39 %	87 %	BZA2 < FDG
Par lésion			
Spécificité	86 %	54 %	BZA2 > FDG
Sensibilité	23 %	80 %	BZA2 < FDG

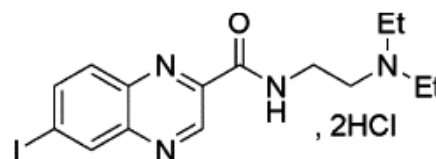
Tableau 6 Performance du radiotracteur [^{123}I]BZA2 comparée à celle du ^{18}F -FDG pour le diagnostic par imagerie du mélanome métastatisé. D'après Cachin et al., 2014

Cette première génération de radiotracer de mélanine a été pharmacomodulée générant ainsi la molécule ICF01012 (Chezal et al., 2008) qui présente des propriétés de rétention tumorale beaucoup plus élevées, permettant ainsi son utilisation en radiothérapie.

2. ICF01012 : nouveau radiotracer du mélanome pigmenté

a. Caractéristiques de la molécule ICF01012 :

Le *N*-(2-Diethylaminoethyl)-6-iodoquinoline-2-carboxamide (**Figure 37**) appelé aussi ICF01012, a été développé afin d'améliorer certains paramètres pharmacocinétiques des précédents benzamides iodés, notamment la rétention tumorale. Comme les benzamides, cette molécule présente une forte affinité pour la mélanine, du fait d'une interaction ionique entre l'amine tertiaire des benzamides et les fonctions anioniques de la mélanine (Labarre et al., 2002). D'autres interactions interviennent pour stabiliser la liaison ionique, il s'agit de liaisons hydrogènes et des empilements « π - π » créant une force d'attraction entre les noyaux aromatiques (**Figure 37**). L'affinité d'ICF01012 conduit à une concentration intra-tumorale élevée, jusqu'à 15 fois supérieure au composé BZA2 à 72 heures dans le modèle C57Bl6/B16. De plus, dans les organes non cibles, tels que le foie, le poumon ou encore le cerveau, aucune activité de cette molécule n'est mesurable au temps 72 heures. Le composé se distingue également par sa demi-vie intratumorale élevée de 66 heures et par ses paramètres de dosimétrie (Chezal et al., 2008).



ICF01012

Figure 36 : Structure de la molécule ICF01012. Bonnet et al., 2009

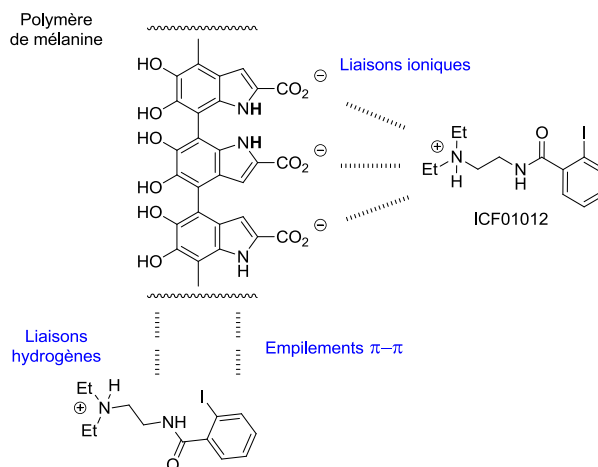


Figure 37 : Liaisons entre la molécule ICF01012 et la mélanine.

b. Imagerie et radiothérapie avec ICF01012 :

Le composé ICF01012 peut être couplé avec des isotopes radioactifs différents afin d'envisager plusieurs utilisations de la molécule. En étude préclinique sur un modèle murin porteur de mélanome pigmenté B16F0, la fixation tumorale d'ICF01012 couplé avec l'iode 125 (émetteur γ , demi-vie : 59 jours) présente une biodistribution intéressante (**Figure 38**). Les acquisitions réalisées à différents temps après l'injection montrent une fixation intense, durable et spécifique du traceur au mélanome associé à une clairance rapide et complète dans les organes non-cibles (Chezal et al., 2008). Ce profil cinétique favorable est mis à profit pour une application en radiothérapie ciblée du mélanome pigmenté.

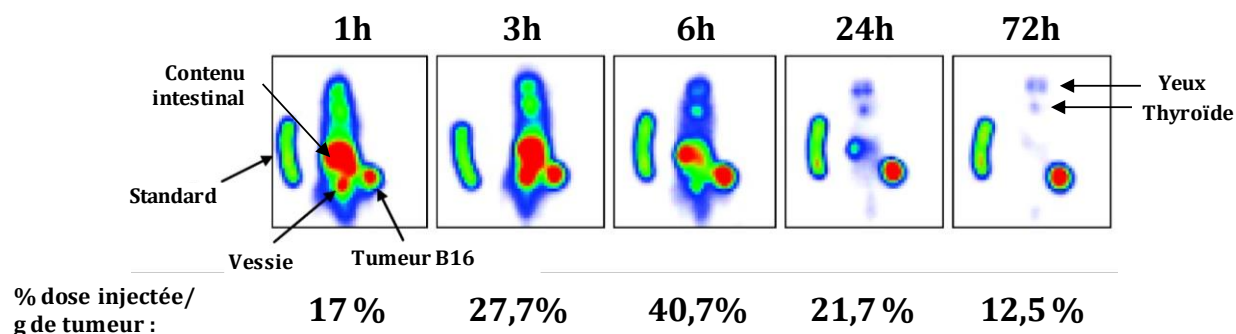


Figure 38 : Biodistribution D'ICF01012 marqué à l'iode 125 après une injection i.v. de 3 MBq sur un modèle murin porteur de mélanome B16 (γ -caméra dédiée au petit animal, 10 min d'acquisition).
D'après Chezal et al., 2008

En vue d'une utilisation thérapeutique du radiotracer, ICF01012 est radiomarqué avec de l'iode 131. Cet isotope a une demi-vie radioactive égale à 8 jours et il se désintègre en Xénon 131 stable par émission de rayonnement β^- . L'effet antitumoral d' $[^{131}\text{I}]$ ICF01012 a été démontré sur des souris C57BL6 porteuses de tumeur murine B16F0 et B16Bl6 (**Figure 39**) (Bonnet-Duquennoy et al., 2009).

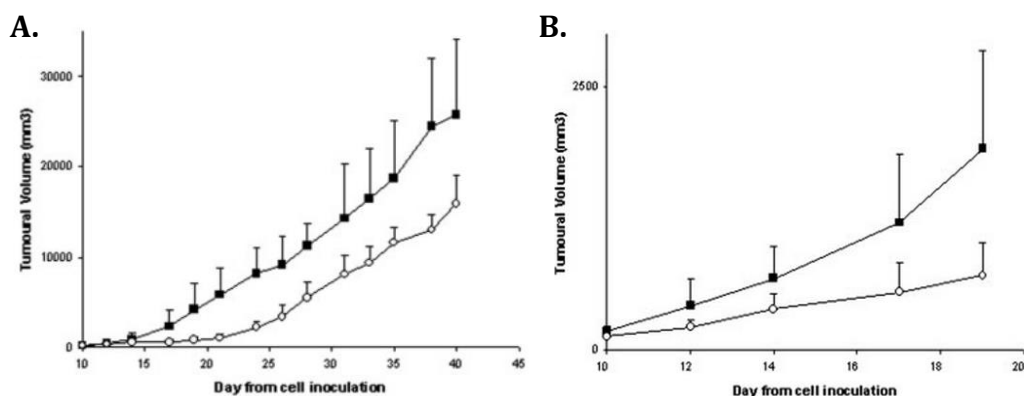


Figure 39 : Effet significatif de la radiothérapie vectorisée sur la croissance des tumeurs B16F0 (a) et B16Bl6 (b). Le traitement [¹³¹I]ICF01012 a été administré en i.v. à J6 et J10 post-implantation des cellules (2 x 18,5 MBq). En comparaison avec le groupe non-traité (noirs), le groupe [¹³¹I]ICF01012 (blancs) montre une diminution significative de la croissance tumorale. *Bonnet-Duquennoy et al., 2009*

Une seconde étude a observé l'efficacité d' [¹³¹I]ICF10102 en relation avec la mélanogénèse de mélanomes humains (Bonnet et al., 2010). Quatre lignées ont été étudiées : les A375 et M3Dau qui sont non pigmentées et les SK-Mel 3 et M4Beu qui sont mélanisées (**Figure 40**). Le dosage de mélanine par spectrophotométrie a montré que les quantités de mélanine dosées *in vitro* ne reflètent pas celles retrouvées *in vivo* (**Figure 41A**). En effet, d'après ces résultats, la lignée SK-Mel 3 est moins pigmentée que les cellules M4Beu en culture 2D, en revanche, cette tendance s'inverse lorsque les cellules sont implantées aux animaux et poussent sous forme de tumeur. Ces données sont associées à la fixation d' [¹²⁵I]ICF01012 dans des tumeurs pigmentées et une corrélation est observée (**Figure 41B**). Ces premières investigations permettent d'adapter la dose d' [¹³¹I]ICF01012

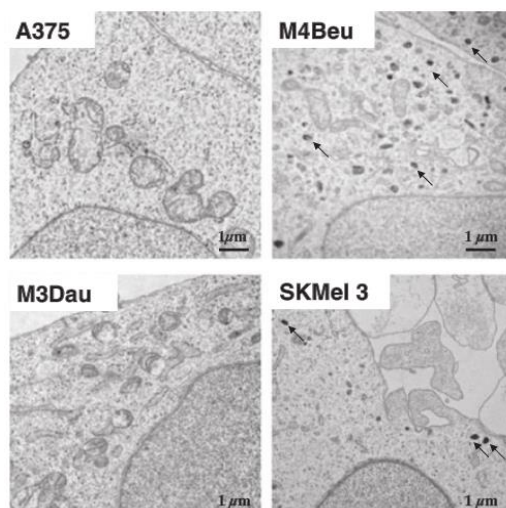


Figure 40 : Caractérisation de la pigmentation dans des lignées cellulaires de mélanome humain. Caractérisation de l'ultrastructure des mélanosomes. Aucun mélanosome n'est détecté dans les lignée A375 et M3Dau, un nombre important de mélanosomes sont observés dans la lignée M4Beu et un nombre plus faible sur SK-Mel 3 (flèches noires). *Bonnet et al., 2010*

en fonction de la quantité de mélanine présente dans les tumeurs. Ainsi, deux injections (37 MBq) d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ induisent une régression significative de la croissance des tumeurs M4Beu faiblement pigmentées, tandis qu'une seule injection (18,5 MBq) est suffisante pour produire un effet sur les cellules SK-Mel 3 (**Figure 42**).

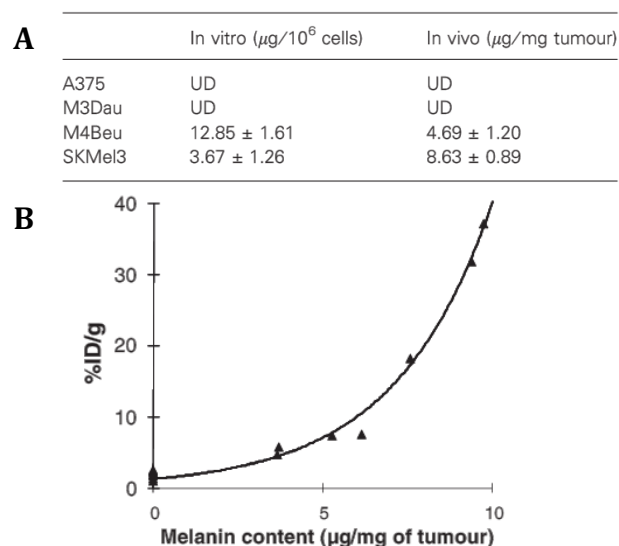


Figure 41 : A. Détermination de la quantité de mélanine in vitro et in vivo. Les concentrations *in vitro* ne reflètent pas celles *in vivo*. **B. Relation entre la captation d' $[^{125}\text{I}]\text{ICF01012}$ avec la quantité de mélanine in vivo dans différents modèles de mélanomes humains.** Bonnet *et al.*, 2010

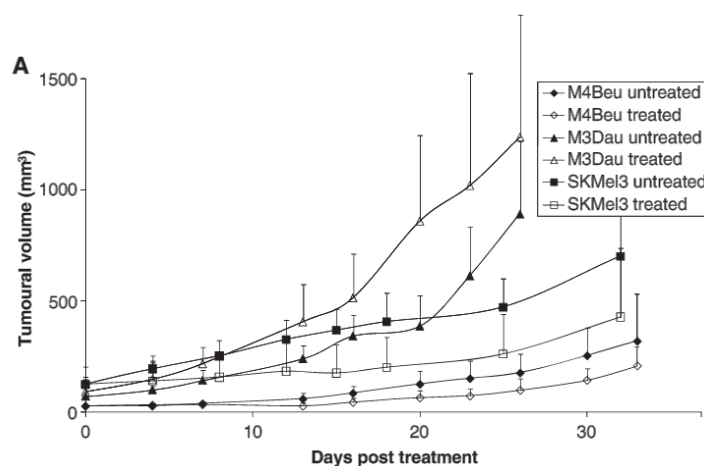


Figure 42 : Effet de la radiothérapie vectorisée sur la croissance de mélanome humain. Le traitement avec $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ est administré en iv au jour 14 et 18 pour M4Beu (37 MBq), à 35 jours pour SK-Mel 3 (18,5 MBq) et au jour 14 pour M3Dau (18,5 MBq). Bonnet *et al.*, 2010

Les études dosimétriques ont montré qu'une dose minimale délivrée à la tumeur de 30 Gy était nécessaire pour avoir un effet sur la croissance tumorale des B16Bl6 (Degoul et al., 2013). Avec les calculs MIRD extrapolés sur des autoradiographies d' $[^{125}\text{I}]\text{ICF01012}$, une dose délivrée de 54 ± 10 Gy était atteinte avec une injection de 18,5 MBq d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ (**Tableau 7**). Grâce à la clairance rapide de la molécule, la dose délivrée dans les organes non-cibles est faible. En revanche, l'œil possède une couche très pigmentée qui tapisse la rétine : l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). D'après les résultats, ICF01012 se fixe dans ce tissu. Cette fixation est gênante car elle pourrait entraîner une toxicité au niveau rétinien. Les éventuels effets secondaires au niveau de l'œil sont discutés dans le prochain paragraphe.

	Demie-vie effective(hr)	Demie-vie biologique(hr)	Dose délivrée(Gy)
Sang	8.2	8.6	0.7 ± 0.03
Moelle osseuse	1.4	1.4	0.3 ± 0.01
Muscle	4.4	4.5	0.2 ± 0.01
Rate	4.0	4.1	0.7 ± 0.03
Poumon	4.4	4.5	1.0 ± 0.04
Rein	5.0	5.1	1.9 ± 0.08
Estomac	5.1	5.2	3.8 ± 0.16
Foie	7.6	7.9	2.4 ± 0.10
Intestin	7.9	8.3	3.5 ± 0.15
Pancréas	4.0	4.1	0.7 ± 0.03
Cerveau	5.7	5.8	0.2 ± 0.01
Uvée	112.9	273.2	37.6 ± 1.59
Mélanome pigmenté	84.5	150.6	54.0 ± 10.02

Tableau 7 : Extrapolation de la dose délivrée aux organes pour l'injection de 18,5 MBq d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$. La dose délivrée à la tumeur et aux organes non cibles est estimée grâce au modèle MIRD Pamphlet No 11. D'après Degoul et al., 2013

c. Effets secondaires d'une radiothérapie avec [¹³¹I]ICF01012 :

Les études de toxicité montrent diminution transitoire du nombre de globule blanc induite par la radiothérapie (Degoul et al., 2013). Le nombre de plaquette reste inchangé quel que soit le groupe (**Figure 43**).

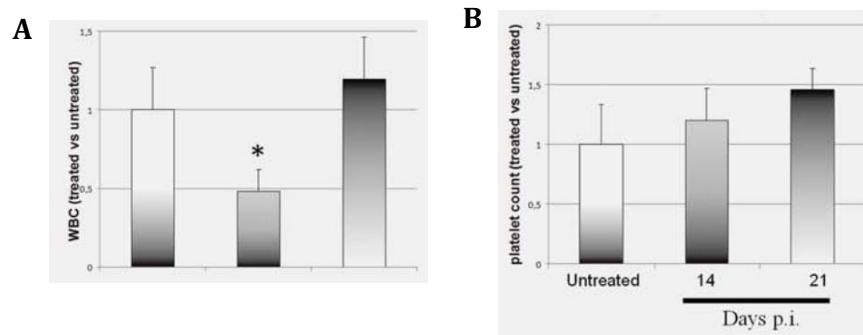


Figure 43 : Toxicité hématologique de l'ICF01012 sur les globules blancs (A) et les plaquettes (B). Les analyses sont réalisées 14 et 21 jours après le traitement. *Degoul et al., 2013*

Concernant les organes pigmentés, il est intéressant de noter que dans le cerveau la dose est vraiment faible (0,2 Gy) alors qu'il contient de la neuromélanine. Cette distribution est probablement due à la petite proportion de mélanine présente et à la capacité de la molécule de franchir la barrière hémato-encéphalique (Degoul et al., 2013). Les observations histologiques de la peau et des mélanocytes situés au niveau des follicules pileux ne montrent aucun dommage et aucune variation de la pigmentation (**Figure 44**).

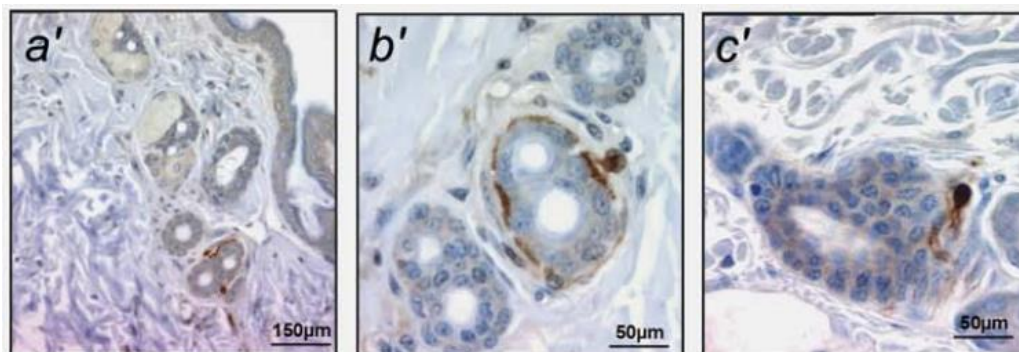


Figure 44 : Coupe histologique et coloration PS100 des mélanocytes des animaux traités (a' et b') et contrôles (c'). *Degoul et al. 2013*

La dose importante délivrée à l'œil de 37,6 Gy a un impact sur la rétine. Une diminution significative de l'épaisseur de l'EPR est observée autour du nerf optique (**Figure 45**). L'extrapolation à l'homme est à modérer, en effet le modèle C57Bl6 est un modèle très pigmenté qui ne reflète pas la géométrie, ni la concentration en mélanine d'un œil humain. De plus, la molécule précurseur BZA2 testée en étude clinique n'a montré aucune fixation significative au niveau oculaire et l'étude sur un autre traceur de mélanine (Joyal et al., 2010) montre que la dose délivrée à l'œil chez le singe n'est que de 6,8 Gy pour une injection de 37 MBq. En conclusion, la fixation à l'œil d' $[^{131}\text{I}]$ ICF01012 ne devrait pas être un problème majeur pour le transfert clinique de la molécule. Ce projet a démarré en août 2012 dans le cadre d'un projet translationnel PRTK soutenu par l'INCA/DGOS et les premiers patients devraient être inclus dans l'étude d'ici fin 2015 au Centre Jean Perrin de Clermont-Ferrand.

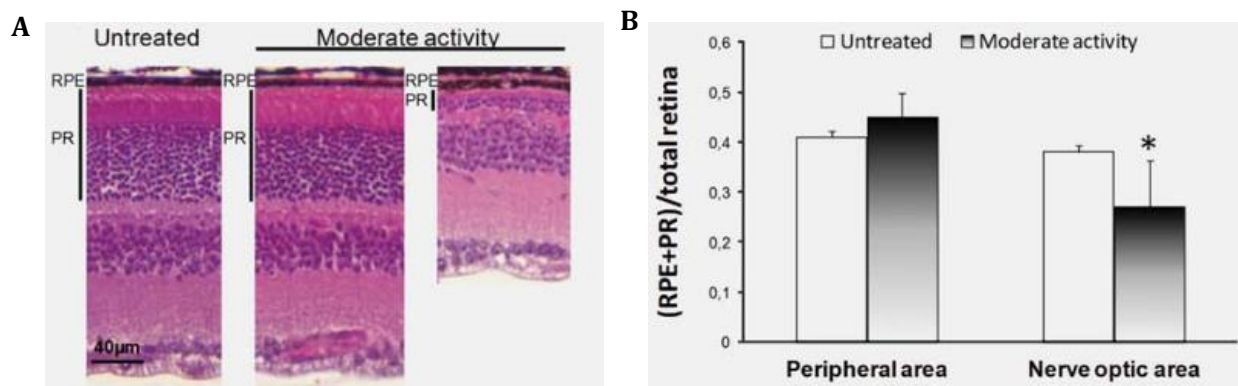


Figure 45 : Evaluation de la toxicité à la rétine sur un modèle très pigmenté. A. Représentation histologique de la rétine, RPE : épithélium pigmentaire rétinien, PR : photorécepteurs. B. Mesure de l'épaisseur de la RPE+PR autour et en périphérie du nerf optique. *Degoul et al. 2013*

3. Le vecteur MIP-1145

Une équipe (Joyal et al., 2010) a développé une molécule de type benzamide ciblant spécifiquement la mélanine : le vecteur MIP-1145 (**Figure 46**) (*N*-(2-diéthylamino-ethyl)-4-(4-fluorobenzamido)-5-iodo-2-methoxy-benzamide). Cette molécule possède un groupe méthoxy à la position 2

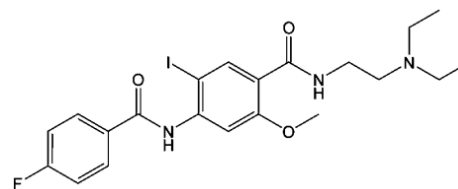


Figure 46 : Structure de la molécule MIP-1145. Joyal et al., 2010

et un iode à la position 5 du cycle central aromatique, ce qui lui permet d'être utilisé pour un radiomarquage avec de l'iode 131 (radiothérapie) ou 123 (imagerie). En plus, MIP-1145 contient un fluorobenzoate, il peut ainsi être potentiellement radiomarqué avec le fluor 18 et être utilisé en imagerie TEP. Le traitement de souris porteuses de mélanome humain SK-Mel 3 avec une (2,5 GBq/m²) ou plusieurs doses (2 ou 3 x 2,5 GBq/m²) d' [¹³¹I]MIP-1145 a montré une inhibition significative de la croissance, tumorale, avec une réponse jusqu'à 125 jours post traitement, et ceci associé à un allongement de la survie des animaux (**Figure 47**).

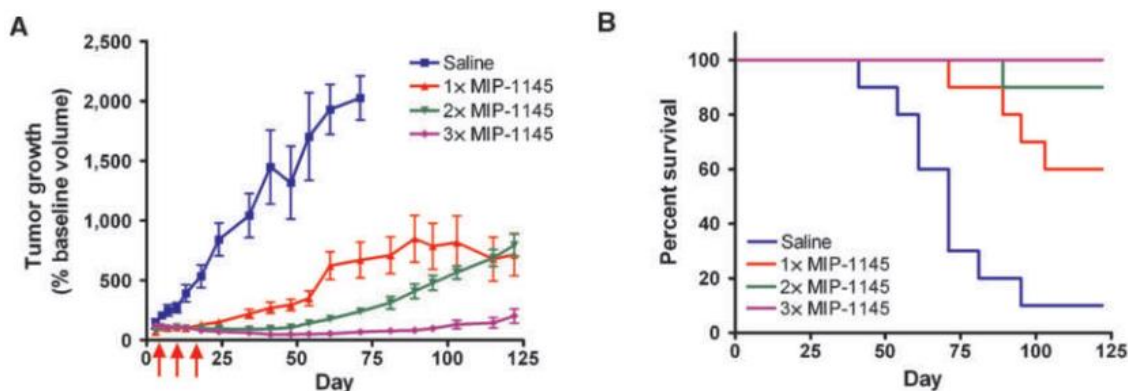


Figure 47 : Effet de l' [¹³¹I]MIP-1145 sur la croissance (A) de mélanome humain SK-Mel 3 et sur la survie des animaux (B). Le [¹³¹I]MIP-1145 est administré à 2,5 GBq/m² en dose unique, à deux doses ou à trois doses espacées d'une semaine d'intervalle. La croissance tumorale est exprimée en pourcentage de variation du volume en fonction des valeurs initiales. Joyal et al. 2010

La dosimétrie chez l'humain a été calculée à partir d'analyses pharmacocinétiques et d'imagerie γ -caméra réalisées chez le singe. L'œil est un organe non-cible sensible car il possède un fort taux en mélanine et une forte irradiation entrainerait une altération de la

rétine. Le calcul de la dose absorbée au niveau de l'œil, chez un modèle de singe est de $1,30 \pm 0,67$ mGy/MBq. Ces résultats sont encourageants pour le transfert clinique de cette molécule. En effet, ils montrent que le vecteur MIP-1145 présente une fixation spécifique à la mélanine et sa dosimétrie, notamment pour les effets secondaires au niveau de l'œil, suggèrent que cette molécule peut être utilisée pour traiter par RIV des patients atteints de mélanome métastasé.

4. Le radiotracteur BA-52

Le radiotracteur BA-52 (benzo(1,3)dioxolo-5-carboxylic acid (4-(2-diethylaminoethylcarbamoyl)-2-iodo-5-methoxy-phenyl)-amide) (**Figure 48**) a récemment été utilisé chez l'homme dans une étude clinique de phase I (Mier et al., 2014). Initialement, 26 patients présentant des mélanomes métastatiques ont été inclus dans l'étude. Une première analyse en imagerie avec BA-52 marqué à l'iode

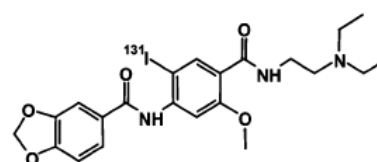


Figure 48 : Structure de la molécule BA-52. Mier et al., 2014

123 (activité injectée : 235 ± 62 MBq) a déterminé que 38% des patients présentaient des métastases pigmentées. Ces patients, au nombre de 9, sont éligibles pour une radiothérapie avec [^{131}I]BA-52. Les personnes traitées ont été divisées en deux groupes : le premier comportant 4 personnes a reçu une dose de 4 GBq ou moins, tandis que le second groupe de 5 personnes était traité avec 4,3 – 6,6 GBq. Parmi les patients du deuxième groupe, 3 personnes ont présenté une survie de plus de 2 ans après la thérapie. En comparaison, chez les patients non traités ou avec des doses inférieures à 4 GBq, leur survie moyenne était de 3 mois. L'effet antitumoral de cette molécule a pu être observé au ^{18}F -FDG en PET/CT sur des métastases inguinales et para-aortales 6 semaines après le traitement avec [^{131}I]BA-52 (**Figure 49**). En conclusion, cette étude clinique démontre l'intérêt des benzamides radiomarquées pour lutter contre les lésions métastasées pigmentées. Cependant, les doses inférieures à 4GBq ne semblent pas suffisamment efficaces. L'association avec des radiosensibilisants peut donc être un choix pour potentialiser l'effet d'une irradiation insuffisante.

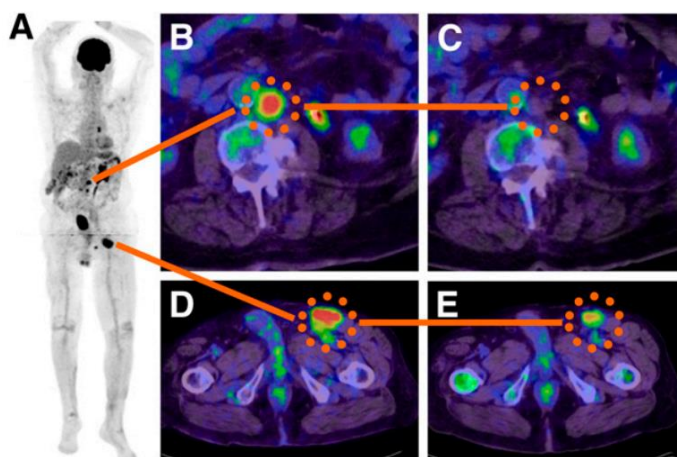


Figure 49 : Efficacité du radiotracer $[^{131}\text{I}]\text{BA-52}$. A) L'imagerie au ^{18}F -FDG d'un patient montre la présence de métastases inguinale et para-aortale. Visualisation des métastases au PET/CT avant la thérapie (B et D). La métastase para-aortale (C) disparaît complètement 6 semaines après le traitement, tandis que la métastase inguinale (E) diminue en taille. *Mier et al., 2014*

II. Radiothérapie interne vectorisée avec des nicotinamides

Les molécules nicotinamides diffèrent des dérivées benzamides par leur groupement nicotine qui remplace le groupement benzamide. L'amine tertiaire permettant la liaison à la mélanine est en revanche inchangée.

1. Les radiotraceurs MEL

Malgré des structures chimiques très similaires, le MEL050 (F-6-fluoro-N-((2-(diethylamino)ethyl)pyridine-3-carboxamide) et le MEL008 (I-N-(2-(diethylamino)ethyl)-5-iodonicotinamide) se différencient par l'isotope radioactif couplé (**Figure 50**) (Greguric et al., 2009; Liu et al., 2008). En effet, le MEL050 peut être radiomarké uniquement avec le fluor 18 pour une imagerie au PET tandis que le MEL008 peut être marqué à l'iode 123 ou 131 pour une utilisation théranostique de la molécule.

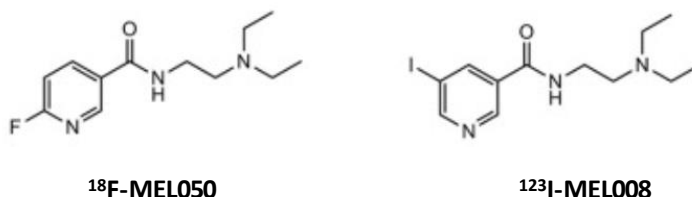


Figure 50 : Structure des nicotinamides MEL développés pour l'imagerie et/ou la radiothérapie du mélanome. D'après Greguric et al., 2009 et Liu et al., 2008

La biodistribution des MEL a été évaluée sur deux modèles murins : l'un porteur de tumeur mélanique B16F0 et l'autre de tumeur amélanique A375. La fixation tumorale a été significativement plus forte dans le modèle B16F0, démontrant ainsi la spécificité de ces radiotraceurs pour la mélanine (Liu et al., 2008).

2. L'iochlronicotinamide

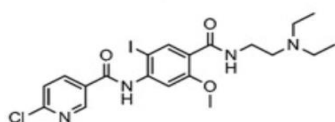


Figure 51 : Structure de l'iochlronicotinamide. Chang et al., 2015

Le 6-chloro-N-((2-(diethylamino)ethyl)carbamoyl)-2-iodo-5-methoxyphenyl)nicotinamide (**Figure 51**), appelé l'iochlronicotinamide est un nouveau dérivé nicotinamide qui peut être marqué à l'iode 123/131 (Chang et al., 2015). En

comparant la captation de l' ^{123}I -iochlonicotinamide par SPECT chez deux modèles de tumeurs B16F0 (pigmentée) et A375 (amélanique), la fixation est spécifique à la mélanine ($13,48 \pm 1,77$ vs $1,67 \pm 0,31$ %DI/g au temps 1 heure, respectivement) (**Figure 52**). Malgré des propriétés similaires, ce composé possède une rétention tumorale moins importante que celle d'ICF01012. En effet, alors qu'ICF01012 est à 21,7 %DI/g au temps 24h dans le modèle B16, l'iochlonicotinamide n'est qu'à $7,03 \pm 1,52$ %DI/g au même temps dans les mêmes tumeurs. On retrouve également une fixation importante au niveau des yeux des animaux C57Bl6 ($16,84 \pm 2,18$ %DI/g). L'extrapolation chez l'homme de la dosimétrie n'a pas été effectuée sur cet organe.

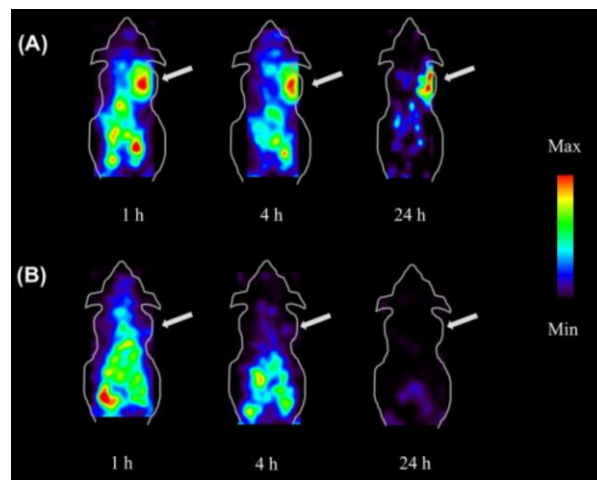


Figure 52 : MicroSPECT de souris C57BL/6 porteuses de mélanome pigmenté B16F0 sur l'épaule droite (A) et de souris BALB/c porteuses de mélanome amélanotique A375 (B). Les images sont réalisées 1, 4 et 24 heures après l'injection i.v. de 11,1 MBq/0,1 ml d' ^{123}I -iochlonicotinamide. D'après Chang et al., 2015

III. Anticorps radiomarqués

Les immunoglobulines (Ig) radiomarquées peuvent être utilisées pour le diagnostic et le traitement de tumeur (Navarro-Teulon et al., 2013). La radioimmunothérapie (RIT) permet un ciblage spécifique grâce à la haute affinité antigène-anticorps, délivrant ainsi les irradiations uniquement aux cellules ciblées. Les premières applications cliniques ont démontré le potentiel de la RIT, notamment l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD20 marqués à l'⁹⁰Yttrium (ibritumomab) ou l'¹³¹Iode (tositumomab) pour le traitement du lymphome (Milenic et al., 2004).

1. Anticorps ciblant la mélanine

Historiquement, dans le cas du mélanome, la mélanine n'était pas considérée comme une cible potentielle pour la RIT car elle est principalement localisée en intracellulaire dans les mélanosomes, hors de portée des anticorps. Cependant, le mélanome possède des zones hypoxiques, entraînant la nécrose des cellules tumorales et le relargage des composants cellulaires. La mélanine ainsi libérée dans le milieu extracellulaire va pouvoir être ciblée par un anticorps marqué. La RIT va entraîner à son tour une destruction des cellules saines, augmentant ainsi la quantité de mélanine en extracellulaire (**Figure 53**), (Klein et al., 2013).

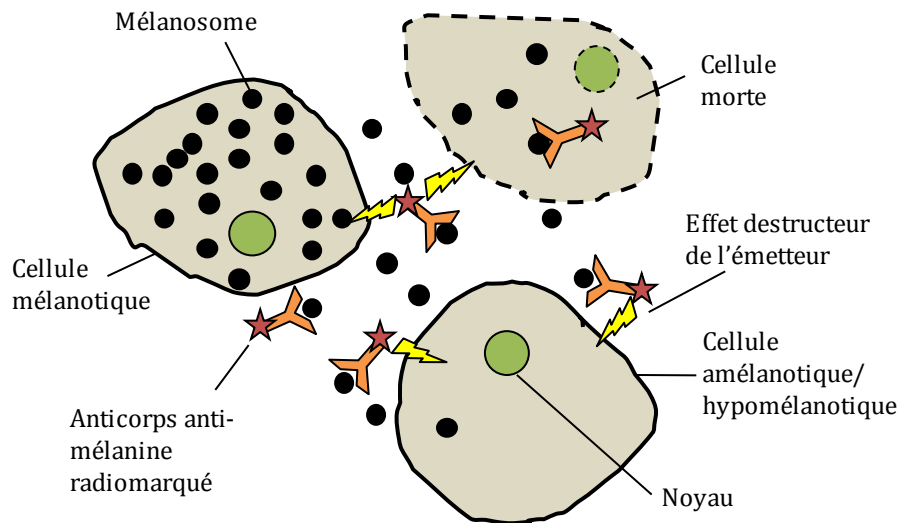


Figure 53 : Schéma récapitulatif des mécanismes de la RIT ciblant la mélanine. D'après Jandl et al., 2013

Un anticorps anti-mélanine, le 6D2, a été développé ces dernières années par l'équipe du Pr. Dadachova. Cet anticorps, couplé à un émetteur β : le rhénium 188, a montré une capacité de liaison à l'eumélanine mais également à la phéomélanine. En effet cet anticorps a montré une fixation similaire dans les cellules MNT1, qui sont eumélaniques, et les cellules SK-Mel 28 qui sont phéomélaniques (Dadachova et al., 2004). Cette aptitude à cibler les différentes mélanines permet au 6D2 d'être utilisé pour traiter les mélanomes pigmentés, quel que soit leur composition en mélanine. La biodistribution de l'anticorps 6D2 est caractérisée par une clairance rapide de la circulation sanguine. Il est également important de noter que sur des souris C57BL/6, aucune présence d' ^{188}Re -6D2 n'a été détectée dans les organes pigmentés tels que la rétine, la peau ou les follicules pileux. En effet, la mélanine présente dans ces organes n'était pas accessible en raison de sa localisation intracellulaire, limitant ainsi les effets secondaires liés à l'irradiation de ces tissus, notamment au niveau rétinien (Dadachova et al., 2004). L'efficacité de la RIT a été prouvée sur des xénogreffes de mélanomes humains MNT1 et A2058 (**Figure 54**) (Dadachova et al., 2004; Jandl et al., 2013).

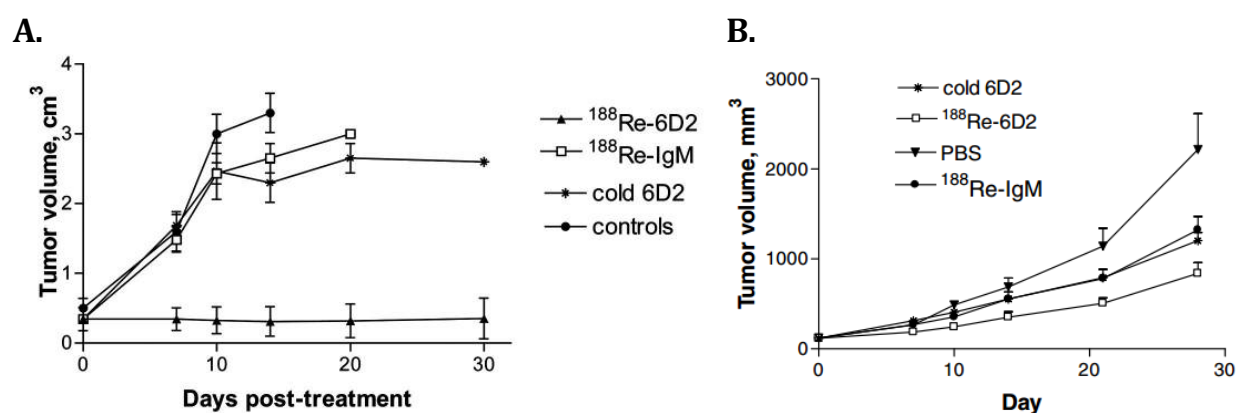


Figure 54 : Effets de l'anticorps ^{188}Re -6D2 sur des mélanomes métastatiques humains MNT1 (A) (Dadachova et al., 2004) ou A2058 (B). Les animaux ont été séparés en 4 groupes et ont reçu en i.p. 1,5 mCi d' ^{188}Re -6D2 (100 μg), ou 1,5 mCi d' ^{188}Re -IgM, ou 100 μg de 6D2 froid ou du PBS. Une diminution significative du volume tumoral a été observée dans le groupe traité avec le ^{188}Re -6D2 (Jandl et al., 2013)

L'effet du ^{188}Re -6D2 a également été testé sur les cellules souches de mélanome identifiées par les marqueurs ABCB5 et JARID1B. Le pourcentage de ces cellules est identique chez les animaux contrôles et traités. Ceci démontre que, contrairement à la chimiothérapie, la radiothérapie a l'avantage de ne pas cibler préférentiellement un type cellulaire. Elle n'enrichit pas la tumeur en cellules souches et détruit uniformément les cellules tumorales (Jandl et al., 2013).

Devant ces résultats précliniques, l'anticorps monoclonal 6D2 est passé récemment en étude clinique en phase I. Sur des patients atteints de mélanome métastatique pigmenté, la médiane de survie des patients traités avec ^{188}Re -6D2 est d'environ 13 mois, tandis qu'il n'est que de 8,5 mois pour des sujets ayant reçu le traitement contrôle (**Figure 55**). Aucune fixation dans les tissus sains mélanisés n'est observée, ces résultats sont similaires au modèle animal. L'anticorps ^{188}Re -6D2 n'induit pas d'effets secondaires graves, plusieurs facteurs y contribuent. 1) la clairance rapide de la circulation sanguine prévient l'irradiation de la moelle osseuse, 2) la demi-vie physique du ^{188}Re (17 heures) en comparaison avec le ^{90}Y et ^{131}I (2,8 et 8 jours respectivement), 3) l'élimination rapide par le rein du ^{188}Re , 4) l'absence de fixation du 6D2 dans les tissus non-cibles. En conclusion, l'étude préclinique du ^{188}Re -6D2 a démontré un ciblage de la tumeur, une absence d'effet secondaire du traitement, ainsi qu'un allongement de la survie des patients. Cette radioimmunothérapie pourrait donc être administrée seule ou en combinaison avec d'autres thérapies pour le traitement du mélanome (Klein et al., 2013).

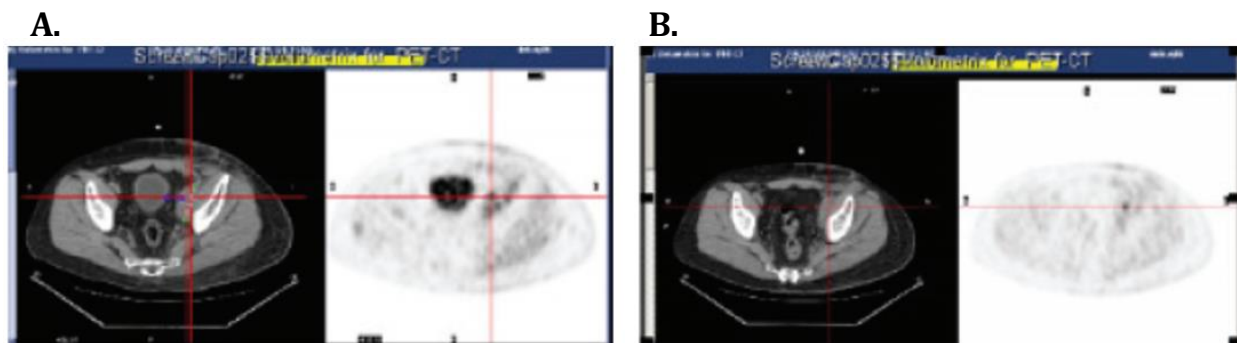


Figure 55 : Réponse tumorale au ^{188}Re -6D2 chez un patient atteint de mélanome métastatique pigmenté ayant reçu 0,74 GBq/16 mg d' ^{188}Re -6D2. A. ^{18}F FDG PET/CT 10 jours après le traitement. B. ^{18}F FDG PET/CT 24 semaines après le traitement. Le patient est toujours en vie 17 mois après le traitement avec une stabilisation de la croissance tumorale. Klein et al., 2013

2. Anticorps ciblant la MCSP

La MCSP (melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan), aussi appelée CSPG4 (Chondroitin sulfate proteoglycan 4), est une protéine transmembranaire identifiée à l'origine comme un antigène tumoral à la surface des cellules de mélanome. Bien que la MCSP ne soit pas oncogène, son expression active directement ou indirectement, plusieurs voies de signalisation associées à la progression tumorale. Les voies qui sont touchées par la MCSP comprennent la survie (PI3K, AKT et NFκB), l'adhérence (FAK et les intégrines), et la croissance/motilité (RTK et les voies en aval, y compris ERK 1,2) (**Figure 56**). La MCSP module donc de nombreux aspects de la progression tumorale. Elle est associée à la formation de mélanome ainsi qu'à un pronostic défavorable (Price et al., 2011).

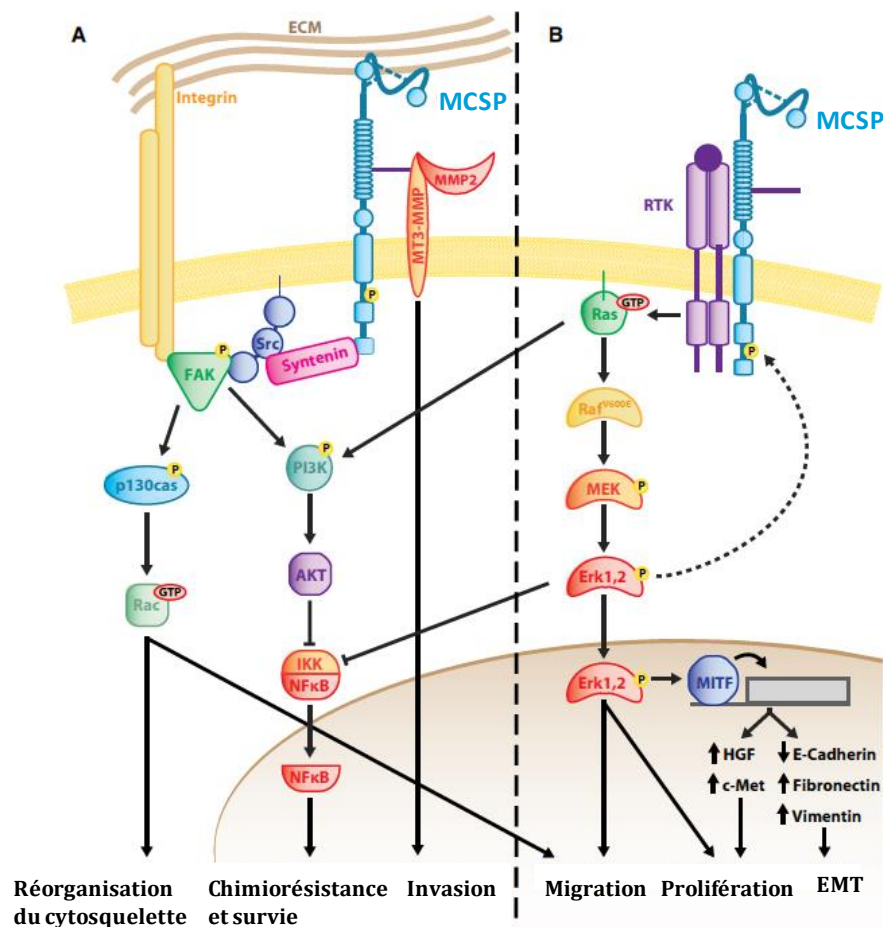


Figure 56 : Voies de signalisation activées par la MCSP. A) Voies des intégrines/kinases d'adhésion. B) Voie des MAPK. Price et al., 2011

L'expression de la MCSP a été retrouvée dans plus de 90 % des lignées cellulaires (Allen et al., 2011). Il n'est donc pas surprenant qu'elle soit considérée comme une cible potentielle pour le traitement du mélanome. L' α -thérapie vectorisée (ATV) est une nouvelle approche thérapeutique utilisée pour cibler le mélanome et contrôler ou limiter son développement. L'ATV développée par une équipe (Allen et al., 2011; Raja et al., 2007) implique la combinaison, via le chelateur cDTPA, du radio-isotope ^{213}Bi émetteur α avec l'anticorps monoclonal spécifique de MCSP : 9.2.27. L' α -immunoconjugué ^{213}Bi -cDTPA-9.2.27 a été testé pour la spécificité, l'efficacité et la cytotoxicité sur des cellules de mélanome *in vitro* et *in vivo* (Rizvi et al., 2005). Les résultats ont montré une spécificité importante pour l'antigène MCSP, exprimé uniquement dans le mélanome, ainsi qu'une localisation spécifique dans la tumeur. Les effets secondaires sont limités par la non-fixation aux organes non-cibles, en revanche, la chelation de cet anticorps entraîne la formation d'agent cytotoxique (Allen et al., 2011). Dans une étude de phase I, aucun dommage au niveau rénal n'a été observé jusqu'à 12 mois après l'injection de 592 MBq d'anticorps (Raja et al., 2007). Cette étude s'est prolongée jusqu'en 2011 (Allen et al., 2011) et *in fine* 39 patients avec des métastases de mélanome ont été inclus. Parmi les patients, 6 d'entre eux (15%) ont montré une survie supérieure à 3 ans. La réponse au traitement n'est pas complète ; il y a plutôt une stabilisation de la progression de la maladie. En conclusion, l'ATV n'est pas seulement indiquée pour les cancers non-tumoraux (leucémie) ou les micrométastases mais également pour le traitement palliatif de cancer avancé.

IV. Peptides radiomarqués ciblant MC1R

Les récepteurs à la mélanocortine-1 (MC1-R) appartiennent à la superfamille des récepteurs de protéines G et ils sont exprimés dans les mélanomes mélanotiques et amélanotiques. Plus de 80% des échantillons humains de mélanome métastatique ont présenté les récepteurs MC1R (Miao et al., 2003). Il s'agit donc d'une cible moléculaire intéressante pour cibler spécifiquement le mélanome pour l'imagerie ou la thérapie. Le ligand de MC1-R est une hormone appelée α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), qui stimule la production de mélanine. Des analogues de α -MSH (**Figure 57**), couplés à des éléments radioactifs, vont se fixer au récepteur MC1-R et irradier spécifiquement le mélanome.

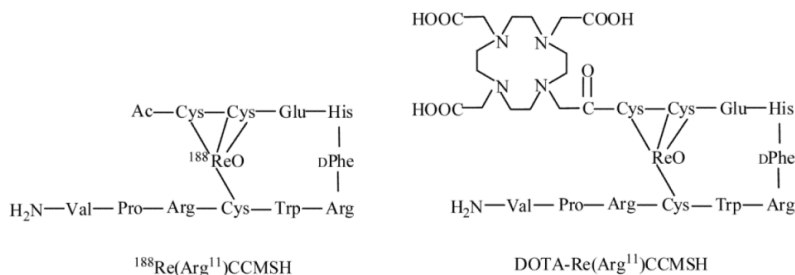


Figure 57 : Structures de deux analogues d' α -MSH. Miao and Quinn 2008

Les différentes études précliniques ouvrent une perspective optimiste pour l'utilisation des peptides analogues de α -MSH. Le traitement au $^{188}\text{Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$ (**Figure 58**) ou au $[^{212}\text{Pb}]\text{DOTA-Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$ a déjà prouvé son efficacité avec une diminution du volume tumoral associée à une augmentation de la durée de vie des animaux (Miao and Quinn, 2008).

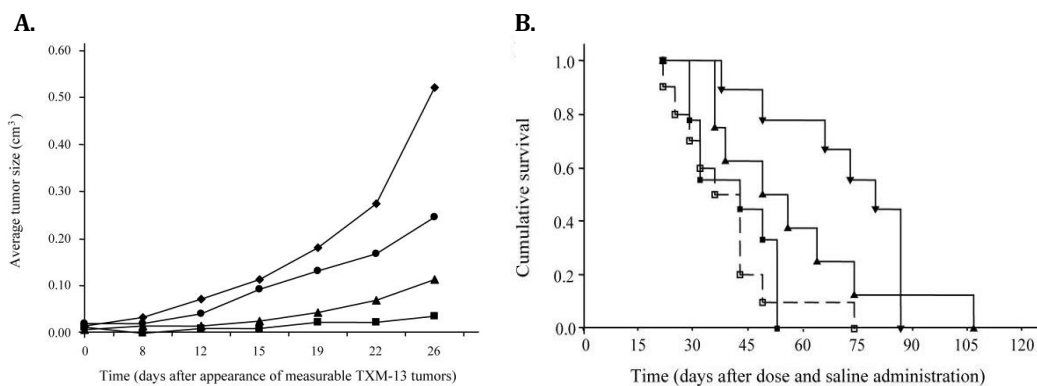


Figure 58 : Effet du traitement $^{188}\text{Re}(\text{Arg}^{11})\text{CCMSH}$ sur la croissance (A) de mélanome humain TXM-13 à différentes doses (de haut en bas : excipient, 2x14,8 MBq, 22,2 MBq et 38 MBq) et la survie des animaux (B). Miao and Quinn, 2008

Radiosensibilisation du mélanome

Dans certains cas, la radiothérapie ne suffit pas pour détruire complètement une tumeur et augmenter les doses pour augmenter l'efficacité n'est pas toujours une solution appropriée car de sérieux effets secondaires peuvent apparaître. Plusieurs approches permettant d'améliorer la radiosensibilité tumorale sont actuellement en cours de développement.

I. Le coDbait : Leurre de la réparation

1. Structure et mécanismes

Le coDbait est une séquence d'ADN double brin de 32 paires de base couplée à une molécule de cholestérol, de manière covalente en son extrémité 5', afin de faciliter son absorption cellulaire (**Figure 59**). Cette nouvelle molécule cible les voies de réparation double-brin de l'ADN dans le but de sensibiliser les cellules à la radiothérapie (Quanz et al., 2009a) ou à la chimiothérapie (Devun et al., 2012). Le coDbait agit comme un substrat mimétique principalement dans la voie de la jonction d'extrémité non homologue et leurre dans un premier temps la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) (Croset et al., 2013). La cascade de signalisation s'active avec la phosphorylation de l'histone H2AX sur la sérine 139 (γ H2AX) suivit par la suite d'une hyperactivation de l'enzyme DNA-PK (Quanz et al., 2009b). Ce leurre désorganise et séquestre les mécanismes de réparation en amont, les cassures de l'ADN induites par une radiothérapie ne sont pas détectées et donc non réparées favorisant la mort cellulaire.

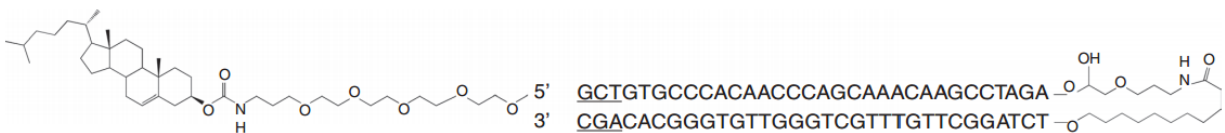


Figure 59 : Structure du coDbait. La molécule de Dbait est composée d'un double brin d'ADN de 32 paires de bases relié en épingle à cheveux. Afin de la protéger des exonucléases et des hélicases, les extrémités libres (nucléotides soulignés) sont substituées avec des nucléotides phosphorothioates. Afin de faciliter le passage membranaire, le Dbait est lié au moyen du triéthylène glycol à du cholestérol, cette molécule est alors appelée coDbait. *Schlegel et al., 2012*

2. Tests précliniques

Les premiers tests précliniques ont été effectués en 2009 sur les tumeurs radiorésistantes Hep2, Lu1205 et SK28. L'association du Dbait, en injection intratumorale, avec une irradiation externe au césium 137 inhibe significativement la croissance tumorale par rapport à la radiothérapie seule (**Figure 60**). Par ailleurs, 12% des animaux traités présentent une nécrose complète de la tumeur suivie d'une guérison sans rechute (Quanz et al., 2009a).

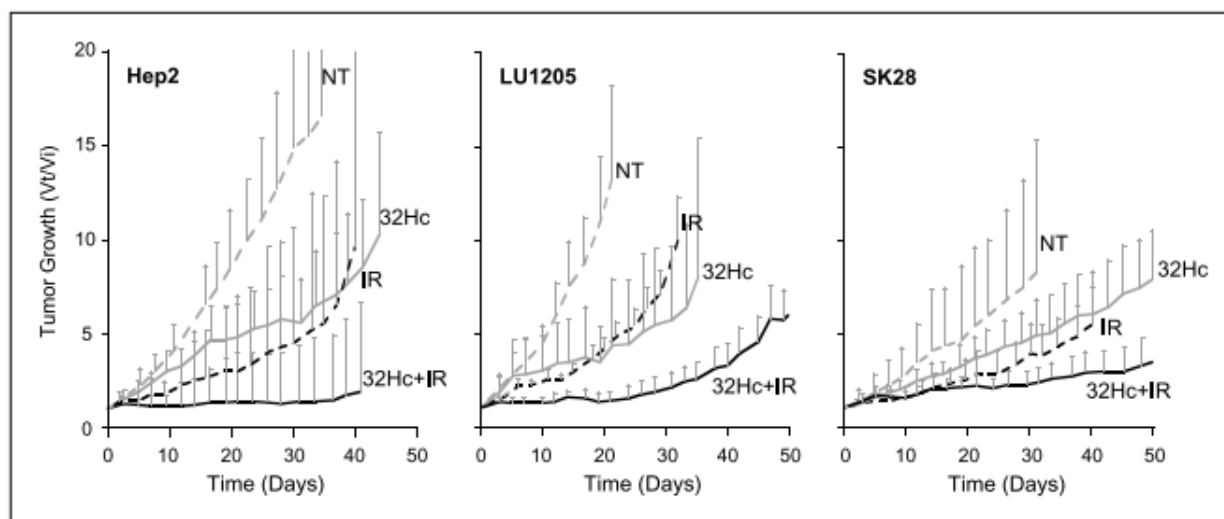


Figure 60 : Radiosensibilisation de Hep2, Lu1205 et SK28 avec du Dbait. Évolution de la croissance tumorale après différents traitements (NT: Non Traité; IR: Radiothérapie; 32Hc: Dbait; 32Hc+IR: traitement combiné du Dbait et de la radiothérapie). Quanz et al., 2009a

Le Dbait a aussi été combiné à un traitement de chimiothérapie. Administré par voie orale, il augmente significativement la survie des animaux transgéniques dans le cancer colorectal, indépendamment de leur statut KRAS (Devun et al., 2012). Dans le glioblastome, le coDbait est associé à 2 irradiations de 6 Gy de cobalt 60. Le volume tumoral est nettement diminué chez les animaux doubles traités (Coquery et al., 2012). Par ailleurs, le coDbait ne présente aucune toxicité au niveau du cerveau. La dernière étude menée sur le mélanome SK-Mel 28 confirme son efficacité de radiosensibilisateur (**Figure 61**) (Biau et al., 2014).

4. Etude de Phase I

La tolérance et l'efficacité d'une administration locale de la molécule associée avec la RT est en essai de phase 1 chez des patients atteints de métastases de mélanome non résecables. Chaque patient a reçu une RT de 3 Gy/5 jours par semaine pendant 2 semaines sur toutes les lésions tumorales, alors que seulement une ou deux lésions ont été associées avec du cobalt (DT01) 3 fois par semaine pendant 2 semaines. La plupart des effets secondaires étaient réversibles et limités au site d'injection. Les analyses pharmacocinétiques suggèrent un passage systémique du DT01 de façon non-linéaire. Les taux de réponses globales étaient de 68 et 48 % pour les lésions tumorales traitées avec RT + DT01 et RT seule, respectivement. Ces premiers résultats suggèrent une activité anti-tumorale, ainsi qu'une absence de toxicité et une distribution systémique du DT01 (Letourneau et al., 2015). Cette approche peut fournir une option innovante dans le traitement du mélanome.

II. Les nanoparticules

Les nanoparticules sont des agents multifonctionnels pour l'imagerie et la thérapie en pleine émergence dans le domaine de la recherche anticancéreuse. Avec l'avancée des technologies, il est maintenant possible de proposer des nanostructures, contenant des éléments avec un numéro atomique élevé, qui sont utilisés pour la radiosensibilisation tumorale. Jusqu'à présent, les nanoparticules d'or ont été les plus employées (Mesbahi, 2010) mais d'autres nanoparticules existent avec un cœur métallique telles que les nanoparticules de gadolinium.

1. Structure et caractéristiques des nanoparticules à base de gadolinium

Les nanoparticules à base de gadolinium (GBN) ont un diamètre hydrodynamique moyen de $2,9 \pm 0,2$ nm. Elles sont constituées d'un noyau d'oxyde de gadolinium entouré d'une enveloppe de polysiloxane (**Figure 62**) (Lux et al., 2011). Les propriétés du cœur de gadolinium permettent une utilisation multimodale des GBN. En effet, elles peuvent être

détectées par IRM et également être utilisées pour la radiosensibilisation. Les propriétés radiosensibilisantes des GBN proviennent du numéro atomique élevé du gadolinium ($Z=64$) qui leur confère une densité électronique importante. Les GBN sont activées par les radiations ionisantes émises par la radiothérapie. Les électrons de haute énergie induisent la production d'électrons secondaires de faible énergie et parcours ainsi que la production de ROS. Ces effets secondaires sont impliqués dans la radiosensibilisation (Calugaru et al., 2015).

D'autres composés peuvent être greffés sur l'enrobage des GNB. Ainsi, l'ajout de cage DOTA permet d'insérer directement des isotopes radioactifs. Des vecteurs, tels que ICF01012, peuvent également compléter les GBN pour un adressage vers une cible spécifique. Pour finir, des fluorophores organiques complètent les caractéristiques des GBN pour une utilisation en imagerie optique.

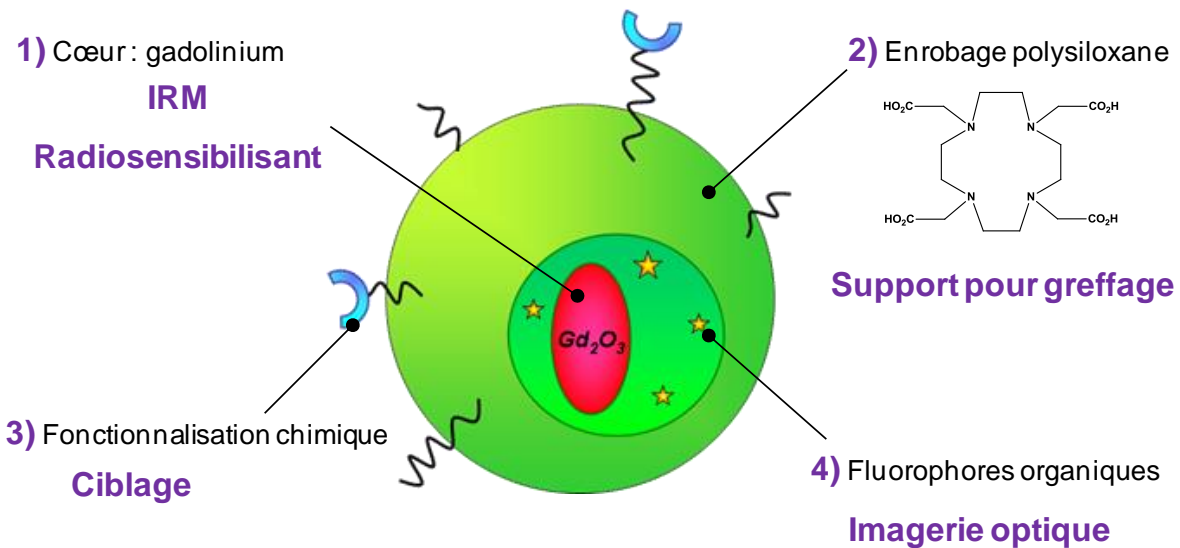


Figure 62 : Structure et caractéristiques des nanoparticules de gadolinium.

Les GBN ont une biodistribution intéressante avec une excrétion rénale rapide après une administration intraveineuse ainsi que le passage de la barrière hémato-encéphalique

(Miladi et al., 2013). Il a également été démontré que les GBN pénètrent dans les cellules par diffuse passive et macropinocytose (Miladi et al., 2014).

2. Efficacité des GBN

Les propriétés radiosensibilisantes des GBN ont été testées *in vivo* sur un modèle de rat porteur de gliosarcome murin. Une augmentation de la survie des animaux a été observée lorsque ceux-ci ont été traités avec des rayons-X d'une énergie moyenne de 90 keV, associés aux GBN (Le Duc et al., 2011). Récemment, une étude *in vivo* avec des GBN marquées avec Cy5-5 a montré qu'elles diffusaient immédiatement dans la totalité de la tumeur et persistant jusqu'à 15 min après l'injection (**Figure 63A**). De plus, une diminution du volume tumoral des cellules SQ20B (**Figure 63B**) et de la prolifération cellulaire (**Figure 63C**) ainsi qu'une augmentation de l'apoptose (**Figure 63D**) ont démontrées lorsque l'irradiation externe de 10 Gy a été combinée avec des GBN (Miladi et al., 2014). Sur des cellules de gliome U87 *in vitro*, il avait également été démontré une augmentation du nombre de cassures simple-brin (Mowat et al., 2011).

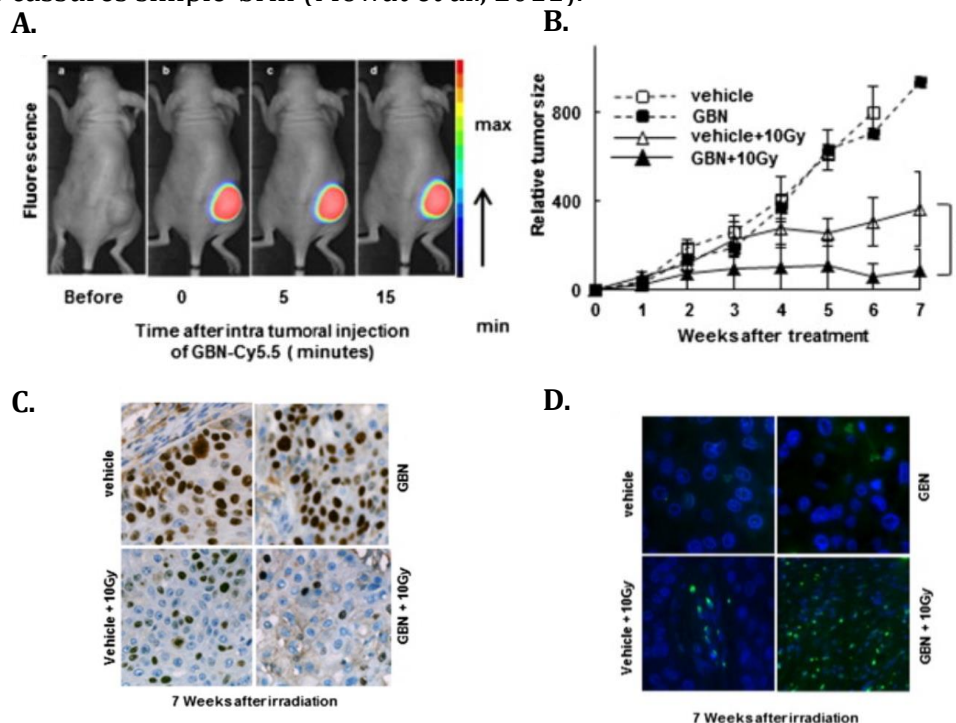


Figure 63 : Effet radiosensibilisant des GBN combinées avec irradiation externe de 10 Gy sur des souris porteuses de tumeur SQ20B. A) Image optique des tumeurs SQ20B après injection des GBN marquées avec la Cy5-5. **B)** Volume tumoral après les différents traitements. **C)** Détection de la prolifération cellulaire par marquage au Ki67 sur des tumeurs prélevées 7 semaines après traitement. **D)** Détection de l'apoptose par un marquage TUNEL. Miladi et al., 2014

III. Inhibiteurs de protéines impliquées dans la réparation

1. Les inhibiteurs de PARP

A ce jour, 17 isoforms de PARP (poly (ADP-ribose) polymérase) avec des domaines et des fonctions différentes ont été identifiées. Elles sont divisées en 5 sous-groupes, la PARP1 et 2 étant impliquées dans le maintien de l'intégrité génomique (Otto et al., 2005). Elles détectent les cassures doubles et simples brin de l'ADN et activent les systèmes de réparation. La PARP1 est une protéine nucléaire qui se lie aux extrémités des cassures grâce au zinc présent sur sa partie N-terminale. Après la liaison à l'ADN, le domaine catalytique hydrolyse NAD^+ pour synthétiser des chaînes linéaires et ramifiées de poly(ADP-ribose) et qui se lient à PARP1 et à d'autres protéines impliquées dans la réparation (**Figure 64**) (Amé et al., 2004).

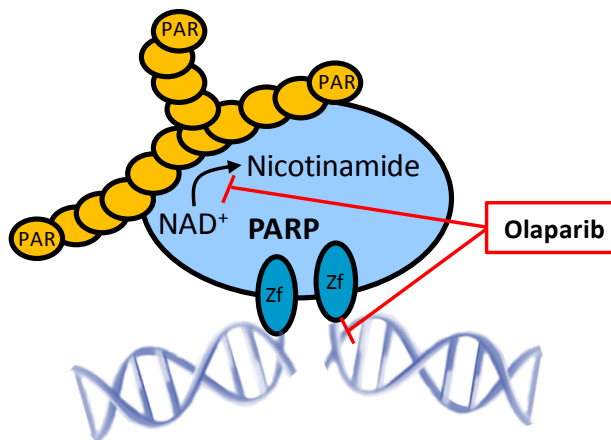


Figure 64 : Mécanisme d'action de PARP et inhibition par l'Olaparib. D'après Bixeland Hays, 2015

L'Olaparib est un inhibiteur de PARP1, PARP2 et PARP3 utilisé chez les patients BRCA1 et BRCA2 mutés dans le cancer du sein ou des ovaires (Oza et al., 2015) et il possède plusieurs modes d'action (**Figure 64**). L'Olaparib compromet la capacité des PARP à produire des chaînes PAR en entrant en compétition avec NAD^+ . L'absence des chaînes PAR entraîne une incapacité de recruter les acteurs de la réparation d'ADN. De plus ; l'Olaparib peut se lier au site actif de la PARP associé à l'ADN. Il empêche la dissociation de la PARP et

la piège sur l'ADN, bloquant ainsi le processus de réparation. Les inhibiteurs de PARP affectent donc les cellules cancéreuses en inhibant leur capacité de réparer leur génome (Bixel and Hays, 2015; Yap et al., 2011).

En association avec une radiothérapie sur un modèle de cancer du poumon, des inhibiteurs PARP ont montré une augmentation des lésions double-brins d'ADN, quantifiées par le taux d' γ H2AX. Les répercussions in vivo se sont traduites par une diminution du volume tumoral (Albert et al., 2007). Dans le cas du mélanome, les inhibiteurs de PARP ont été associés avec des agents alkylants tels que le temozolomide. La croissance tumorale des animaux traités avec le temozolomide seul était 40 fois supérieure à celle des animaux traités avec temozolomide et les inhibiteurs PARP (Toshimitsu et al., 2010).

2. Les inhibiteurs du cycle cellulaire

Les traitements anti-cancéreux (radiothérapie, chimiothérapie) agissent pour la plupart en endommageant l'ADN des cellules cancéreuses. En présence d'une cassure de l'ADN, les cellules arrêtent leur prolifération en stoppant leur cycle cellulaire, ce qui leur fournit le temps de réparer l'ADN. Inhiber les protéines de contrôle permet l'entrée en mitose de la cellule malgré la présence de lésions de l'ADN et conduit ainsi à une sensibilité aux traitements augmentée (Lord and Ashworth, 2012). Les nombreux inhibiteurs étudiés ciblent différentes protéines de contrôle à différents stades (**Figure 65**) (Aleem and Arceci, 2015).

La protéine Wee est une kinase nucléaire qui stoppe la progression du cycle cellulaire en G2/M. Les composés PD0166285 et AZD-1775 de la kinase Wee inhibent son activité et obligent la cellule à continuer son cycle cellulaire malgré des cassures double-brin d'ADN (Bridges et al., 2011), entraînant ainsi une mort cellulaire par catastrophe mitotique et une sensibilité accrue à l'irradiation. Le PD0166285 est un inhibiteur de Wee testé sur la lignée de mélanome B16. Il induit précocement la division du cycle cellulaire ainsi qu'une diminution de la transcription de la cycline D (Hashimoto et al., 2006). Plus récemment, (Vera et al., 2015) a montré sur des cellules SK-Mel 28 et SK-Mel 147 que l'association d'un inhibiteur de Wee avec la doxorubicine augmentait la quantité de cassures double-brin de l'ADN.

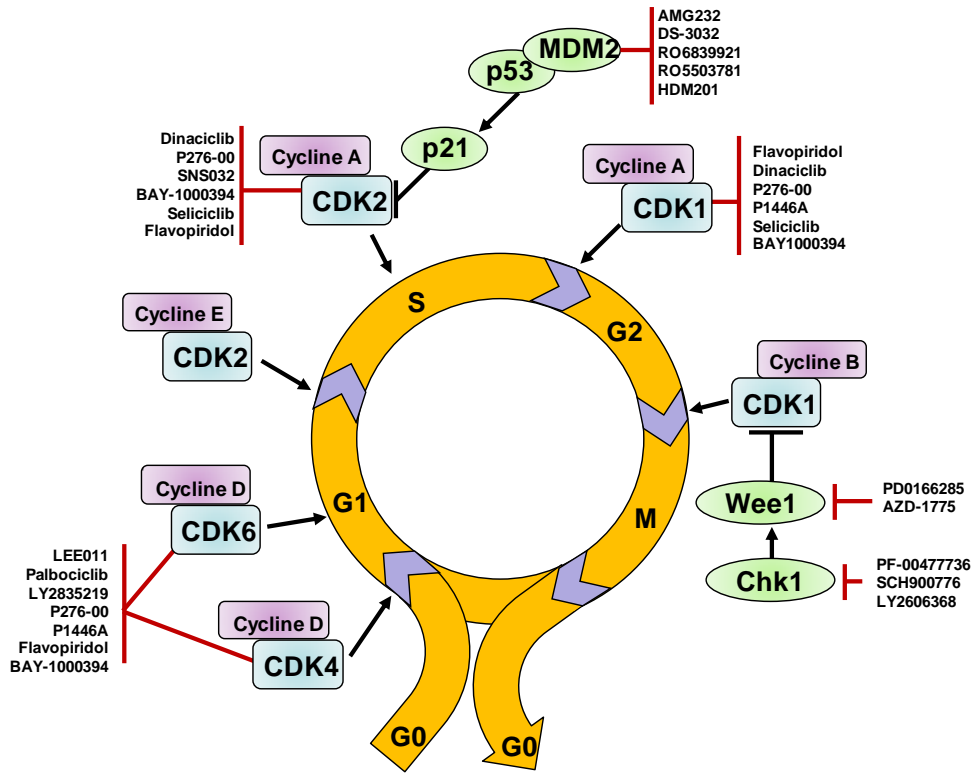


Figure 65 : Liste non exhaustive des différents composés développés et utilisés en clinique ciblant les acteurs du cycle cellulaire. D'après Allem and Arceci, 2015

Les cellules souches cancéreuses du mélanome

La résistance à la radiothérapie peut aussi être expliquée par la présence de cellules souches cancéreuses. En effet, ces cellules quiescentes et rares sont résistantes aux traitements anti-cancéreux et possèdent la capacité de régénérer l'ensemble de la population tumorale à partir d'une seule cellule. C'est pourquoi il est intéressant de connaître l'efficacité de la radiothérapie interne sur cette population spécifique.

I. Définition des cellules souches cancéreuses

En 2006, l'AACR (American Association of Cancer Research) a standardisé la définition des cellules souches cancéreuses : « Une cellule souche cancéreuse est une cellule située dans une tumeur qui possède la capacité de s'auto-renouveler et qui est capable de produire toutes les cellules qui composent une tumeur hétérogène ». D'après cette définition les propriétés essentielles des cellules souches cancéreuses (CSC) sont donc : l'auto-renouvellement et la capacité de donner naissance à une descendance qui peut croître et se différencier. Ceci implique que les CSC possèdent une nature hiérarchique. Cependant, cette théorie est opposée au modèle stochastique, où toutes les cellules tumorales sont équivalentes et sont capables de produire une tumeur hétérogène (Clarke et al., 2006).

II. Modèles pour le développement et la croissance tumorale

Les tumeurs sont hétérogènes, subissent une prolifération incontrôlée et présentent des propriétés d'auto-renouvellement. Deux grands modèles proposent une théorie sur la croissance et le développement tumoral (**Figure 66**).

Dans le modèle stochastique, toutes les cellules tumorales sont équivalentes, leurs destins sont régis par des signaux intrinsèques ainsi que des facteurs environnementaux.

Non seulement tous les descendants de ces cellules tumorales sont capables de se comporter comme des CSC, mais ils conservent également une certaine plasticité.

Dans le modèle hiérarchique, les CSC sont biologiquement distinctes, peuvent se renouveler, et donner lieu à diverses cellules filles qui n'ont pas de capacité d'auto-renouvellement. Dans ce modèle, le phénotype des CSC est une caractéristique stable.

Le modèle hiérarchique est souvent considéré comme le « modèle de cellules souches cancéreuses » pour la propagation de la tumeur, alors que le modèle stochastique suppose l'existence de nombreuses cellules qui peuvent agir comme des CSC. De plus, le modèle stochastique ne prend pas en compte certaines caractéristiques étroitement liées aux CSC, telles que la rareté et la quiescence. Cette dernière faculté permet aux cellules souches cancéreuses de résister à des traitements anticancéreux classiques, pouvant conduire à une récurrence après une réponse initiale aux traitements.

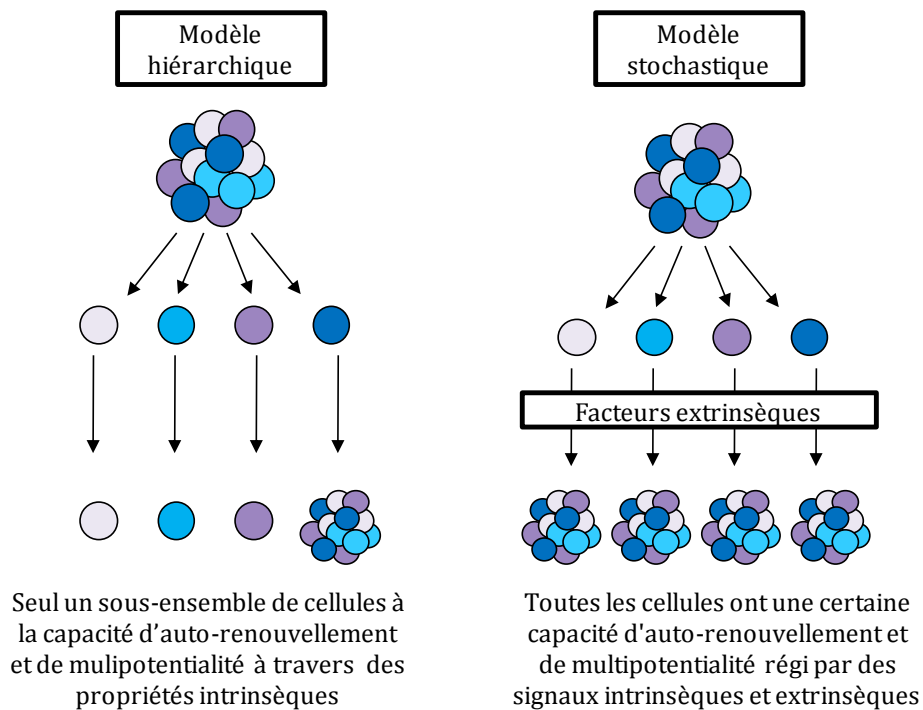


Figure 66 : Deux modèles de progression tumorale. Dans le modèle hiérarchique, il existe un sous-ensemble de cellules qui sont capables de s'auto-renouveler et de donner naissance à des cellules filles. Cette qualité est unidirectionnelle, et si cette population est épuisée, le tissu sera incapable de se reconstituer. Dans le modèle stochastique, toutes les cellules sont capables de se comporter comme une cellule souche en termes d'auto-renouvellement et de multipotence. Les facteurs extrinsèques, comme les protéines extracellulaires ou les facteurs de croissance, régulent les cellules en termes d'entretien, de différenciation ou de mort cellulaire. *Lang et al., 2013*

d'intérêt sur un modèle de souris immunodéficientes. Ce procédé révélera si les cellules transplantées possèdent à la fois la capacité de s'auto-renouveler et de générer une descendance *in vivo* (Lang et al., 2013).

III. Marqueurs de CSC de mélanome

Un des principaux objectifs de la recherche sur les cellules souches de mélanome est l'identification de marqueurs spécifiques de cette population. Un grand nombre des marqueurs identifiés ont l'avantage d'être des protéines de surface, permettant ainsi de séparer les cellules au cytomètre de flux après un marquage avec un anticorps fluorescent. Chaque type de cancer possède ses propres marqueurs spécifiques, ainsi pour un cancer des poumons, le marqueur CD177 est caractéristique des CSC tandis que CD44 a été identifié dans le cancer colorectal. Dans le cas du mélanome, les principaux marqueurs identifiés sont : CD20, CD133, CD271 et les transporteurs ABCG2 et ABCB5.

1. CD20

Le marqueur membranaire CD20, normalement retrouvé sur les lymphocytes B, a été associé à des CSC de mélanome. Ces cellules CD20+ présentent les caractéristiques décrites par l'AACR, à savoir la multipotentialité et l'auto-renouvellement. Une étude menée sur des sphéroïdes enrichis avec des cellules CD20+ a montré un degré plus élevé de multipotentialité en comparaison avec une population CD20- (Lang et al., 2013).

Actuellement, des traitements anti-CD20 sont utilisés pour cibler spécifiquement les CSC. Le rituximab est un anticorps anti-CD20 qui a été utilisé avec succès dans le traitement des lymphomes. Le rituximab a également été testé chez 9 patients présentant des exérèses de mélanome avec des taux importants de récurrence. Chez 5 patients sur 9, aucune tumeur ne s'est développée dans les 42 mois suivant le traitement (Pinc et al., 2012).

2. CD133

Le marqueur CD133 est une glycoprotéine transmembranaire également connu sous le nom de Prominin-1. Elle est normalement exprimée sur les cellules non différenciées telles que les cellules progénitrices ou les cellules souches hématopoïétiques. Dans des biopsies de mélanome humain, CD133 est exprimé dans 17% des naevus, 39% dans les mélanomes primaires et 46% dans les mélanomes métastatiques (Klein et al., 2006).

Une étude a montré que les cellules CD133+ et CD133- étaient toutes deux capables d'initier des tumeurs (Quintana et al., 2008). Une étude contradictoire a montré que seules les cellules CD133+ ont induit une tumeur, à l'inverse des CD133- (Monzani et al., 2007). En revanche, l'expression de CD133 a été reliée à une progression de la maladie, tandis que l'inhibition de ce marqueur conduisait à une diminution de la croissance des cellules tumorales (Rappa et al., 2008).

3. Les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC (transporteurs à l'ATP Binding Cassette) forment un ensemble de protéines transmembranaires. Leur rôle est de transporter divers substrats à travers la membrane cytoplasmique en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Les protéines de transport ABCG2 et ABCB5 sont connues dans la résistance aux traitements anti-cancéreux et ont été identifiées dans les CSC de mélanome (Schatton et al., 2008).

Le transporteur ABCG2 est impliqué dans la résistance à une grande variété de médicaments, d'antibiotiques et d'inhibiteurs. Dans la lignée WM115, ABCG2 est coexprimé avec le marqueur CD133 (Monzani et al., 2007). A l'heure actuelle, les données sont trop préliminaires pour lier fortement ABCG2 aux cellules souches de mélanome.

ABCB5 a été détecté dans des mélanocytes primaires, des cellules de mélanome en culture, des tissus de mélanome humain (Schatton et al., 2008). De plus, ABCB5 a été observé dans des cellules de mélanome indifférenciées et non pigmentées. Son expression est corrélée avec la progression du mélanome. Lors d'une transplantation à des souris

NOD/SCID, la population ABCB5+ a été en mesure d'induire des tumeurs et de recréer l'hétérogénéité cellulaire caractéristique du mélanome. Par ailleurs, l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre ABCB5 a permis d'inhiber la croissance tumorale de mélanome implanté à des souris Nude (Schatten et al., 2008). De plus, une équipe a identifié ce marqueur sur des cellules tumorales circulantes (CTC) (Ma et al., 2010). Leur transplantation à des souris NOD/SCID/IL2-/- a montré que les cellules tumorales circulantes ABCB5+ ont généré des métastases, démontrant ainsi que les CTC ont un potentiel tumorigène et une capacité invasive (Ma et al., 2010).

4. CD271

S'appuyant sur le concept que les CSC de mélanome présentent les caractéristiques des cellules souches de la crête neurale, le récepteur membranaire CD271 a récemment été identifié comme un marqueur de mélanome. CD271, appelé également p75^{NTR}, est le récepteur du facteur de croissance neuronal (NGFR, Nerve Growth Factor Receptor). Les cellules CD271+ ont montré une capacité d'initiation de la tumeur plus élevée que les cellules CD271-, et, en plus, ont donné lieu à des métastases lors de la transplantation sur un modèle murin (Civenni et al., 2011; Shakhova and Sommer, 2013). Une autre étude (Redmer et al., 2014) a montré que des cellules de mélanome transfectées avec des shRNA ciblant CD271 perdaient leur capacité tumorigénique. Les cellules CD271+ surexpriment les gènes caractéristiques des cellules souches : OCT4 et NANOG (Cheli et al., 2014).

IV. Traitement ciblant les cellules souches cancéreuses

Les thérapies anticancéreuses conventionnelles ciblent principalement la masse tumorale et la sous-population des CSC avec des propriétés différentes représente un pool de cellules résistantes. Par conséquent, un traitement conventionnel combiné avec un ciblage thérapeutique spécifique des CSC pourrait améliorer le contrôle de la croissance tumorale et diminuer le risque de récurrence.

Ces approches thérapeutiques pourraient avoir différentes conséquences sur les CSC : bloquer l'auto-renouvellement, induire une réponse immunitaire anti-CSC, inverser la résistance aux médicaments ou perdre le statut CSC (**Figure 67**) (Murphy et al., 2014).

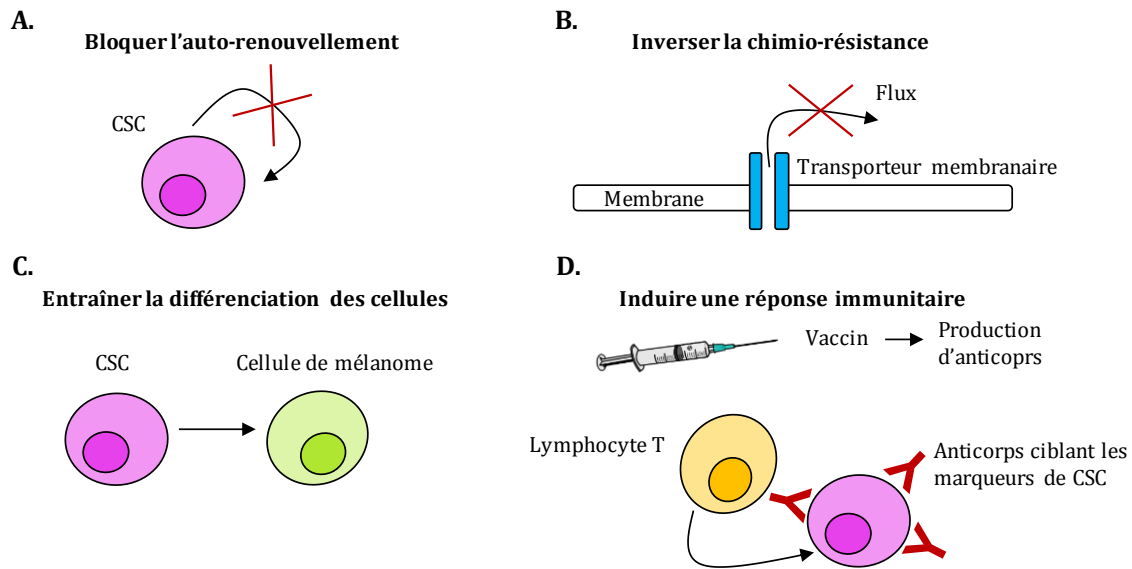


Figure 67 : Stratégies potentielles pour cibler les CSC. A) Cibler la voie d'auto-renouvellement pour supprimer la réplication des CSC. B) Bloquer les transporteurs (ABCB5) et combiner avec une chimiothérapie standard pour sensibiliser les CSC au traitement. C) Initier la différenciation des CSC en cellules « classiques » qui serait ensuite soumise à une chimiothérapie. D) Utiliser les antigènes spécifiques des CSC pour développer des vaccins et améliorer la réponse. *D'après Murphy et al., 2014*

Une cible moléculaire clé est ABCB5 car il est non seulement un biomarqueur des CSC mais il est également à l'origine de chimiorésistance. Des anticorps monoclonaux ciblant ABCB5 ont déjà été utilisés comme thérapie potentielle (Frank et al., 2005; Schatton et al., 2008) et ont montré une diminution de la résistance des cellules de mélanome à la doxorubicine. Ils ont ainsi démontré que le ciblage d'ABCB5 peut avoir un effet additif sur la sensibilité à une chimiothérapie. En utilisant les capacités des LT pour identifier et détruire les cellules CD20+, (Schmidt et al., 2011) a éradiqué des mélanomes humaines xéno greffés.

Objectifs de thèse

Le mélanome cutané est le cancer de la peau le plus agressif en raison de sa forte capacité de dissémination. Une fois métastasé, les options thérapeutiques restent encore insuffisantes. Malgré d'importants progrès dans la prise en charge thérapeutique du mélanome métastasé, la recherche de nouvelles stratégies se poursuit pour les patients non éligibles à la chimiothérapie ciblée ou non répondeurs aux thérapies actuelles. La pigmentation du mélanome métastasé est une caractéristique retrouvée dans 90% des cas de lésions primitives et environ 50% des métastases. Le laboratoire UMR990 travaille sur une stratégie de radiothérapie interne vectorisée (RIV) utilisant des ligands ciblant spécifiquement et durablement la mélanine (ICF01012). Cette molécule théranostique est marquée avec différents isotopes radioactifs pour une utilisation en imagerie (Iode 123) ou en radiothérapie (Iode 131). Des études ont précédemment montré qu'[¹³¹I]ICF01012 induisait une inhibition significative de la croissance tumorale de tumeurs murines et de xéno greffes humaines, associée à un allongement de la médiane de survie des animaux. Cependant, ce traitement est moins performant sur les modèles de xéno greffes (Bonnet et al., 2010) que sur les modèles B16 (Bonnet-Duquennoy et al., 2009). Les objectifs de la thèse ont eu pour but i) de réaliser des études de dosimétrie dans un modèle de mélanome humain ii) d'approfondir les mécanismes de réponse à la RIV dans les modèles murins et humains iii) de potentialiser l'effet de cette stratégie par la co-injection de molécules servant de leurres pour le système de réparation de l'ADN (coDbait) ou de nanoparticules à base de gadolinium, atome lourd dont les électrons périphériques peuvent, après irradiation, augmenter les lésions oxydatives.

Matériels et Méthodes

I. Lignées cellulaires

Les différentes lignées de mélanome utilisées possèdent des conditions de culture, des origines et des caractéristiques différentes (**Tableau 8**). Le milieu est supplémenté avec 4 µg/µl de gentamycine quelle que soit la lignée. Les cellules sont incubées à 37° dans une étuve à atmosphère humide et 5% de CO₂.

Lignées de mélanome	Origine	Provenance	Milieu de culture	Quantité de SVF	Pression de sélection
B16Bl6	Mélanome pigmenté métastasant dérivant de la lignée B16F0	Dr. Fidler (Texas, USA)	DMEM	10 %	
B16Bl6-Luc		Transfection réalisée par le laboratoire	DMEM	10 %	500 µg/ml de Zéocine
B16F0	Mélanome spontané retrouvé chez la souris C57Bl6	ATCC	DMEM	10 %	
SK-Mel 3	Mélanome humain pigmenté dérivé d'une métastase de ganglion lymphatique	ATCC	McCoy's 5A	15 %	
SK-Mel 28	Mélanome humain amélanique	ATCC	MEM	10 %	
M2Gen	Mélanome humain très mélanique issu d'un épanchement pleural	Dr. Berthier Inserm Lyon (Laboratoire DORE)	McCoy's 5A	10 %	
M4Beu	Métastase ganglionnaire humaine obtenue en 1975 par curetage ganglionnaire à partir d'un mélanome foudroyant	Dr. Doré Inserm U218 Lyon	DMEM	10 %	

Tableau 8 : Conditions de culture et caractéristiques des différentes lignées de mélanome. ATCC : American Type Collection (Biovalley, Marnes la Vallée), DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), McCoy's 5A (Invitrogen), MEM : Minimum Essential Media (Invitrogen).

1. Culture en sphéroïde

Les sphéroïdes sont cultivés dans le milieu de culture adapté supplémenté avec 0,5% de méthylcellulose (MC). Afin de bien homogénéiser le milieu + MC, les aliquots sont placés sous agitation une nuit à 4°C. Le milieu + MC est versé dans un puits de prélèvement stérile puis le volume de suspension cellulaire nécessaire est ajouté pour avoir une concentration de 10 000 cellules/ml. A l'aide d'une pipette multicanaux, 100 µl de cette solution sont distribués dans une plaque 96 puits à fond conique stérile et non traitée pour la culture. Le contour de la plaque est complété avec du PBS. Les sphéroïdes sont ensuite incubés à 37° dans une étuve à atmosphère humide et 5% de CO₂.

2. Invasion et migration

L'invasion est évaluée par le passage de cellules à travers une matrice de matrigel (BDpharmigen, Dutscher), tandis que la migration se traduit par le déplacement des cellules d'une chambre à l'autre. La veille du dépôt des cellules, les inserts (0,8 µm, Greiner Bio-One, Dutscher) doivent être coatés avec 50 µl de matrigel 1/100 dilué dans de l'Optimen (Invitrogen) sans Ca²⁺. Le matrigel doit être réparti au fond de l'insert uniformément et sans bulle. Les cellules sont préparées dans de l'Optimen + Ca²⁺, à une concentration qui varie en fonction du type cellulaire (100 000 Cellules/500 µl/insert pour les B16Bl6 par exemple). Les inserts sont plongés dans 750 µl de milieu classique puis placés à l'étuve (24 heures pour les B16Bl6).

Après la période d'incubation, l'intérieur des inserts est gratté avec un coton tige et plongé dans de l'éthanol 100 % pour fixer les cellules. Une fois sec, le fond des inserts est découpé et monté sur lame avec du Vectashield-DAPI (**Figure 68**) (Fluoroshield, Sigma-Aldrich). Les cellules sont visibles par fluorescence et sont comptées avec le logiciel : NIS-Analysis (Nikon, Lisse, France).

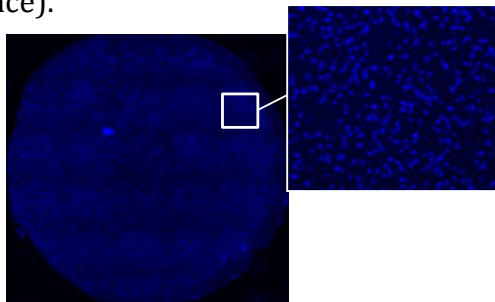


Figure 68 : Visualisation par fluorescence DAPI des cellules B16Bl6.

3. Colony Forming

La radiotoxicité *in vitro* est déterminée à l'aide d'un test d'efficacité de clonage (Colony Forming) permettant de mesurer la capacité de survie d'une cellule isolée après traitement. Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits à raison de 200 cellules B16Bl6/2 ml/puits afin d'obtenir des cellules isolées. Les plaques sont placées 16 heures à l'étuve avant le début du traitement. Le milieu contenant [¹³¹I]ICF01012 est ajouté pendant 24 heures. Après cette période d'incubation, le traitement est stoppé et les cellules sont laissées en culture, le temps que les colonies se développent (environ 10 divisions). Après fixation à l'éthanol 100%, les cellules sont colorées par une solution de cristal violet (0,2% dans H₂O) permettant ainsi de dénombrer les colonies comportant plus de 50 cellules. La survie cellulaire est calculée selon la relation suivante :

$$\% \text{ survie} = 100 \times (\text{nbr de colonies traitées} / \text{nbr de colonies contrôles})$$

4. Transfection avec le vecteur Luc ou ShRNA

a. Tester la sensibilité des cellules à l'antibiotique

Avant de commencer une transfection, il est nécessaire de connaître la sensibilité des cellules à l'antibiotique de sélection. Les cellules sont doncensemencées en plaque 6 puits (200 000 cellules/puits) pendant 24h puis incubées avec différentes concentrations d'antibiotique (**Tableau 9**). Afin de bloquer les transporteurs membranaires qui éjectent l'antibiotique hors du cytoplasme, il peut être utile de placer les plaques 3 heures au frigo avant de les mettre à l'étuve.

Lignées et ADN transfecté	Antibiotique	Concentration	Provenance de l'ADN transfecté
B16Bl6 et Luc	Zéocine	2 000 µg/ml	InvivoGen, Lab. Dr. Eschaliér
B16Bl6 et ShTyrosinase	Puromycine	5 µg/ml	OriGen, Cliniscience
SK-Mel 3 et ShTyrosinase	Puromycine	0,5 µg/ml	OriGen, Cliniscience

Tableau 9 : Concentration des différents antibiotiques nécessaires pour la sélection des cellules transfectées.

b. Transfection et sélection des cellules avec le vecteur d'intérêt

Le kit JET PRIME (Polyplus) permet d'incorporer l'ADN dans des micelles qui pénètrent ensuite dans les cellules. Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits et la solution (2 µg d'ADN de vecteur + 200 µl de tampon commercial + 2 µl de JET PRIME) est répartie par petites gouttes sur le tapis cellulaire. Les cellules sont remises 24 heures à l'étuve avant de subir la pression de sélection. Le milieu contenant l'agent de transfection est ôté et remplacé par le milieu contenant l'antibiotique. Les cellules mortes qui n'ont pas intégrées le vecteur sont enlevées régulièrement, la pression de sélection peut également être diminuée au fur et à mesure jusqu'à l'obtention d'îlots de cellules ayant intégrées le vecteur. Les cellules finales obtenues sont cultivées de façon « classique », la pression de sélection est maintenue dans les premiers temps puis enlevée après quelques passages.

5. Traitement pour la dépigmentation

Le N-phenylthiourée (PTU) est une molécule qui entre en compétition avec la tyrosine dans le site catalytique de la tyrosinase. Les cellules traitées avec le PTU présentent une forte diminution de la quantité de mélanine. La solution de mère de PTU est préparée dans du DMSO 100 % à une concentration de 15 mg/ml. Cette dernière est ensuite diluée au 1/1000 dans le milieu de culture cellulaire. Quatre divisions cellulaires sont nécessaires pour obtenir des cellules amélaniques.

II. Cellules souches

1. Mise en évidence des marqueurs de cellules souches

Sur la lignée de mélanome SK-Mel 28, les antigènes CD133 et CD271 sont mis en évidence par la fixation d'un anticorps spécifique marqué avec un fluorophore. Les anticorps suivants ont été commandés (Miltenyi Biotec, Paris) : CD133/1(AC133)-APC, human (ref 130-090-826) et CD271(LNGFR)-VioBright FITC, human (ref 130-104-847). Afin de faire des contrôles négatifs, des anticorps marqués FITC ou APC ont été également utilisés : Mouse IgG1-APC (ref 130-092-214) et Mouse IgG1- VioBright FITC (ref 130-104-513).

Les cellules SK-Mel 28 cultivées en 2D sont récupérées avec du « Cell dissociation buffer-Enzyme Free-Hanks'based » (Gibco). Il est important de ne pas utiliser de trypsine, car cette solution est agressive et détruit les marqueurs membranaires. Lors de culture en 3D, les sphéroïdes sont poolés, centrifugés et le surnageant est éliminé. Les cellules sont ensuite dissociées dans de la collagénase 0,2% diluée dans du PBS pendant 30 min à 37°C.

Après dissociation, les cellules sont centrifugées et remises en suspension dans 20 µl de PBS (pour 2 millions maximum de cellules). On ajoute alors 2 µl d'anticorps ou de marqueur de mort cellulaire (Iodure de propidium (Sigma) ou 7-AAD (Tonbo Biosciences, Clinisciences) et on incube 10 min dans le noir à 4°C. Plusieurs marquages peuvent être réalisés sur le même échantillon à condition que les fluorophores n'émettent pas dans la même longueur d'onde. Les cellules sont ensuite lavées dans 2 ml de PBS, centrifugées et remises en suspension dans un volume adéquat pour l'analyse en cytomètre de flux.

2. Irradiation externe et évaluation de la radiosensibilité par colony forming

Les flasques de cellules cultivées en 2D sont entièrement remplies de milieu de culture, les plaques 96 puits de sphéroïdes sont complétées avec 100 µl de milieu + MC. Les flasques et plaques sont traitées avec une irradiation à 2,5 Gy. Le supplément de milieu des flasques est enlevé et les cellules sont remises à l'étuve pendant 4 heures.

Les cellules souches sont marquées selon la méthode décrite précédemment puis triées au cytomètre de flux en plaque 6 puits (1200 cellules/2ml/puits) pour faire un test de colony forming. Les cellules sont divisées en 4 groupes (n=3/groupe) : cellules totales, cellules CD133+, cellules CD271+ et cellules CD133-/CD172-. Après 10 jours à l'étuve 37°C, les cellules sont fixées à l'éthanol puis colorées au cristal violet.

III. Animaux

Les xénogreffes de mélanomes humains sont réalisées sur des souris Swiss Nude âgées de 6 semaines. Ces souris sont choisies en raison de leur statut immunitaire (déplétion en lymphocytes T), qui permet la croissance des cellules tumorales humaines. Pour le modèle syngénique, des souris C57BL/6J sont utilisées. Les animaux proviennent de Charles River Laboratories (L'abresle, France) ou de Janvier (Le Genest St Isle, France).

Les animaux sont élevés dans des conditions standards avec un cycle diurne/nocturne de 12 heures, une température constante de 21°C et un accès libre à l'eau et la nourriture. Les souris traitées avec [¹³¹I]ICF01012 sont hébergées dans un confinement plombé et en cage individuelle afin d'éviter les irradiations croisées. Toutes les manipulations sont effectuées en conformité avec les recommandations du guide pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire. Les protocoles ont été validés par les instances locales (C2E2A) et le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche.

1. Inoculation des cellules aux animaux

Les cellules sont préparées afin de pouvoir être inoculées aux animaux. Après rinçage du tapis cellulaire au PBS, les cellules sont trypsinées, comptées en cellule de Malassez puis centrifugées pendant 8 minutes à 461 g à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans du PBS à la concentration souhaitée.

a. En sous-cutanée

Les animaux sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane. Le flanc droit est rasé et les cellules sont injectées en sous-cutanée (100 µl/souris) à raison de 5×10^6 , 4×10^6 , 3×10^6 , pour les cellules SK-Mel 3, M2Gen et M4Beu respectivement et 3×10^5 pour les cellules B16. Les animaux sont identifiés par un marquage à l'oreille et répartis de façon à obtenir des groupes homogènes.

b. En intraveineuse

Les animaux sont placés 10 min sous une lampe chauffante afin de dilater les veines. Ils sont ensuite placés dans une boîte de contention et les cellules sont injectées dans la veine caudale à raison de 150 000 cellules B16/200 µl de PBS.

2. Techniques d'imagerie *in vivo*

a. Imagerie scintigraphique plane

Le radiotracer ICF01012 est marqué à l'iode 123 (émetteur γ , demi-vie : 13,2 heures). La solution (100 µl) est injectée en intraveineuse avec une activité radioactive d'environ 3,7 MBq.

Les souris sont anesthésiées par une injection intra-péritonéale (200 µl/animaux) avec un mélange 4 :1 de kétamine (Imalgène 500® ; Rhône mérieux, Lyon, France) et de xylazine (Rompun® 2% ; Bayer, France), et sont soumises à trois séries d'acquisitions scintigraphiques à 3, 20 et 44 heures après l'injection du radiotracer. L'imagerie est réalisée au moyen d'une gamma-caméra dédiée au petit animal (γ -IMAGER®, Biospace Mesures, Paris, France) et l'acquisition est enregistrée avec le logiciel γ -acquisition. Les animaux sont placés en décubitus ventral sur le collimateur de la gamm-caméra et la durée de l'acquisition est de 10 minutes, avec une fenêtre d'énergie réglée sur le pic photoélectrique de l'iode 123 (160 Kev \pm 15%). Après acquisition, une analyse semi-quantitative des images est réalisée au moyen du logiciel Gamma Vision +.

b. Imagerie optique

Les cellules transfectées avec vecteur codant pour la luciférase peuvent être détectées par imagerie. La luciférase est une enzyme qui oxyde la luciférine en oxyluciférine. Cette réaction émet un photon qui peut être détectée par une caméra optique spécifique (IVIS Spectrum, PerkinElmer).

La solution de luciférine est préparée dans du PBS stérile à une concentration de 25 mg/ml. Les animaux sont rasés, endormis par inhalation d'isoflurane et injectés avec 150 µl

de luciférine en intra-péritonéale. Après 5 min de diffusion du produit les animaux sont placés un par un sous le masque de l'IVIS Spectrum. Les durées d'acquisitions se font automatiquement par l'appareil. Lors de la détection de métastase, les tumeurs primitives sont « cachées » par du tissu occultant. La quantification des images se fait en radiance.

3. Traitements et radiosensibilisation du mélanome

a. Radiothérapie vectorisée avec [¹³¹I]ICF01012

Le vecteur ICF01012 est marqué à l'iode 131 avec une haute activité spécifique selon la méthode publiée (Chezal et al., 2008).

Après différents temps de pousse tumorale (**Tableau 10**), la molécule [¹³¹I]ICF01012 est injectée en intraveineuse sur animal vigile à raison de 25 MBq/200 µl/animaux. L'activité radioactive par injection est de 18,75 MBq pour le modèle syngénique et 25 MBq pour les modèles de xénogreffes. Pour les lignées humaines, cette injection est réalisée 3 fois à une semaine d'intervalle.

Lignées de mélanome	Jours de traitement post-inoculation cellulaire	Moyenne du volume tumoral (mm ³)
SK-Mel 3	35	155 ± 15
M2Gen	85	239 ± 124
M4Beu	17	54 ± 41
B16Bl6	10	56 ± 7

Tableau 10 : Jours et moyenne des volumes tumoraux lors de la première injection avec [¹³¹I]ICF01012.

b. Injection de coDbait et de nanoparticules de gadolinium

Le coDbait est fourni par les laboratoires du Dr. M. Dutreix (UMR 1021, CNRS, Institut Curie) et du Pr. JS. Sun (DNA Therapeutics). La solution de coDbait est préparée dans du Glucose à 5% et la première injection (100 µl) est réalisée 5 heures avant la radiothérapie. Les animaux porteurs de tumeurs B16Bl6 reçoivent 4 injections supplémentaires de coDbait à 1, 4, 6 et 8 jours après la radiothérapie (2 mg par injection,

total de 10 mg injecté). Pour le modèle SK-Mel 3, les animaux reçoivent 2 injections supplémentaire à 24 et 48 heures suivant chaque injection de radiothérapie (1 mg par injection, total de 9 mg injecté) (**Figure 69**). Les animaux témoins reçoivent dans les mêmes conditions l'excipient, soit une solution stérile de glucose 5%.

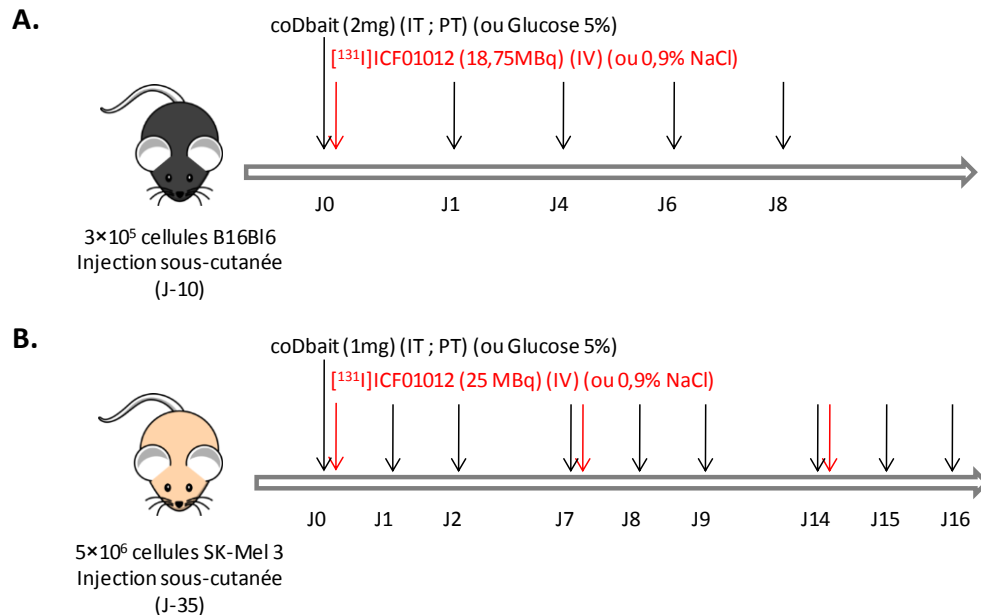


Figure 69 : Protocole de l'étude associant [131I]ICF01012 avec le coDbait sur le modèle murin B16Bl6 (A) ou le modèle de xénogreffe SK-Mel 3 (B).

Les nanoparticules de gadolinium sont fournies par le Dr. Tillement (ILM UMR5306, Université Lyon 1). La solution de nanoparticule est diluée une première fois à 200 mM dans de l'eau MilliQ puis une seconde fois à 40 mM dans du PBS. Les GBN sont injectées en intratumoral, 50 µl de la solution à 40 mM, immédiatement après l'injection d'[131I]ICF01012. Les injections se répètent les 4 jours suivants la radiothérapie (**Figure 70**). Les animaux contrôles reçoivent l'excipient dans les mêmes conditions.

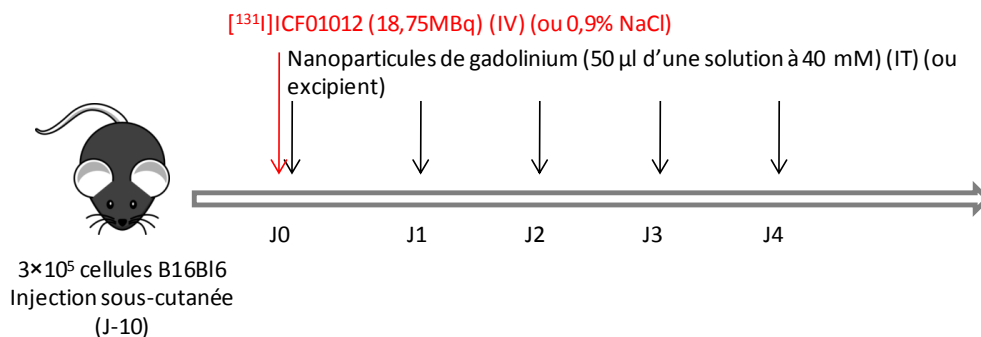


Figure 70 : Protocole de l'étude associant [131I]ICF01012 avec les nanoparticules de gadolinium sur le modèle murin B16Bl6.

4. Contrôle des différents paramètres et prélèvements

a. Suivi de la croissance et prélèvement tumoral

Afin de déterminer l'influence du traitement sur la croissance tumorale, les tumeurs sont mesurées régulièrement : trois fois par semaine pour les modèles de mélanome humain et tous les jours pour le modèle syngénique. Les deux dimensions, longueur (L en mm) et largeur (l en mm) sont relevées au moyen d'un pied à coulisse permettant ainsi d'évaluer le volume tumoral (V en mm³) :

$$V = (L \times l^2)/2$$

Pour des raisons éthiques, les animaux sont sacrifiés lorsque le volume tumoral atteint 2000 mm³. Les tumeurs sont alors prélevées, pesées et scindées en deux morceaux. Le premier est plongé dans de l'azote liquide à -180°C puis conservé à -80°C afin d'étudier l'expression de différentes protéines, l'autre est conservé dans de l'alcool formolé acétique (AFA) dans le but de réaliser une étude anatomopathologique ainsi que des marquages en immunofluorescence/histochimie.

b. Evaluation du nombre de métastase

Le modèle B16Bl6 a la particularité de métastaser à partir de la tumeur primitive pour former des colonies pulmonaires (Poste et al., 1980). Afin d'augmenter la dissémination des cellules, des injections intratumorales de PBS (50 µl) peuvent être réalisées à intervalle régulier lorsque la tumeur est visible (par exemple : J11, J13 et J15).

Lors du sacrifice des animaux porteurs de tumeur B16Bl6, les poumons sont prélevés, pesés et le nombre de métastase pulmonaire est compté sous loupe binoculaire (**Figure 71**). Les poumons sont ensuite plongés dans l'AFA.



Figure 71 : Photographie de poumon envahi par des métastases spontanées de cellules B16Bl6-Luc.

Lors d'une injection des cellules B16Bl6 en i.v., il est parfois difficile de déterminer le nombre de métastase. Dans ce cas là, le poids des poumons sert de critère d'évaluation de l'envahissement.

c. Prélèvement de sang et quantification de la luciférase par PCR

La détection de cellules circulantes est un aspect important dans l'évaluation de la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme. Les cellules B16Bl6-Luc sont porteuses du gène codant pour la luciférase, cette dernière n'existe pas à l'état sauvage dans l'organisme des animaux. Sa présence dans le sang des animaux est donc le témoignage de la dissémination des cellules de la tumeur primitive dans le sang.

Prélèvements sanguins :

Les animaux sont placés 10 minutes sous la lampe chauffante afin de dilater les veines. Ils sont ensuite placés dans une boîte à contention et piqués au niveau de la veine caudale avec une seringue héparinée dont le piston a été retiré. Le sang, environ 10 µl, va monter dans la tête de la seringue et sera récupéré pour réaliser la PCR.

Préparation des échantillons de sang :

Ajouter 200 µl de tampon de Lyse (0,32 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100) dans chaque tube, vortexer pour remettre en suspension et centrifuger 30 secondes à 16 000 g pour obtenir un culot. Enlever le surnageant et répéter les premières étapes 2 fois ou plus, jusqu'à l'élimination de l'hémoglobuline. Resuspendre le culot dans 100 µl de PBNB (PCR Buffer with Nonionic Detergents) (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml gelatin, 0,45 % Nonidet P40, 0,45% Tween 20, conserver à -20°) et 60 µg/ml de protéinase K. Incuber à 55°C pendant 60 min. Chauffer les échantillons à 97°C pendant 10 minutes pour inactiver la protéinase K.

Préparation des échantillons pour la PCR :

- 10 µl de mix KAPA
- 0,4 µl de PRIMER forward (d'une solution à 10 µM)
- 0,4 µl de PRIMER reversed (d'une solution à 10 µM)
- 8,2 µl d'eau MilliQ

Ajouter à la fin et en dehors de la pièce de préparation pour éviter des contaminations éventuelles : 1 µl d'échantillon.

IV. Analyses moléculaires

1. Analyse de l'expression des protéines

a. Préparation des lysats tumoraux

Les fragments de tumeur (10 mg) sont broyés sans décongélation dans 300 µl de tampon de lyse Urée (6 M Urée, 5 mM NaF, 2,5 mM pyruvate de sodium, 1 mM EDTA, 1 mM Orthovanadate de Na, 0,5% Triton X-100, 1X d'anti-protéase) au moyen d'un broyeur GentleMACS Dissociator (MACS ; Miltenyi Biotech). Les cellules sont traitées avec du tampon RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% sodium desoxycholate, 0,1% SDS, 1 mM Orthovanadate de Na, 1X d'anti-protéase, 1 mM NaF). Les lysats sont ensuite centrifugés à 14 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants contenant les protéines solubles sont recueillis et conservés à -20°C.

b. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé suivant la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Un étalon d'Albumine de Sérum de Bœuf (BSA, Sigma-Aldrich) est dilué dans de l'eau milliQ pour obtenir une gamme allant de 5 à 80 µg/ml. Les échantillons sont dilués dans de l'eau milliQ (1/150) et déposés en duplicata en plaque 96 puits (50 µl/puits). Le réactif Bleu de Coomassie (Interchim) (150 µl) est ajouté. L'absorbance est mesurée à 595 nm sur un spectrophotomètre. La concentration en protéine est déterminée en µg/ml par rapport à la gamme étalon.

c. Dosage du VEGF par la technique ELISA

La technique « Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay » (ELISA) est une technique biochimique utilisée pour détecter et/ou doser la présence d'une protéine dans un échantillon.

Le kit ELISA VEGF utilisé (Raybio®) est composé d'une plaque 96 puits où l'anticorps de capture anti-VEGF est déjà fixé. Les échantillons à tester ainsi que la gamme étalon sont déposés et incubés une nuit à 4°C sous agitation. Après lavage, l'anticorps de

détection, couplé à la biotine, est rajouté pendant 1 heure sous agitation. Un deuxième lavage est réalisé et l'enzyme HRP (Horseradish peroxidase) couplée à la streptavidine est ajoutée pendant 45 minutes. Son substrat TMB (Tetramethylbenzidine) est incubé pendant 20 minutes à l'abri de la lumière. Après ajout de la solution stop, la lecture se fait à 450 nm. La concentration en VEGF est exprimée en pg de VEGF/mg de protéines totales dans les échantillons.

d. Détection de l'expression des protéines par Western Blot

Pour réaliser les analyses en western blot, 30 à 50 µg de protéines préparées dans un tampon Laemmli + β-mercapto sont déposées sur des gels de polyacrylamide 4-15% (BioRad). Les protéines migrent à 20 mA/gels pendant environ 1 heure. Après la migration des protéines, le transfert est réalisé sur une membrane de nitrocellulose (Millipore) à 75 V pendant 1h30. La qualité du transfert et des dépôts est vérifiée par une coloration au Rouge Ponceau. La membrane est ensuite saturée dans une solution de TBS 1X (25 mM Tris pH8, 125 mM NaCl, 0,01% Tween) /lait en poudre 5% pendant 1 heure à température ambiante, puis incubée toute la nuit sous agitation à 4°C avec des anticorps primaires spécifiques (Santa Cruz, Abcam ou Cell Signalling). Après trois rinçages de 5 minutes au TBS 1X, les membranes sont hybridées 1h30 avec un anticorps secondaire, de lapin ou de souris, couplé à l'HRP (Southwestern, Cliniscience, Nanterre). Les membranes sont ensuite rincées trois fois au TBS 1X pendant 10 minutes et la liaison anticorps-antigène est détectée immédiatement par chimioluminescence (ECL, GE Healthcare, Saclay, France). La révélation se fait par ChemiDoc (BioRad) et les signaux sont analysés avec le logiciel ImageLab® (BioRade).

e. Marquage immunoflorescent de γH2AX *in vitro*

Les cellules sont cultivées en labtacke (Thermo Scientific, Fisher). Le tapis cellulaire est rincé avec du PBS puis les cellules sont fixées avec 200 µl de paraformaldéhyde (PFA) pendant 10 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS puis incubées 3 fois 5 minutes avec du tampon PLA (PBS, BSA 3%, lait écrémé 3%). Les membranes sont perméabilisées pendant 3 minutes avec le tampon de perméabilisation (20 mM HEPES (pH

7), 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 30 mM sucrose, 0,5% Triton X-100). Puis une nouvelle série de lavage de 3 fois 5 minutes avec du tampon PLA est réalisée. Les cellules sont ensuite incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire γ H2AX (Millipore) dilué au 1/800 dans du tampon PLA. Après un autre lavage de 3 fois 5 minutes avec du tampon PLA, l'anticorps secondaire Alexa-Fluor 488, dilué au 1/1000 dans du tampon PLA, est incubée pendant 1 heure avec les cellules. Un dernier rinçage au PBS est réalisé avant le montage des lamelles en Vectashield-DAPI.

f. Etudes anathomopathologiques

Les études anatomopathologiques sont réalisées par le service d'anatomopathologie du Centre Jean Perrin de Clermont-Ferrand (Dr. F. Mishellany ; Dr. A. Cayre ; Pr. F. Penault-Llorca).

2. Cycle cellulaire

Les échantillons de tumeur (10 mg) sont dilacérés mécaniquement dans 1 ml de solution PBS par des aiguilles 26 G. Cette solution est ensuite filtrée à 70 μ m. Les cellules sont récupérées, concentrées dans du PBS puis fixées gouttes par gouttes dans de l'éthanol froid. Les suspensions cellulaires sont centrifugées à 400 g pendant 8 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est remis en suspension avec 500 μ l de ribonucléase A à 1 mg/ml et 500 μ l d'iodure de propidium à 0,1 mg/ml. Les solutions sont obtenues après dilution des solutions mères dans du PBS. Les cellules sont incubées 30 minutes dans le noir à 4°C. Le cycle cellulaire est analysé avec un cytomètre de flux (CoulterEpics XL, Coulter, Hialeah, FL, USA) à la longueur d'onde d'excitation de 488 nm et d'émission de 620 nm.

3. Dosage de la mélanine

La mélanine peut être dosée par spectrophotométrie et par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Ces deux méthodes présentent des avantages et des inconvénients. Il est intéressant d'associer les deux pour avoir un résultat plus complet.

a. Dosage par spectrophotométrie

Le dosage de la mélanine au spectrophotomètre permet de quantifier la mélanine totale. Cette analyse reste imparfaite car elle ne différencie pas l'eumélanine de la phéomélanine.

Les tumeurs (20 mg) ou les cellules (1 M) sont broyées respectivement dans 1 ml ou 100 µl d'hydroxyde de potassium (KOH) 1 M et incubées à l'étuve à 60°C pendant 30 minutes jusqu'à la lyse complète des cellules. Une gamme étalon de mélanine synthétique (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier) est réalisée à partir d'une solution mère à 2,4 mg/ml. Cette dernière est diluée successivement dans du KOH 1 M pour obtenir une gamme allant de 800 à 3,125 µg/ml. Les échantillons ainsi que la gamme étalon sont déposés dans une plaque 96 puits à fond plat (100 µl/puits). L'absorbance est mesurée à 405 nm sur un spectrophotomètre. La concentration en mélanine est exprimée en µg par mg de tumeur ou par million de cellules.

b. Dosage par HPLC

Contrairement au dosage par spectrophotométrie, le dosage par HPLC a l'avantage de distinguer l'eumélanine de la phéomélanine.

L'HPLC est une technique de séparation chromatographique de composés en phase liquide, basée sur leurs interactions avec la phase stationnaire (colonne) et la phase mobile (solvant).

Les deux types de mélanines sont des polymères hétérogènes de poids moléculaires élevés, il est donc impossible de les doser directement par HPLC. Les mélanines vont donc être dégradées en marqueurs spécifiques, ce sont ces marqueurs qui seront identifiés par HPLC.

Il existe à ce jour deux méthodes d'analyse des mélanines par HPLC. La première méthode (Wakamatsu and Ito, 2002) est composée de deux traitements, l'un emploie l'oxydation alcaline avec KMnO_4 et l'autre l'hydrolyse réductrice avec HI. Ces deux traitements indépendants produisent d'une part des marqueurs d'eumélanine (oxydation au KMnO_4) détectables par UV, et d'autre part, des marqueurs spécifiques à la

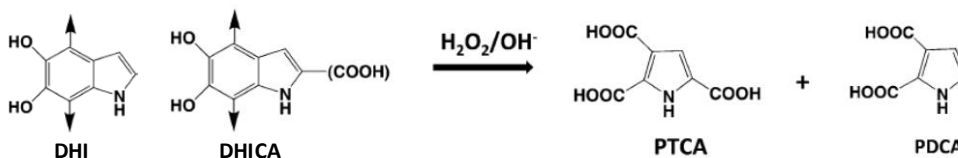
phéomélanine (hydrolyse réductrice avec HI) mais qui ne sont détectables qu'avec un détecteur électrochimique. C'est une méthode sensible mais difficile à réaliser compte tenu des étapes complexes du traitement avec HI, et le besoin de deux types de détecteur.

La seconde méthode utilise un seul traitement, l'oxydation alcaline avec H_2O_2 (Ito and Wakamatsu, 2008). En comparaison avec la méthode précédente celle-ci est plus simple, elle est reproductible, applicable à tous les tissus pigmentés et donne à la fois les marqueurs spécifiques de l'eumélanine et de la phéomélanine, détectables en UV. Les produits de dégradations obtenus après oxydation avec H_2O_2 sont pour l'eumélanine : l'acide pyrrole-2,3,5-tricarboxylique (PTCA) et l'acide pyrrole-2,3-dicarboxylique (PDCA), tandis que pour la phéomélanine il s'agit de : l'acide thiazole-2,4,5-tricarboxylique (TTCA) et l'acide thiazole-4,5-dicarboxylique (TDCA) (**Figure 72**).

L'échantillon est mis en présence de 1,5 % de H_2O_2 dans 0,5 M de K_2CO_3 pendant 20 heures à 25°C. Le peroxyde restant est décomposé avec Na_2SO_3 puis le mélange est acidifié avec HCl 6 M. Après centrifugation à 1000 g pendant 2 minutes, le surnageant est analysé par HPLC avec une colonne C18 (apolaire) en utilisant comme phase mobile 99% de phosphate de sodium 0,1 M, pH 2,1 et 1% méthanol.

Il a été démontré que le rendement de l'oxydation en PTCA et TTCA est supérieur à celui en PDCA et TDCA. Ainsi, la quantité de ces marqueurs permet de remonter aux teneurs en mélanine de chaque échantillon. La quantité d'eumélanine est obtenue en multipliant le PTCA par 80 pour les échantillons humains et par 25 chez la souris. Pour la phéomélanine, il faut multiplier la quantité de TTCA par 34, quel que soit le sujet.

Eumélanine



Phéomélanine

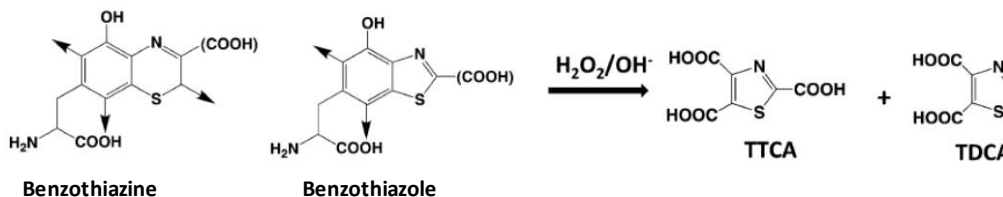


Figure 72 : Marqueurs de dégradation de l'eumélanine (PTCA et PDCA) et de la phéomélanine (TTCA et TDCA) obtenus par oxydation avec H_2O_2 en milieu alcalin. Ito and Wakamatsu, 2008

Résultats

La première partie des résultats se focalise sur l'étude de la dosimétrie d' ^{131}I ICF01012 et l'efficacité de la radiothérapie en multidoses dans un modèle de xénogreffe SK-Mel 3 (Publication 1). L'injection d' ^{131}I ICF01012 en multidoses a également été testée sur d'autres lignées de mélanome humain. Les modifications de pigmentation consécutives au traitement par ^{131}I ICF01012 dans les tumeurs syngéniques B16 et les xénogreffes SK-Mel 3 ont été étudiées. ^{131}I ICF01012 a un effet sur le nombre de métastases spontanées dans le modèle B16Bl6, ceci peut-être dû à l'irradiation de la tumeur avant la mise en place des processus de dissémination ou encore à l'irradiation des cellules circulantes. Pour documenter le rôle de la RIV sur la capacité métastatique, nous avons réalisé des expériences utilisant des modèles de colonies pulmonaires (injection i.v. des cellules tumorales) ou des cellules B16Bl6-Luc. Pour terminer, nous exposerons les résultats sur l'identification et la caractérisation d'une population de cellules souches cancéreuses dans la lignée de mélanome humain SK-Mel 28 cultivée en monocouche ou en sphéroïde. Ces données préliminaires constituent les bases pour étudier ultérieurement l'effet d'une radiothérapie sur cette population particulière.

Dans la seconde partie, les résultats sur la potentialisation de la radiothérapie par la co-injection de leurres du système de réparation de l'ADN (coDbait) sont exposés (Publication 2). Des travaux similaires associant ^{131}I ICF01012 aux nanoparticules à base de gadolinium sont également rapportés.

Durant ma thèse, j'ai également contribué à différents projets qui se sont concrétisés par deux articles, présentés en annexe.

Caractéristiques de la RIV avec [¹³¹I]ICF01012

I. Dosimétrie et traitement de mélanome humain par multidoses d'[¹³¹I]ICF01012

L'étude de la dosimétrie et le traitement des tumeurs SK-Mel 3 par 3 injections de 25 MBq d'[¹³¹I]ICF01012 sera présenté ci-dessous puis exposé sous forme d'article (Publication 1, p143-151). Ce protocole a également été testé sur d'autres lignées de mélanomes humains pigmentés : les cellules M2Gen et M4Beu seront présentées par la suite.

1. Publication 1

a. Présentation de l'article

Dans un premier temps, nous avons montré que la molécule ICF01012 conservait ses propriétés lorsqu'elle était marquée à l'iode 123, notamment la fixation aux tissus mélanisés et l'élimination rapide des organes non-cibles. Les précédentes évaluations en imagerie préclinique étaient réalisées avec de l'iode 125, il était donc intéressant de confirmer les résultats avec l'isotope 123, conventionnellement utilisé en clinique.

b. Détection de mélanomes pigmentés par [¹²³I]ICF01012 (Figure 2)

La fixation d'[¹²³I]ICF01012 a été comparée sur deux modèles de mélanomes présentant deux pigmentations différentes. Le modèle murin B16F0 a une concentration en mélanine de $14,13 \pm 4,65$ µg/mg de tumeur, tandis que les tumeurs SK-Mel 3 ont trois fois moins de mélanine, avec une concentration de $5,42 \pm 0,39$ µg/mg de tumeur. Les animaux ont reçu une injection i.v. de 3,7 MBq d'[¹²³I]ICF01012, les études d'imagerie à la γ-caméra ont été réalisées 3, 20 et 44 heures après l'injection. Entre les deux modèles, une différence est observée, avec une fixation d'[¹²³I]ICF01012 plus forte dans le modèle très pigmenté

B16F0. Malgré une plus faible concentration en mélanine, la molécule [¹²³I]ICF01012 s'accumule dans les tumeurs primitives SK-Mel 3. Les calculs réalisés à partir des images au temps 44 heures, montrent corrélation directe entre la quantité de mélanine et la fixation d' [¹²³I]ICF01012. L'efficacité de la radiothérapie dépend de la quantité de molécule fixée au niveau tumoral, ces premiers résultats suggèrent que dans le modèle SK-Mel 3, il sera nécessaire d'augmenter la dose injectée pour avoir un effet antitumoral similaire à celui observé dans le modèle B16F0.

c. Etude dosimétrique (Table 1)

Une étude dosimétrique, réalisée à partir de la méthode MIRD et d'un comptage des prélèvements au γ -counter, a permis de définir que pour une injection d' [¹³¹I]ICF01012 de 37 MBq, la dose délivrée à la tumeur SK-Mel 3 est de 26,2 Gy. Dans une précédente étude montrant l'efficacité d' [¹³¹I]ICF01012 sur le modèle pigmenté B16Bl6, la même injection délivrait 108 Gy à la tumeur. En irradiation externe, il est généralement admis que des doses comprises entre 30 et 60 Gy sont nécessaires pour obtenir un effet palliatif sur le développement du mélanome métastatique (Zygianni et al., 2011). L'activité injectée de 37 MBq n'est donc pas suffisante pour obtenir un effet sur la croissance tumorale de SK-Mel 3. Avec un protocole d'injection de 3 x 25 MBq d' [¹³¹I]ICF01012, les calculs de dosimétrie indiquent que la dose délivrée à la tumeur dépasse les 50 Gy. Un effet significatif sur la croissance tumorale devrait ainsi être observé.

d. Efficacité d' [¹³¹I]ICF01012 sur le modèle SK-Mel 3 (Figure 3&4)

Ce protocole a été appliqué sur des animaux porteurs de tumeurs humaines SK-Mel 3. Les cellules sont injectées à raison de 5 millions/100 μ l de PBS en sous-cutanée sur le flanc droit des animaux. Après 35 jours de pousse tumorale, les animaux sont séparés en trois groupes homogènes : le groupe « contrôle » qui ne reçoit aucune injection, le groupe « 1 x [¹³¹I]ICF01012 » qui reçoit 1 injection i.v. de 25 MBq et le troisième groupe « 3 x [¹³¹I]ICF01012 » qui est traité avec 3 injections i.v. de 25 MBq espacées d'une semaine d'intervalle. 20 jours après la première injection d' [¹³¹I]ICF01012, une diminution significative de la croissance tumorale est observée chez les animaux traités avec 3 doses en

comparaison avec le groupe contrôle ($0,84 \pm 0,34$ vs $2,58 \pm 1,24$). Cette diminution perdure jusqu'à 62 jours ($4,26 \pm 1,76$ vs $25,94 \pm 5,68$, respectivement). Les tumeurs du groupe « 3 x $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ » présentent également un temps de doublement deux fois plus important que le groupe contrôle ($30,27$ vs $14,50$ jours). En comparant avec le groupe « 1 x $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ », une petite diminution de la croissance est observée par rapport au groupe témoin mais non significative. Associée à cet effet, la médiane de survie des animaux est significativement augmentée dans le groupe traité avec 3 doses comparée au groupe témoin (81 vs 53 jours).

e. Discussion

En conclusion, trois doses de 25 MBq d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ sont associées à une forte diminution de la croissance de SK-Mel 3 et une augmentation de la survie des souris sans effet secondaire significatif sur le poids des animaux.

L'ensemble de ces résultats, permet de proposer une thérapie adaptée à chaque patient en fonction de la pigmentation des métastases. La première étape consisterait à évaluer la pigmentation des métastases en fonction de la fixation de la molécule. Cette étude préliminaire permettrait d'adapter la dose à injecter pour avoir un effet sur les métastases pigmentées. Cette thérapie personnalisée éviterait l'injection de doses trop fortes, limitant ainsi l'impact sur les organes non-cibles tels que la rétine, ou alors inversement, d'injecter des doses trop faibles qui n'auraient qu'un effet partiel sur la croissance des métastases pigmentées. Ceci conforte l'idée d'approche théranostique avec la nécessité de caractériser les lésions au sein d'un patient par imagerie avec la même molécule que celle utilisée en thérapie.

ARTICLE 1

[¹²³I]ICF01012 melanoma imaging and [¹³¹I]ICF01012 dosimetry allow adapted internal targeted radiotherapy in preclinical melanoma models

Viallard C, Perrot Y, Boudhraa Z, Jouberton E, Miot-Noirault E, Bonnet M, Besse S, Mischellany F, Cayre A, Maigne L, Rbah-Vidal L, D'Incan M, Cachin F, Chezal JM, Degoul F.

European Journal of Dermatology

2015

Claire VIALARD¹
 Yann PERROT²
 Zied BOUDHRAA¹
 Elodie JOUBERTON³
 Elisabeth MIOT-NOIRAULT¹
 Mathilde BONNET⁴
 Sophie BESSE¹
 Florence MISHELLANY³
 Anne CAYRE³
 Lydia MAIGNE²
 Latifa RBAH-VIDAL¹
 Michel D'INCAN¹
 Florent CACHIN³
 Jean-Michel CHEZAL¹
 Françoise DEGOUL¹

¹ Clermont Université, Université d'Auvergne, Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée, BP 10448, Inserm, U 990, F-63000 Clermont-Ferrand, France

² Clermont Université, Université Blaise Pascal, CNRS/IN2P3, Laboratoire de Physique Corpusculaire, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

³ Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, F-63011, France

⁴ U1071 INSERM Université d'Auvergne, M2iSH Clermont-Ferrand, F-63000, France

Reprints: F. Degoul
 <francoise.degoul@inserm.fr>

Article accepted on 10/31/2014

[¹²³I]ICF01012 melanoma imaging and [¹³¹I]ICF01012 dosimetry allow adapted internal targeted radiotherapy in preclinical melanoma models

Background: Melanin-targeting radiotracers are interesting tools for imaging and treatment of pigmented melanoma metastases. However, variation of the pigment concentration may alter the efficiency of such targeting. **Objectives:** A clear assessment of both tumor melanin status and dosimetry are therefore prerequisites for internal radiotherapy of disseminated melanoma. **Materials & Methods:** The melanin tracer ICF01012 was labelled with iodine-123 for melanoma imaging in pigmented murine B16F0 and human SK-Mel 3 melanomas. **Results:** *In vivo* imaging showed that the uptake of [¹²³I]ICF01012 to melanomas correlated significantly with melanin content. Schedule treatment of 3 × 25 MBq [¹³¹I]ICF01012 significantly reduced SK-Mel 3 tumor growth and significantly increased the median survival in treated mice. For this protocol, the calculated delivered dose was 53.2 Gy. **Conclusion:** Radio-iodinated ICF01012 is a good candidate for both imaging and therapeutic purposes for patients with metastatic pigmented melanomas.

Key words: dosimetry, imaging, melanin, melanoma, radiotracer, targeted radionuclide therapy

Melanins are complex biopolymers produced mainly in cutaneous and ocular melanocytes, choroid-retinal pigmented epithelium, iris and ciliary bodies [1]. While these pigments have a role in protection from UV-induced damage, their synthesis induces the formation of toxic intermediates, explaining why their production is restricted in subcellular organelles, the melanosomes [2]. In addition, the melanins, i.e. eumelanin and pheomelanin, share the protective property of linking xenobiotics to prevent DNA damage [3, 4]. Melanoma tumors result from the aberrant proliferation of melanocytes which specifically produce melanin pigments. However, as highly specialized components, melanins should have a positive role in melanoma imaging and therapy. Numerous studies have developed small organic molecules with a great affinity for melanins, such as iodoarylcarboxamides [5-7]. Detection of melanoma could then be performed after the radiolabeling of these molecules with γ or positron-emitting radionuclides for SPECT [8-10] or PET [11-14] imaging, respectively. These radiotracers targeting melanin-positive tumors could potentially improve staging and follow up as well as treatment of metastatic melanoma patients. Currently, disseminated melanoma can be treated by a combination of kinase inhibitors or by blocking melanoma-induced immunosuppression but resistance or serious adverse effects limit the efficacy of these novel therapies [15]. Therefore, alternative or complementary therapeutics are still of interest. Target-

ing the specific features of melanoma could include the above-mentioned melanins.

Besides a high specificity, melanins are not equally present in melanoma metastases. It has been previously reported that pigmentation is present in 25% of 70 analysed metastases [16]. Our group reported in a multicentre study aiming to compare the melanin radiotracer [¹²³I]BZA2 with [¹⁸F]FDG performances for melanoma staging that such variations of melanin content in metastases as the technical performances of the “gold standard” [¹⁸F]FDG/PET radiotracer did not support the clinical use of [¹²³I]BZA2 as a melanin radiotracer for melanoma imaging [9]. In this study, 45% of the metastatic lesions were pigmented. However, targeted radionuclide therapy approaches using melanin radiotracers labeled with iodine 131 gave favorable results in preclinical models [10, 17-19]. Recently, a first clinical study was conducted on 9 patients harboring melanoma metastases, preliminarily screened for inclusion by SPECT imaging with a melanin-targeting radioligand (i.e. [¹³¹I]BA-52), and treated with escalated doses ranging from 510 to 6600 MBq [20]. From this study, three out of five patients receiving a dose > 4.3 GBq had a survival of more than two years.

[¹³¹I]ICF01012, an arylcarboxamide, showed interesting properties for pigmented melanoma radiotherapy with a high efficiency on B16 models [10, 19], however, the decrease of tumor growth was less marked for human

melanoma xenografts [17]. This observation could be associated to a lesser melanin content in xenografts. To compare these models in terms of melanins, imaging with [¹²³I]ICF01012 was performed, as this isotope could be used clinically. We also evaluated the [¹³¹I]ICF01012 dosimetry and efficiency of [¹³¹I]ICF01012 multiple injections on a human SK-Mel 3 tumor.

Material and methods

Cell culture

Murine B16F0 and human SK-Mel 3 melanoma cell lines were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Biovalley, Marnes La Vallée, France). B16F0 cells were maintained as monolayers in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Glutamax, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Biowest, Nuaille, France) and 4 µg/µL gentamycin (Invitrogen). The SK-Mel 3 cell line was maintained in McCoy's 5A medium (Invitrogen) supplemented with 15% FCS and 4 µg/µL gentamycin. Cells were grown at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO₂.

Animals

Male C57BL/6J mice and male Swiss nu/nu mice (6 weeks old) were obtained from Charles River Laboratories (l'Arbresle, France). All animal studies were carried out in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" and approved by the local ethics committee (C2E2A) under numbers: CE03-11, CE18-09 and CE64-12. To establish the tumor, 3 × 10⁵ B16F0 cells (mice C57BL/6J) and 5 × 10⁶ SK-Mel 3 cells (nude mice) were suspended in 100 µL PBS buffer and injected subcutaneously into the right flank of each mouse.

Radiochemistry

ICF01012 was synthesised according to previously described methods [21]. [¹²³I]NaI (7.4 GBq/mL), produced using the ¹²⁴Xe (p, 2n) reaction, was purchased from MDS Nordion SA (Ave de l'Espérance, Fleurus, Belgium) as a no-carrier-added solution and in dilute aqueous sodium hydroxide solution. Extrelut[®] and citrate buffer solution (pH = 4) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). RP-HPLC purification was performed on a Perkin Elmer system equipped with a Flexar LC autosampler, a Series 200 pump, a Peltier column oven, a vacuum degasser, a Photodiode Array Detector (PDA) detector and a GabiStar (Raytest). Semi-preparative RP-HPLC separation was carried out on a C₁₈ column (SymmetryPrep C₁₈, 7.8 × 300 mm, 7 µm, Waters) using the following conditions: gradient time = 10 min, flow rate = 3 mL/min, H₂O/MeOH (30:70 → 0:100) (NH₄OH 0.2%), λ = 254 nm. Analytical RP-HPLC controls were carried out on a C₁₈ column (ZORBAX 80Å, 4.6 × 150 mm, Agilent) using the following conditions: gradient time = 10 min, flow rate = 1 mL/min, H₂O/MeOH/(30:70 → 0:100) (NH₄OH 0.2%), λ = 254 nm.

ICF01012 radiolabelling with ¹²³I

To a solution of ICF01012 (1.2-2.5 mg) in citrate buffer pH = 4 (500 µL) were added, in a sealed vial equipped with a needle (25 G, 0.5 × 16 mm), an aqueous copper (II) sulfate solution (0.5 mg, 100 µL) and [¹²³I]NaI (165 MBq). The reaction mixture was heated at 150 °C for 1 hour. After cooling to room temperature, the residue was taken up in water (500 µL) and a 1.0 N aqueous sodium hydroxide solution (100 µL) was added. The vial cap and septum were removed. The resulting suspension was loaded on an Extrelut[®] column and eluted after 10 minutes with dichloromethane (5 × 3 mL). The collected organic extracts were evaporated under reduced pressure, taken up with methanol (2 × 200 µL), and purified by semi-preparative RP-HPLC. Fractions containing the expected radiolabeled product were collected, evaporated to dryness, dissolved in dichloromethane (2 mL) and treated with a 2.0 N hydrochloric acid solution in anhydrous ether (5 mL). The resulting hydrochloride solution was evaporated under reduced pressure and the dry residue was suspended in anhydrous ether (5 mL). The solvent was then evaporated under vacuum for 30 minutes to give [¹²³I]ICF01012. The radiotracers were shown by analytical radio-RP-HPLC ([¹²³I]ICF01012: R_t = 8.40 min) to be identical to the authentic non-radioactive material and to be free of significant radiochemical impurities.

ICF01012 radiolabelling with ¹³¹I

[¹³¹I]ICF01012 was synthesized by radio-iododestannylation as described previously [10, 17]. [¹³¹I]ICF15002 was obtained in 150 minutes, with 81-88% radiochemical yields, radiochemical purities in the range of 92-99%, and specific activities in the range of 94-100 GBq/µmol.

In vivo planar scintigraphic imaging

B16F0 and SK-Mel 3 melanoma-bearing mice received an intravenous (i.v.) injection of 3.7 MBq [¹²³I]ICF01012 at day 16 and day 45 post cell inoculation, respectively. After anesthesia by intraperitoneal (i.p.) injection (200 µL/mice), with a mixture 4:1 of ketamine (Imalgène 500[®]; Rhône Mérieux, Lyon, France) and xylazine (Rompun[®], 2% ; Bayer, France), mice were submitted to serial scintigraphic acquisition at 3, 20 and 44 hours after radiotracer injection. Imaging was performed using a gamma-camera dedicated to small animals (γ-IMAGER[®]; Biospace Mesures, Paris, France). All the acquisitions were performed with a 15% window centered on the 160 KeV peak of ¹²³I. Mice were placed in suitable position over the collimator of the γ-camera and images acquired for 10 min. Quantitative analyses of scintigraphic scans were performed using the γVision+ software (Biospace Mesures). Tumor uptake was determined from semi-quantitative analyses of scintigrams according to the method previously published [22]. Briefly, for each scintigram, regions of interest (ROIs) were drawn by the same investigator around melanomas and whole body mice with boundaries as closed as possible to their limits. The corresponding tumor surface was delineated in the muscle. The values in cpm/mm² were considered to calculate the ratios of tumor towards whole body and tumor to muscle activities.

At the end of image acquisition, mice were sacrificed; tumors were removed, weighed and immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C for melanin assay.

Therapy experiment on Nude mice bearing SK-Mel 3 melanoma

After 35 days of tumor growth, animals received [^{131}I]ICF01012 at 25MBq i.v. single dose (1×25 MBq) or once a week for 3 weeks (3×25 MBq). The length and width of tumors were measured three times per week using digital calipers. Tumor volume was determined according to the following formula: Volume (mm^3) = (Length (mm) \times Width² (mm))/2. Mice were weighed to monitor potential toxicity. For ethical reasons, the animals were sacrificed when tumors reached 2000 mm^3 . This endpoint used in survival analysis was considered as the death day.

Biodistribution experiment in Nude mice bearing SK-Mel 3 tumors

Thirty five days following xenograft, mice were i.v. injected with 0.37 MBq [^{131}I]ICF01012. Three mice per time (1, 3, 6, 10, 24, 48, 72, 120, 168 and 240 hours) were sacrificed, organs and tumors were removed and weighed. Their radioactivity was counted with a γ -counter (Wizard 1480, Perkin Elmer). The fraction of injected activity in tumors (% IA/g) was determined by the ratio of counted activity per organ divided by the organ weight. Dosimetry was established using the MIRD methodology [23]. The absorbed dose is calculated by multiplying the cumulative activity (Bq.s/kg) in the organ with the so-called "S-value", representing the energy deposited in the organ per decay (J/Bq/s). First, activity over time for each organ was fitted by a mono-exponential function. The cumulative activity was then estimated by the analytical integration of the mono-exponential over an infinite time. S-values were computed by a Monte Carlo approach allowing simulation of the physical interactions of the particles emitted by the ^{131}I source in a CT scan-based mouse model [24].

Melanin assay

Tumor samples (20 mg) were crushed and dissolved in a 1 M aqueous potassium hydroxide solution (1 mL) and incubated at 60°C for 30 minutes, until complete lysis [17]. The absorbance was measured at 405 nm and melanin concentration was determined using a standard curve generated with synthetic melanin (Sigma-Aldrich). Melanin content was expressed as μg per mg of tumor.

Statistical analyses

The statistical analyses were performed with the XLStat software (Addinsoft, VA) using ANOVA for tumor volumes and Log rank for median survival comparison respectively.

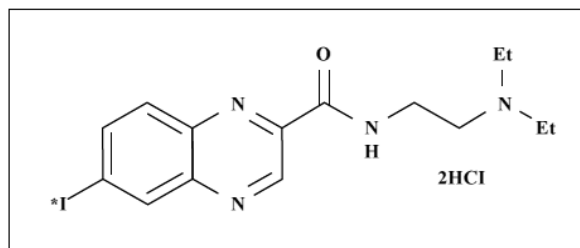


Figure 1. Structure of ICF01012.

Results

Radiolabelling of ICF01012 with iodine 123 and in vivo uptake of [^{123}I]ICF01012 in mouse and human melanoma tumors

ICF01012 (figure 1) was prepared as previously described [21]. [^{123}I]ICF01012 was obtained by radio-isotopic exchange in 180 min, with 55% uncorrected radiochemical yield. The radiochemical purity was $>96.5\%$, the chemical purity $>85\%$ and the specific activity ranged between 16.8-35.6 MBq/ μmol .

Different tumor uptakes were observed after [^{123}I]ICF01012 radiotracer administrations in B16F0 and SK-Mel 3 models (figure 2A). However, in both models, 3 hours after radiotracer administration, a clear accumulation of [^{123}I]ICF01012 occurred within the tumors and a rapid elimination of [^{123}I]ICF01012 from non-specific organs was observed at 20 h post-injection.

The accumulation of [^{123}I]ICF01012 in pigmented eyes from the C57BL6 model attested its high specificity for melanin. The percentages of tumor [^{123}I]ICF01012 uptake relative to whole body showed an increase in this ratio in a time dependent manner for highly pigmented B16F0, SK-Mel 3 being saturated at time 20h (figure 2B). The tumor to muscle ratio revealed a good selectivity of [^{123}I]ICF01012 in B16F0 and SK-Mel 3, reaching 11.5 ± 1.7 and 4.8 ± 1.8 at 20h, respectively (figure 2B). The % of activity in melanomas at time 44h was related to the content of melanin 14.13 ± 4.65 vs 5.42 ± 0.39 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of B16F0 and SK-Mel 3 tumors, respectively (Fig. 2C). These results from two different *in vivo* pigmented models highlights the direct correlation between melanin content and [^{123}I]ICF01012 uptake ($R^2 = 0.333$, $p = 0.019$). A [^{123}I]ICF01012 de-iodination was evidenced by thyroid uptake in both models. However, in the SK-Mel 3 model, this signal was more intense after 3h p.i., compared to B16F0 model. This could be linked to the lower [^{123}I]ICF01012 tumor retention in SK-Mel 3. Indeed, we previously observed that [^{125}I]ICF01012 was highly stable in the tumor, 84% of the unchanged form still being detected 8 days after injection, while it was quickly metabolized in blood [25]. A higher level of unbound [^{123}I]ICF01012 will then generate a higher 123-iodine capture by the thyroid.

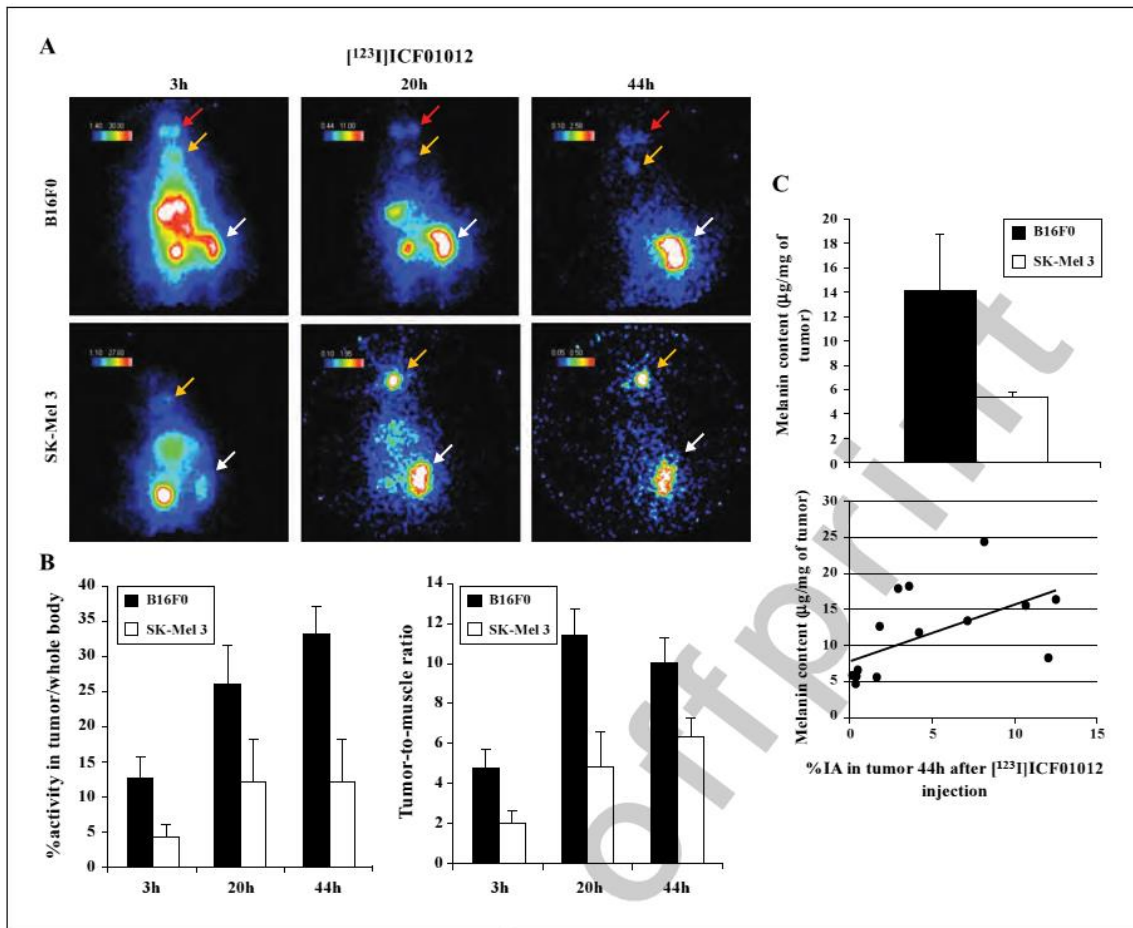


Figure 2. $[^{123}\text{I}]\text{ICF01012}$ imaging and correlation with cell melanin content in both B16F0 and SK-Mel 3 melanoma models. **A)** Representative serial imaging normalized with the same color scaling (set at 75% of the maximum pixel value) of *in vivo* $[^{123}\text{I}]\text{ICF01012}$ biodistribution on C57BL/6J mice bearing B16F0 or nude mice bearing SK-Mel 3 tumors. Tumors are indicated by white arrows, thyroid and eyes by orange and red arrows, respectively. **B)** % of $[^{123}\text{I}]\text{ICF01012}$ activity in tumor relative to the whole body and tumor-to-muscle ratios. **C)** The melanin content was determined in B16F0 ($n = 5$) and SK-Mel 3 ($n = 4$) tumors. A significant correlation between the percentage of injected activity (IA) present in the tumor at 44 h and the melanin concentration was observed (Pearson's test, $p = 0.019$).

Evaluation of $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ dosimetry in SK-Mel 3 tumors

Absorbed dose was evaluated on SK-Mel 3 tumor and non-target organs from biodistribution studies after *i.v.* injection of 37 MBq $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ and Monte Carlo S-values (table 1). The biodistribution in the tumor showed a rapid and persistent strengthened accumulation of ICF01012 (around 7% AI/gr) during 42 hours (figure 4A). A significant dose was delivered with $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ on pigmented tumor (26.2 Gy) compared to the other organs. Low absorbed dose was deposited in excretion organs such as the kidney, liver, colon and stomach (3.2, 7.4, 9.2 and 7.4 Gy, respectively) (table 1). A delivered absorbed dose of 30 Gy was classically used in melanoma radiotherapy protocols designed for regional control or palliative therapy [26]. The injected activity was then set up for efficient treatment in a schedule of 3×25 MBq $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ with no expected side effects at the maximal delivered dose.

$[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ treatment inhibits the growth of SK-Mel 3 xenograft tumors and increases mice survival

The effects of $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ radiotherapy were observed on tumor growth and animal survival (figure 3). After 20 days following the first 25 MBq $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ dose injection, the tumor growth (evaluated by the ratio of measured tumoral volume minus the initial volume to the initial one) of 3 dose-treated animals was significantly stopped compared to control (0.84 ± 0.34 vs 2.58 ± 1.24 , at day 20) and this until 62 days (4.26 ± 1.76 vs 25.94 ± 5.68) ($p < 0.05$; ANOVA test). During this time, this group harbored a tumor doubling time two-fold higher than the control group one (30.27 vs 14.50 days). In comparison, a single dose of $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ (25 MBq) slightly reduced tumor growth, although not significantly. The percent of surviving mice showed a significant increase of the median survival in $3 \times [^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ treatment compared to the control group

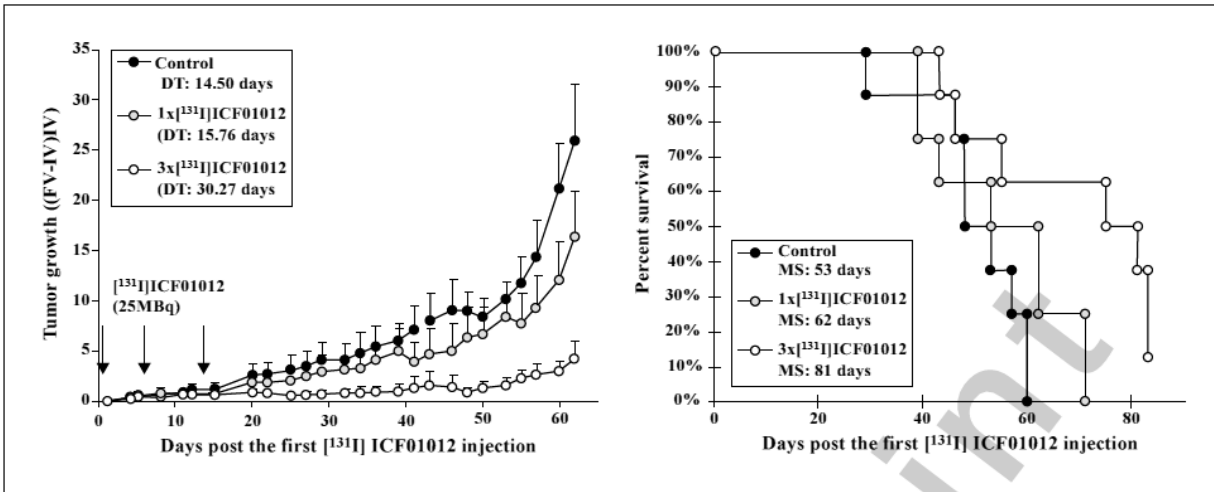


Figure 3. Efficiency of $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ on SK-Mel 3 melanoma growth and mice survival. Nude mice received a single (25 MBq) or three (3×25 MBq) i.v. injections of $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$. The results were obtained with 8 mice per group. **A)** Tumor growth was expressed as % of the baseline volume and doubling time (DT) was determined. A significant effect of the three injection protocol was observed compared to the other groups (ANOVA, Tuckey post-test, $p < 0.001$). **B)** Animal survival curve was calculated as the number of animals that remained in each group at indicated times, a median survival was calculated (MS). A significant increase in percentage survival of animals receiving the three-injection treatment was observed compared to the control and the one-injection groups (Log rank test, $p < 0.05$).

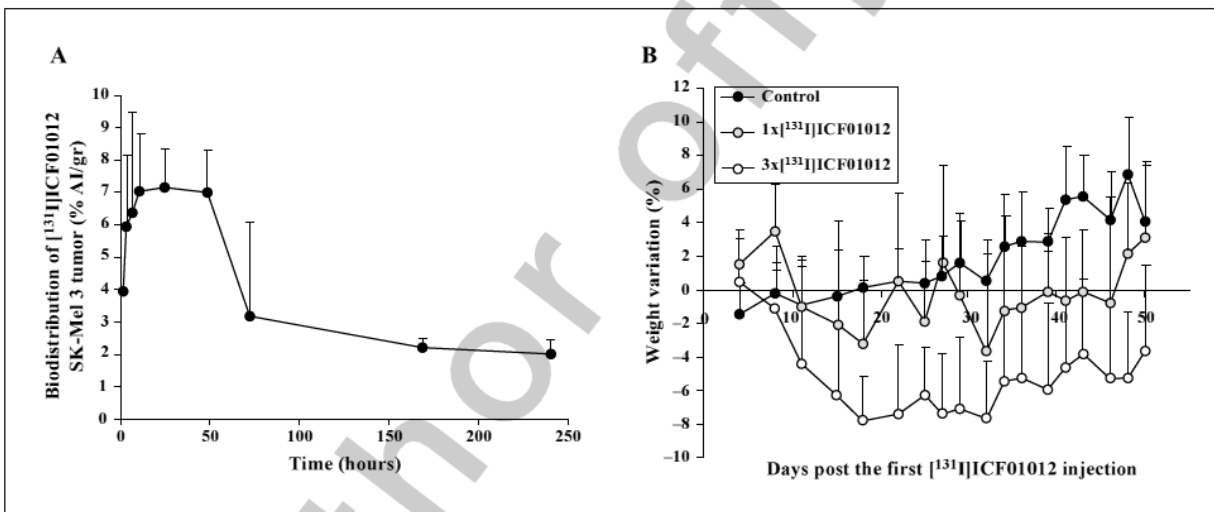


Figure 4. **A)** Time course accumulation of $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ in SK-Mel 3 xenografts **B)** Animals were weighed steadily and variations to the basal values were calculated, a transient significant decrease between the control and the three-injection groups (ANOVA, Tuckey post-test, $p < 0.05$) was observed from days 18 to 48 but stayed below the 10% variation compared to initial weight.

(81 vs 53 days) ($p < 0.05$; Log-Rank test). After 60 days, the tumor escaped from treatment. For the 3×25 MBq group, a significant slight weight loss compared to control and 1×25 MBq was observed, which did not exceed the critical value of 10% of the initial values (figure 4B).

Discussion

We show here for the first time the specific melanin binding property of $[^{123}\text{I}]\text{ICF01012}$ for *in vivo* imaging of mice

bearing syngenic or human melanomas. The labeling of ICF01012 with iodine-123 was performed with excellent radiochemical yield and purity. $[^{123}\text{I}]\text{ICF01012}$ imaging assessed in melanoma-bearing mouse models gave good results in terms of contrast, elimination and uptake in pigmented tissues (figure 2). *In vivo*, tumor $[^{123}\text{I}]\text{ICF01012}$ activity was correlated with melanin concentration. This is in total accordance with previous observations using ICF01012 labeled with iodine 125 for imaging mice bearing different human melanomas. Indeed, in a non-pigmented A375 model, $[^{123}\text{I}]\text{ICF01012}$ concentration was near background level. $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ therapy was without effect

Table 1. Organ absorbed dose in Gy for [¹³¹I]ICF01012 single injection (37 MBq) or for [¹³¹I]ICF01012 three injections (3 × 25 MBq), estimated with the MIRD formalism in nude mice bearing SK-Mel 3 melanoma

Organs/Tissues (Nude Mice)	Calculated dose (Gy) for 37 MBq	Calculated dose (Gy) for 3×25 MBq
Bladder	2.5 ± 0.6	5.1
Blood	0.8 ± 0.0	1.6
Brain	0.3 ± 0.0	0.5
Colon	9.2 ± 1.0	18.7
Eyes	0.4 ± 0.1	0.8
Heart	0.8 ± 0.1	1.6
Kidneys	3.2 ± 0.1	6.5
Liver	7.4 ± 0.5	14.9
Lungs	1.5 ± 0.1	3.0
Muscle	0.4 ± 0.0	0.9
Ovaries	1.0 ± 0.1	2.0
Pancreas	1.9 ± 0.1	3.8
Skin	2.8 ± 0.0	5.7
Small intestine	2.7 ± 0.2	5.4
Spleen	1.5 ± 0.1	3.0
Stomach	7.4 ± 1.6	15.0
Tumor SK-Mel 3	26.2 ± 2.4	53.1

on an M3Dau amelanotic xenograft [17]. Labeling of ICF01012 with iodine 123 was developed for a more convenient clinical use. Despite a lower melanin concentration in SK-Mel 3 vs B16F0, [¹²³I]ICF01012 imaging was sensitive enough to detect these tumors. Another melanin radiotracer, [¹²³I]BZA2, was compared to [¹⁸F]FDG in a phase 3 clinical trial and showed a significantly higher specificity in the detection of pigmented melanoma metastases, despite the difference in terms of sensitivity between PET ([¹⁸F]FDG) and SPECT imaging ([¹²³I]BZA2) [9]. The elimination rate of [¹²³I]BZA2 from target organs in preclinical models was faster than for [¹²³I]ICF01012 (data not shown). Therefore [¹²³I]ICF01012 seems more suitable than [¹²³I]BZA2 for both melanin-positive patient stratification and [¹³¹I]ICF01012 treatment follow-up.

For therapy, B16Bl6 tumors were more pigmented and one injection was sufficient to induce an antitumoral effect, the threshold to get an objective radiotherapeutic response being from 14.8-22.2 MBq [19]. However, as a direct consequence of the relationship between melanin content and ICF01012 tumor uptake, the absorbed dose was 108 Gy in highly pigmented B16Bl6 [19] vs 26.2 Gy in SK-Mel 3 tumors, for 37 MBq [¹³¹I]ICF01012 injected. Three doses of 25 MBq [¹³¹I]ICF01012 injections were associated with a strong reduction of SK-Mel 3 growth and an increase in mouse survival without significant impact on weight. Dosimetry calculations of 188-Re-Labeled melanin-binding antibody (7.4 GBq injected) showed 28.80-19.90 Gy deposits for a wide range of melanin concentration [27]. The major challenge in antibody therapies

is their inability to penetrate solid tumors efficiently [28]. In contrast, the high uptake of ICF01012 is due to its small size and the abundance of the target. [¹²⁵I]ICF01012 was homogeneously distributed in the tumor (data not show), allowing a similar effect on the overall tissue.

The absorbed dose for melanoma external beam radiation therapy usually ranges from 30 Gy to 60 Gy with a fractionated regimen (for a review see [26]). An external radiation dose of 37.5 Gy given in 15 fractions (2.5 Gy/fraction) was suggested for effective palliation in patients with metastatic melanomas. Interestingly, in a phase I clinical study of targeted radionuclide therapy with a melanin-targeting radiotracer, [¹³¹I]BA-52, the absorbed dose to melanoma metastases was in a range of 1.1 to 12 Gy per GBq, leading to an objective response in 3 out of 5 patients (receiving a dose superior to 4.3 GBq) surviving more than 2 years [20]. Even if extrapolation of treatment efficacy from preclinical models to clinical trials is difficult, the resulting data indicate a promising potential for [¹³¹I]ICF01012 radiotherapy of pigmented metastases. However, we are aware that the pigmented status of melanoma metastases remains the main limitation of our therapeutic strategy, as it is well established that all melanoma metastases are not pigmented [16, 29]. However, a recent clinical analysis showed a significant association between the presence of pigmented metastases and a decrease in life survival [30]. Therefore specifically killing pigmented cells will be of great interest in reducing melanoma recurrence. Furthermore, the use of radiosensitizers could overcome the radio-resistance of human melanomas. For example, small DNA molecules (DBait), which disorganize the repair system, enhanced radio-induced DNA damages in different preclinical models [31]. Interestingly, a B-RAF kinase inhibitor (i.e. PLX-4032) was shown to radiosensitize melanoma cells [32]. Combined treatment involving both [¹³¹I]ICF01012 and PLX-4032 could allow the targeting of both achromic and melanized disseminated melanomas in patients harboring the B-RAF^{V600E} mutation.

Conclusions

Melanin is an attractive target for melanoma treatment [10, 17-20, 33]. We demonstrated herein that radioiodinated melanin-targeting ligands, [¹²³I]ICF01012 and [¹³¹I]ICF01012, are useful tools for imaging and therapy of pigmented melanomas respectively, in preclinical models. All these results support the clinical use of [¹³¹I]ICF01012 for the selection of melanin positive sub-populations, and as targeted radionuclide therapy of metastatic melanoma patients. ■

Disclosure. *Acknowledgments:* We acknowledge Pierre Labarre and Aurélien Vidal for radioprotection controls and Janine Papon for technical help. *Financial support:* This work was partly supported by the Ligue Régionale Contre le Cancer, Inserm, Cyclopharma laboratories and the Auvergne Regional Council. *Conflict of interest:* none.

References

1. Dubey S, Roulin A. Evolutionary and biomedical consequences of internal melanins. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014; 27: 327-38.
2. Raposo G, Marks MS. Melanosomes—dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 786-97.
3. Larsson BS. Interaction between chemicals and melanin. *Pigment Cell Res* 1993; 6: 127-33.
4. Mars U, Larsson BS. Pheomelanin as a binding site for drugs and chemicals. *Pigment Cell Res* 1999; 12: 266-74.
5. Pham TQ, Greguric I, Liu X, Berghofer P, Ballantyne P, Chapman J, et al. Synthesis and evaluation of novel radioiodinated benzamides for malignant melanoma. *J Med Chem* 2007; 50: 3561-72.
6. Edreira MM, Pozzi OR. Iodide benzamides for the in-vivo detection of melanoma and metastases. *Melanoma Res* 2006; 16: 37-43.
7. Mansard S, Papon J, Moreau MF, Miot-Noirault E, Labarre P, Bayle M, et al. Uptake in melanoma cells of N-(2-diethylaminoethyl)-2-iodobenzamide (BZA2), an imaging agent for melanoma staging: relation to pigmentation. *Nucl Med Biol* 2005; 32: 451-8.
8. Sillaire-Houtmann I, Bonafous J, Veyre A, et al. [Phase 2 clinical study of 123I-N-(2-diethylaminoethyl)-2-iodobenzamide] in the diagnostic of primary and metastatic ocular melanoma]. *J Fr Ophthalmol* 2004; 27: 34-9.
9. Cachin F, Miot-Noirault E, Gillet B, et al. (123I)-BZA2 as a melanin-targeted radiotracer for the identification of melanoma metastases: results and perspectives of a multicenter phase III clinical trial. *J Nucl Med* 2014; 55: 15-22.
10. Bonnet-Duquennoy M, Papon J, Mishellany F, et al. Targeted radionuclide therapy of melanoma: anti-tumoural efficacy studies of a new 131I labelled potential agent. *Int J Cancer* 2009; 125: 708-16.
11. Ren G, Miao Z, Liu H, et al. Melanin-targeted preclinical PET imaging of melanoma metastasis. *J Nucl Med* 2009; 50: 1692-9.
12. Greguric I, Taylor SR, Denoyer D, et al. Discovery of [18F]N-(2-(diethylamino)ethyl)-6-fluoronicotinamide: a melanoma positron emission tomography imaging radiotracer with high tumor to body contrast ratio and rapid renal clearance. *J Med Chem* 2009; 52: 5299-302.
13. Denoyer D, Greguric I, Roselt P, et al. High-contrast PET of melanoma using [18F]-MEL050, a selective probe for melanin with predominantly renal clearance. *J Nucl Med* 2010; 51: 441-7.
14. Rbah-Vidal L, Vidal A, Besse S, L et al. Early detection and longitudinal monitoring of experimental primary and disseminated melanoma using [(18)F]JCF01006, a highly promising melanoma PET tracer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39: 449-61.
15. Voskoboinik M, Arkenau HT. Combination Therapies for the Treatment of Advanced Melanoma: A Review of Current Evidence. *Biochem Res Int* 2014; 2014: 307059.
16. Nikkola J, Vihinen P, Vlayková T, Hahka-Kemppinen M, Kahari VM, Pyrhonen S. High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. *Int J Cancer* 2002; 97: 432-8.
17. Bonnet M, Mishellany F, Papon J, et al. Anti-melanoma efficacy of internal radionuclide therapy in relation to melanin target distribution. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23: e1-11.
18. Joyal JL, Barrett JA, Marquis JC, et al. Preclinical evaluation of an 131I-labeled benzamide for targeted radiotherapy of metastatic melanoma. *Cancer Res* 2010; 70: 4045-53.
19. Degoul F, Borel M, Jacquemot N, et al. In vivo efficacy of melanoma internal radionuclide therapy with a 1-labeled melanin-targeting heteroarylcarboxamide molecule. *Int J Cancer* 2013; 133: 1042-53.
20. Mier W, Kratochwil C, Hassel JC, et al. Radiopharmaceutical therapy of patients with metastasized melanoma with the melanin-binding benzamide 131I-BA52. *J Nucl Med* 2014; 55: 9-14.
21. Chezal JM, Papon J, Labarre P, et al. Evaluation of radiolabeled (hetero)aromatic analogues of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide for imaging and targeted radionuclide therapy of melanoma. *J Med Chem* 2008; 51: 3133-44.
22. Miot-Noirault E, Papon J, Gardette M, et al. The use of [(125)I] scintigraphic in vivo imaging in melanoma-bearing mice for a rapid prescreening of vectors to melanoma tissue. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 24: 629-36.
23. Bolch WE, Eckerman KF, Sgouros G, Thomas SR. MIRD pamphlet No. 21: a generalized schema for radiopharmaceutical dosimetry—standardization of nomenclature. *J Nucl Med* 2009; 50: 477-84.
24. Perrot Y, Degoul F, Auzeloux P, et al. Internal dosimetry through GATE simulations of preclinical radiotherapy using a melanin-targeting ligand. *Phys Med Biol* 2014; 59: 2183-98.
25. Denoyer D, Labarre P, Papon J, et al. Development of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of a new potent radioiodinated melanoma imaging and therapeutic agent. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 875: 411-8.
26. Zygogianni A, Kyrgias G, Kouvaris J, Mystakidou K, Gogas H, Kouloulis V. Melanoma: the radiotherapeutic point of view; review of the current literature. *Rev Recent Clin Trials* 2011; 6: 127-33.
27. Schweitzer AD, Rakesh V, Revskaya E, Datta A, Casadevall A, Dadachova E. Computational model predicts effective delivery of 188-Re-labeled melanin-binding antibody to metastatic melanoma tumors with wide range of melanin concentrations. *Melanoma Res* 2007; 17: 291-303.
28. Navarro-Teulon I, Lozza C, Pelegrin A, Vives E, Pouget JP. General overview of radioimmunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy* 2013; 5: 467-87.
29. Ghanem N, Althoefer C, Hogerle S, et al. Detectability of liver metastases in malignant melanoma: prospective comparison of magnetic resonance imaging and positron emission tomography. *Eur J Radiol* 2005; 54: 264-70.
30. Brozyna AA, Jozwicki W, Carlson JA, Slominski AT. Melanogenesis affects overall and disease-free survival in patients with stage III and IV melanoma. *Human Pathol* 2013; 44: 2071-4.
31. Quanz M, Chassoux D, Berthault N, Agrario C, Sun JS, Dutreix M. Hyperactivation of DNA-PK by double-strand break mimicking molecules disorganizes DNA damage response. *PLoS One* 2009; 4: e6298.
32. Sambade MJ, Peters EC, Thomas NE, Kaufmann WK, Kimple RJ, Shields JM. Melanoma cells show a heterogeneous range of sensitivity to ionizing radiation and are radiosensitized by inhibition of B-RAF with PLX-4032. *Radiother Oncol* 2011; 98: 394-9.
33. Dadachova E, Nosanchuk JD, Shi L, et al. Dead cells in melanoma tumors provide abundant antigen for targeted delivery of ionizing radiation by a mAb to melanin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 14865-70.

2. Effet de trois injections d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ sur la croissance de mélanomes humains

a. Evolution tumorale de la lignée M2Gen

Après 85 jours de pousse tumorale pour la lignée M2Gen (moyenne tumorale : $239 \pm 124 \text{ mm}^3$), la première injection de 25 MBq d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ est réalisée en i.v.. Elle est suivie de deux injections supplémentaires, à la même dose, espacées d'une semaine d'intervalle.

Les animaux sont en effectif trop faible pour réaliser une analyse statistique ($n=2$ pour contrôle ; $n=3$ pour « $3 \times [^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ »). Cependant, une diminution nette de la croissance tumorale (**Figure 73A**) est observée à partir du jour 18 entre les animaux contrôles et traités ($1,75 \pm 0,01$ vs $0,46 \pm 0,14$ respectivement). Cette diminution s'accroît avec le temps et elle devient même négative pour le groupe traité. 36 jours après la première injection, la croissance tumorale est de $4,71 \pm 1,7$ pour les contrôles vs $-0,01 \pm 0,2$ pour les animaux « $3 \times [^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ ». La survie des animaux n'a pas été évaluée, en effet, ils ont été sacrifiés le même jour (J36) afin de réaliser des analyses sur la pigmentation.

La comparaison de la mélanine totale entre la lignée M2Gen et SK-Mel 3 montre une quantité 3 fois plus importante dans la lignée M2Gen ($14,71 \pm 4,09$ vs $5,58 \pm 0,72 \text{ }\mu\text{g/mg}$ de tumeur respectivement) (**Figure 73B**). La forte efficacité de la molécule est expliquée par cette concentration élevée en mélanine (Viallard et al., 2014).

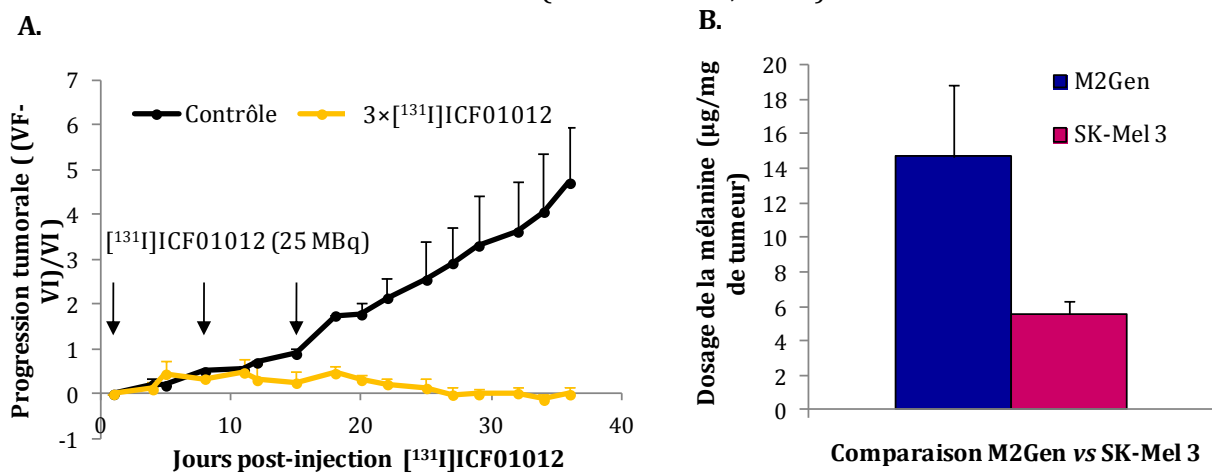


Figure 73 : Effet de la radiothérapie sur la lignée M2Gen. A) Courbe de la croissance tumorale des animaux contrôles et traités avec $3 \times [^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ (25 MBq par injection). **B)** Comparaison de la quantité de mélanine dans les tumeurs M2Gen contrôles et les tumeurs SK-Mel 3.

b. Evolution tumorale de la lignée M4Beu

Les tumeurs M4Beu ont présenté une forte disparité en termes de croissance tumorale, et ceci dès le début de l'étude (moyenne tumorale 17 jours post-inoculation cellulaire: $54 \pm 41 \text{ mm}^3$). L'hétérogénéité était intra et intergroupe, la progression tumorale n'a montré aucune différence significative entre les trois groupes (contrôle : n=3, $1 \times [^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$: n=4 et $3 \times [^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$: n=4) (**Figure 74**) (test ANOVA). Les animaux ont été sacrifiés 53 jours après la première injection d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ pour réaliser des analyses sur la concentration en mélanine.

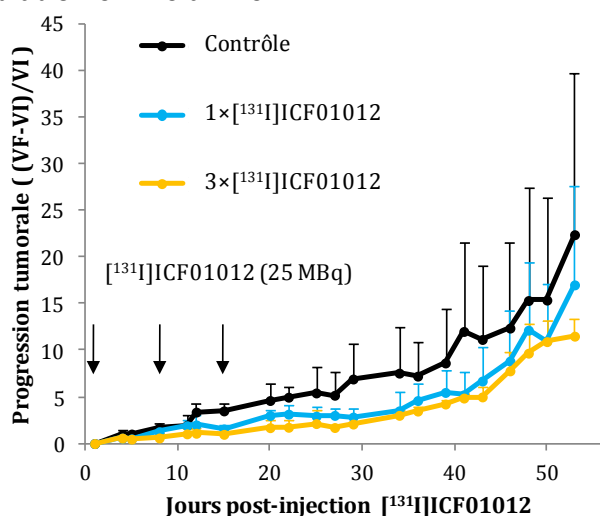


Figure 74 : Effet de la radiothérapie interne sur les mélanomes humains M4Beu. Courbe de la croissance tumorale des animaux contrôles et traités avec 1 ou 3 $\times [^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ (25 MBq par injection).

c. Discussion

Les lignées de mélanomes utilisés ont montré des sensibilités différentes à la radiothérapie. Les tumeurs M4Beu ont faiblement répondu au simple et au triple traitement. Cette absence d'effet peut-être due à des difficultés de croissance tumorale mais également à un profil plus radiorésistant. Cependant, les mêmes xénogreffes traitées avec 37,5 MBq d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ avaient montré une diminution de la progression tumorale (Bonnet et al., 2010) ce qui renforce la première hypothèse. La lignée M2Gen semble très sensible à la radiothérapie, ces résultats préliminaires sont très intéressants et restent à être confirmés ultérieurement. En effet, cette lignée possède la particularité de ne pas avoir

la mutation conduisant au phénotype BRAFV600E. La RIV pourrait ainsi permettre de soigner les personnes non éligibles pour le traitement anti-BRAF.

II. Effet d' [¹³¹I]ICF01012 sur la pigmentation

Plusieurs données sur le modèle B16Bl6 montraient que la RIV induisait l'expression des gènes de la mélanogénèse ainsi qu'une diminution des pools des acides aminés précurseurs (Degoul et al., 2013). L'augmentation des mélanines est liée à leur fonction principale : protéger l'ADN de l'effet des radiations. Nous avons donc cherché à établir dans les modèles de mélanomes SK-Mel 3, M2Gen et M4Beu si la variation du taux de mélanines s'accompagnait de modification du ratio entre la phéomélanine et l'eumélanine. En effet, l'eumélanine est reconnue pour ses propriétés antioxydantes et agit comme un agent photoprotecteur alors que la phéomélanine qui contient du soufre est un agent phototoxique pro-oxydant, qui pourrait augmenter l'agressivité tumorale.

1. Analyse de la pigmentation des tumeurs SK-Mel 3

Les tumeurs SK-Mel 3 contrôles et traitées par une ou plusieurs injections d' [¹³¹I]ICF01012 ont été analysées par spectrophotométrie et HPLC. Une augmentation de la quantité de mélanine est observée dans le groupe 3× [¹³¹I]ICF01012 comparé au groupe contrôle (8,6 vs 5,6 µg/mg de tumeur, respectivement) (**Tableau 11**). En revanche, cette augmentation n'est significative que lors de l'analyse HPLC, technique plus sensible que la spectrophotométrie.

Groupes	Spectrophotométrie	HPLC
Contrôle	6,4 µg/mg	5,6 µg/mg
1× [¹³¹ I]ICF01012	5,9 µg/mg	6,0 µg/mg
3× [¹³¹ I]ICF01012	8,7 µg/mg	8,6 µg/mg

* (indicated by a bracket between the HPLC values of the control and 3x treatment groups)

Tableau 11 : Concentration en mélanine totale dans les tumeurs SK-Mel 3 contrôles et traitées avec différentes doses d' [¹³¹I]ICF01012. Les valeurs médianes sont exprimées en µg par mg de tumeur.

L'analyse HPLC permet de faire la discrimination entre les deux types de mélanines. Les marqueurs de l'eumélanine et de la phéomélanine augmentent significativement dans le groupe 3×[¹³¹I]ICF01012 (6,8 µg/mg et 1,8 µg/mg, respectivement, valeur médiane) comparé au groupe contrôle (4,5 µg/mg et 1,1 µg/mg, respectivement, valeur médiane) (**Figure 75**). L'augmentation de la phéomélanine est également significative entre le groupe 3 injection et le groupe 1 injection (1,2 µg/mg, valeur médiane). En revanche, les ratios de la phéomélanine sur l'eumélanine sont inchangés.

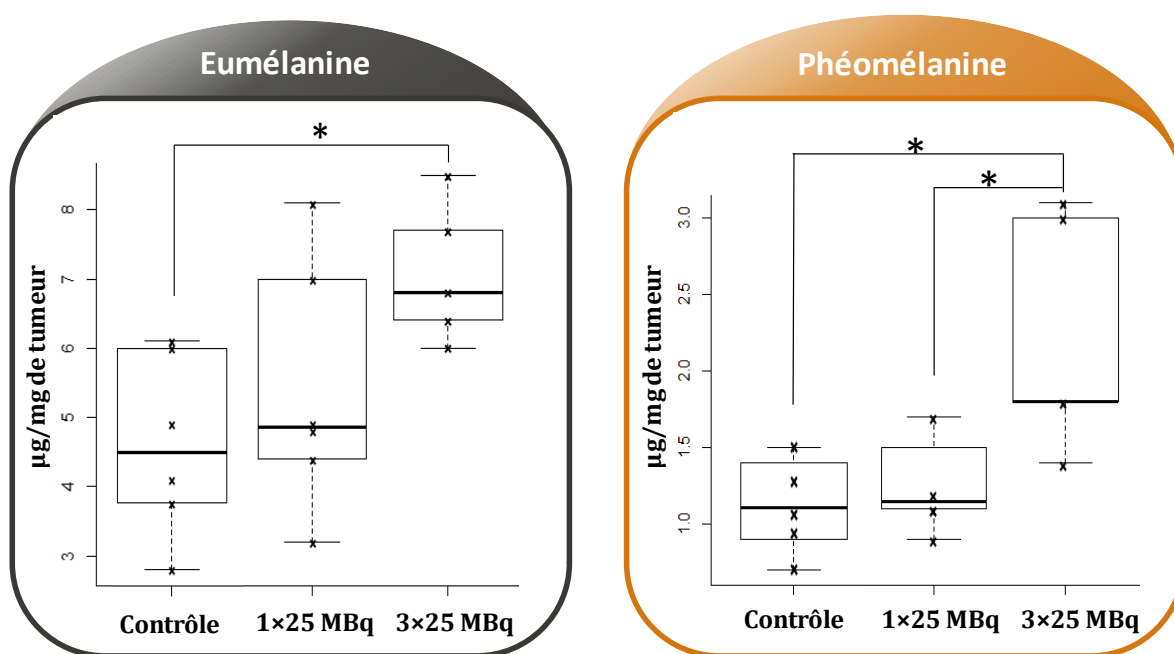


Figure 75 : Quantification par HPLC de l'eu/phéomélanine sur des tumeurs SK-Mel 3 traitées avec différentes doses d'131I]ICF01012.

2. Analyse de la pigmentation des tumeurs M2Gen

Après une analyse spectrophotométrique, une augmentation de la concentration en mélanine dans les tumeurs traitées par rapport aux tumeurs contrôles (respectivement 24,0 vs 14,7 µg/mg de tumeur, valeur médiane) est déterminé. Les analyses statistiques n'ont pas pu être réalisées à cause du faible nombre d'animaux dans les différents groupes. L'analyse en HPLC de ces tumeurs a permis de confirmer cette tendance (**Tableau 12**) et de mettre en évidence la présence des deux mélanines. L'eumélanine est la mélanine

principalement présente (médiane : 19,7 µg/mg) par rapport à la phéomélanine (médiane : 2,8 µg/mg).

Groupes	Spectrophotométrie	HPLC
Contrôle	14,7 µg/mg	29,7 µg/mg
3× ^[131I] ICF01012	24,0 µg/mg	41,1 µg/mg

Tableau 12 : Concentration en mélanine totale dans les tumeurs M2Gen contrôles et traitées avec 3 doses d'^[131I]ICF01012. Les valeurs médianes sont exprimées en µg par mg de tumeur.

3. Analyse de la pigmentation des tumeurs M4Beu

La concentration en mélanine dans les tumeurs M4Beu est vraiment très faible, quel que soit le groupe. L'analyse en HPLC a permis de déterminer une concentration de 0,4 µg/mg pour les tumeurs contrôles, 1,22 µg/mg pour les tumeurs 1×^[131I]ICF01012 et 7,76 µg/mg pour les tumeurs 3×^[131I]ICF01012. Le nombre restreint d'échantillon disponible n'a pas permis de réaliser des tests statistiques.

4. Relation entre pigmentation et agressivité tumorale

La lignée B16Bl6, hyperpigmentée, est décrite comme hautement invasive (Poste et al., 1980; Rondepierre et al., 2009). Afin de caractériser l'effet de la pigmentation sur l'agressivité, une inactivation de la tyrosinase est réalisée grâce la transfection de shRNAs dirigés contre cette enzyme. Les plasmides utilisés, nommés de A à D, présentent des séquences de 29 nucléotides dirigés contre des régions différentes de l'ARNm du gène *Tyr*. Le plasmide Ori contient une séquence aberrante.

La conséquence directe de l'inhibition de la tyrosinase est une diminution de la production de mélanine. Une diminution significative de la concentration en mélanine est observée dans les clones B et D (2,4 et 4,5 µg/M de cellules, respectivement) par rapport aux cellules contrôles (9,4 µg/M de cellules). Cette diminution est de 74% pour le clone B et 52% pour le clone D (données non présentées). En revanche, les clones A et C n'ont pas présentés de modification significative de leur taux de mélanine.

L'effet de la pigmentation a ensuite été évalué sur la prolifération (**Figure 76A**) et une augmentation de ce paramètre est observée au temps 96 heures entre les clones B et D par rapport aux groupes contrôle et Ori. De plus, une augmentation significative de l'invasion est observée pour les clones B (440 cellules/mm²) et D (509 cellules/mm²) par rapport au clone Ori (145 cellules/mm²) (**Figure 76B**). La diminution de l'invasion du clone C (41 cellules/mm²) n'est pas significative par rapport au clone Ori. Les tests d'invasion ont été réalisés sur 24h et aucune différence de prolifération n'est observée à ce temps.

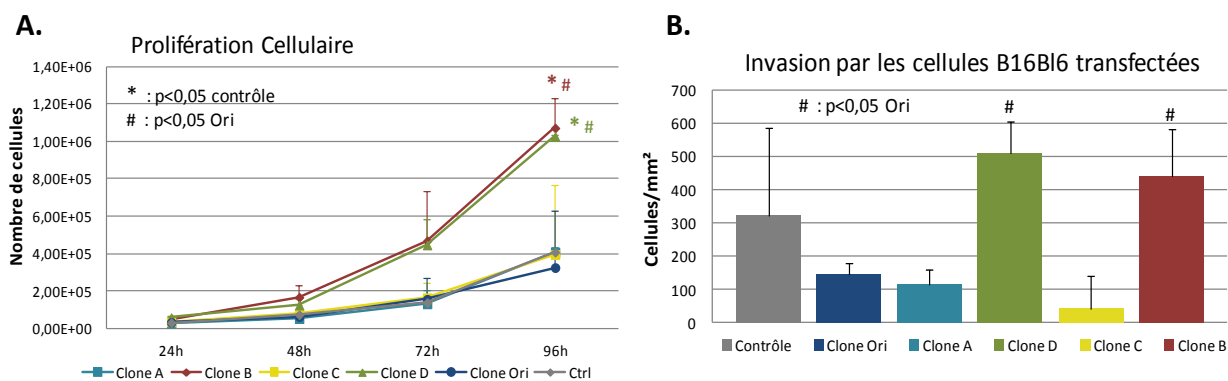


Figure 76 : Effet de la diminution de la tyrosinase sur la prolifération cellulaire (A) et l'invasion (B).

5. Discussion

La mélanine joue un rôle ambigu dans l'agressivité tumorale. Chez des patients traités atteints de mélanomes, il a été montré que les lésions pigmentées étaient associées à un pronostic plus négatif que leurs homologues amélaniques (Brożyna et al., 2013). De part leurs fonctions initiales de protection de l'intégrité cellulaire, les mélanines sont également capables de capter les ROS et radicaux libres produit notamment par la radiothérapie et diminuent ainsi l'efficacité des traitements (Kunwar et al., 2012). Nous avons donc 1) évaluer les changements en termes de mélanines dans les tumeurs irradiées 2) tester in vitro l'effet des sh tyrosinase sur les lignées B16Bl6 en termes d'invasion /prolifération.

Assez logiquement [¹³¹I]ICF01012 induit dans les tumeurs irradiées une augmentation du taux de mélanine. En effet, l'effet premier de la radiothérapie vectorisée est la création de cassure double-brin de l'ADN. Ces cassures se traduisent par la phosphorylation de p53, qui induit à son tour la transcription du gène POMC et de la

production d' α -MSH (Hsiao and Fisher, 2014). La phéomélanine a été décrite comme initiatrice de ROS (Panzella et al., 2014) par rapport à l'eumélanine qui est plus stable. Il est donc intéressant de savoir si le traitement avec [131 I]ICF01012 enrichit la tumeur en eu/phéomélanine. Après traitement, le ratio en phéomélanine/eumélanine est inchangé, ce qui n'indique pas de synthèse préférentielle dans une voie ou dans l'autre. La production de mélanine est donc équivalente pour les deux voies de synthèse. Cette augmentation de mélanines pourrait entraîner un caractère moins invasif (Sarna et al., 2014), mais également conférer des résistances a des traitements ulterieurs (Brożyna et al., 2013; Kunwar et al., 2012).

Nous avons abordé le rôle de la pigmentation dans l'agressivité du mélanome en réduisant par shRNA l'enzyme tyrosinase. Les résultats préliminaires mettent en évidence une augmentation de la prolifération et de la capacité invasives des cellules inhibées en tyrosinase par rapport aux contrôles *in vitro*. Il a été montré que la mélanine pouvait altérer l'élasticité de la cellule et modifier sa capacité d'invasion (Sarna et al., 2014). Des expériences *in vivo* seront réalisées prochainement.

Le traitement avec [131 I]ICF01012 induit une augmentation de la mélanogenèse des deux voies de synthèse. Afin de connaitre l'affinité préférentielle d' [131 I]ICF01012 pour l'eumélanine ou la phéomélanine, des tests en Biacore sont envisagés.

III. [131 I]ICF01012 et dissémination

1. Effets sur les colonies pulmonaires

Les cellules murines B16Bl6 fortement pigmentées sont injectées en i.v. à raison de 150 000 cellules/200 μ l de PBS. Les cellules vont coloniser les poumons et après une semaine de croissance tumorale en interne, le traitement est inoculé aux animaux. [131 I]ICF01012 est injectée en i.v. à une dose de 18,5 MBq. Les animaux (n=10 par groupe) sont sacrifiés 13 jours après la radiothérapie, les poumons sont prélevés et une évaluation de l'envahissement pulmonaire est réalisée.

L'estimation du nombre métastases n'a pas montré de différence significative entre les animaux traités (60,7 métastases) et contrôles (59,1 métastases). En effet, de nombreuses micrométastases, visibles uniquement sous loupe binoculaire, sont présentes sur les poumons traités. En revanche, une modification de la taille des métastases est nettement perceptible (**Figure 77A et Figure 78**) entre les deux groupes. Cette différence a une répercussion sur le poids des poumons, avec une augmentation significative des poumons contrôles ($0,25 \pm 0,06$ grammes) par rapport aux poumons traités avec [^{131}I]ICF01012 ($0,17 \pm 0,04$ grammes) (**Figure 77B**) ($p < 0,05$, Test Student).

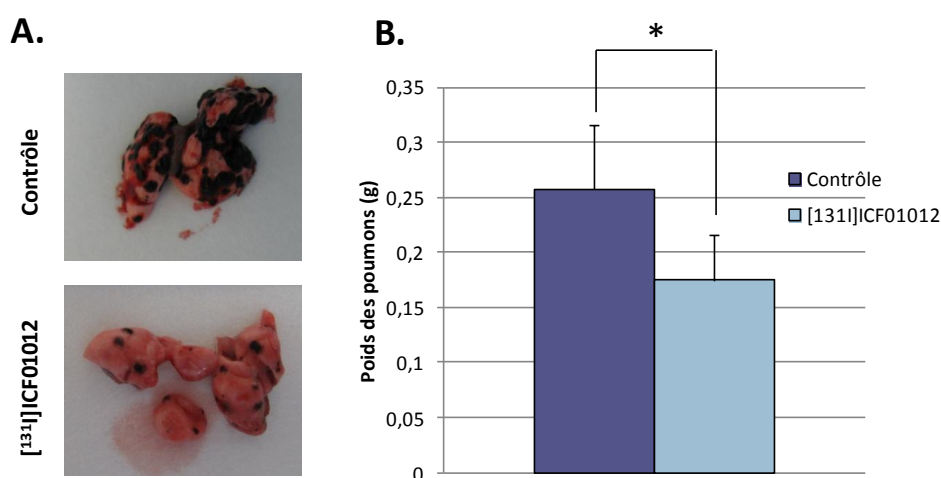


Figure 77: Effet d' [^{131}I]ICF01012 (18,5 MBq) sur des colonies pulmonaires B16Bl6. A) Photographie des poumons contrôles et traités prélevés 13 jours après la radiothérapie. Des micrométastases sont présentes sur les poumons traités. **B)** Le poids des poumons est significativement différent entre les groupes contrôles et traités ($p < 0,05$, Test Student).

Les analyses anatomopathologiques confirment la diminution de la taille des métastases dans le groupe traité (**Figure 78**). Aucune altération du tissu adjacent n'est retrouvée dans le groupe [^{131}I]ICF01012 (**Figure 78**), suggérant une absence d'effet sur les tissus adjacents.

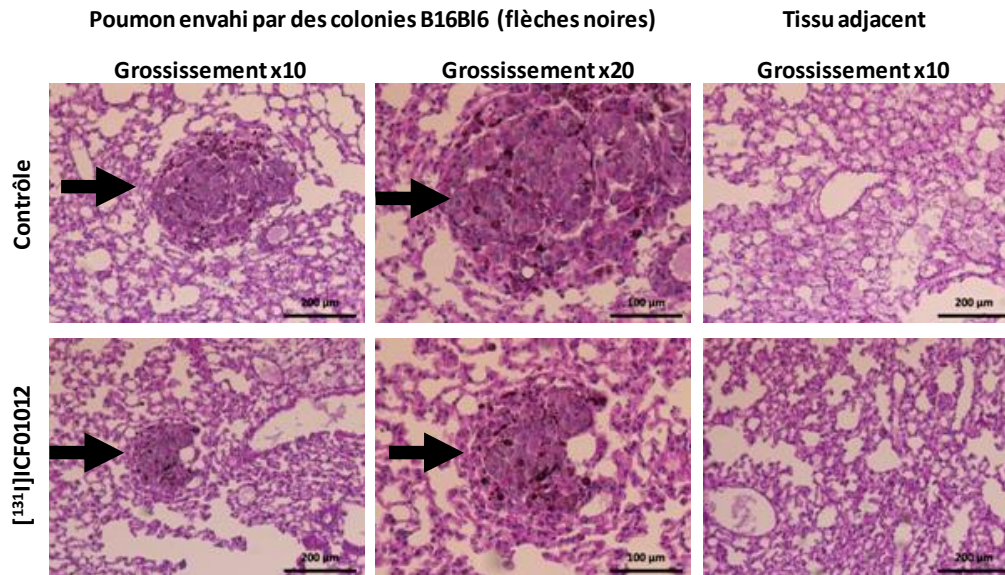


Figure 78 : Histologie des colonies pulmonaires B16Bl6 (flèches noires) et du tissu adjacent. Coloration HES, grossissement x10 ou x20.

2. Mise en place de la lignée B16Bl6 luminescentes

Suivre la dissémination à partir de la tumeur primitive jusqu'aux sites préférentiels est une idée séduisante. Lors de la catalyse de la luciférine par l'enzyme luciférase, un signal bioluminescent est émis et capté par une caméra optique. Cette technique permet de visualiser la présence de cellules dans un organisme. La transfection de la lignée B16Bl6 par le vecteur codant pour la luciférase pourrait permettre de suivre en temps réel l'envahissement et le développement de métastases pulmonaires.

a. Etudes *in vitro*

La lignée B16Bl6 a été choisie pour deux raisons principales : sa capacité de métastaser à partir de la tumeur primitive et sa forte pigmentation (Rondepierre et al., 2009). Les capacités invasives et la quantité de mélanine sont conservées après transfection (données non présentées). Les étapes de transfection n'ont pas modifié les caractéristiques des cellules B16Bl6. Nous avons évalué la relation entre le nombre de cellules et le signal bioluminescent. Ce signal, exprimé en radiance, est proportionnel à la quantité de cellules B16Bl6-Luc présentes entre 500 et 250 000 cellules (**Figure 79**).

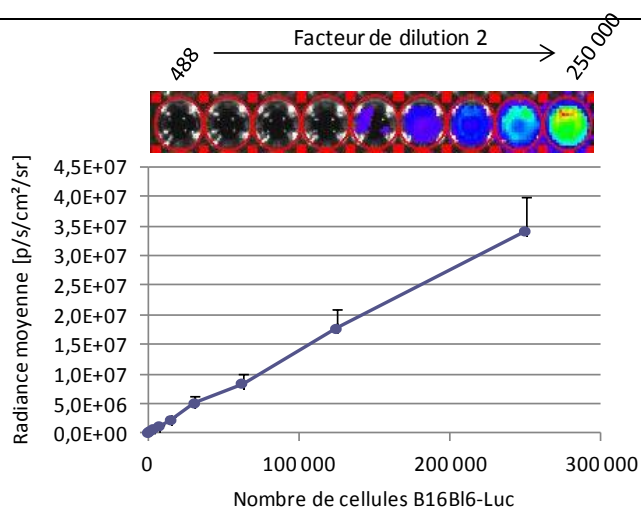


Figure 79 : Quantité de signal bioluminescent émis en fonction du nombre de cellules B16Bl6-Luc.

b. Croissance tumorale et métastases de la lignée B16Bl6-Luc

In vivo, la croissance tumorale de la lignée B16Bl6-Luc est semblable à celle mesurée chez la lignée d'origine (données non présentées). Dès 3 jours après l'inoculation cellulaire en sous-cutanée (300 000 cellules), l'émission de bioluminescence et la sensibilité de la caméra permettent de détecter des tumeurs encore non visibles (**Figure 80A**). Le temps de doublement du signal (3,06 jours), calculé à partir d'une quantification semi-quantitative, est similaire à celui de la croissance tumorale (2,86 jours).

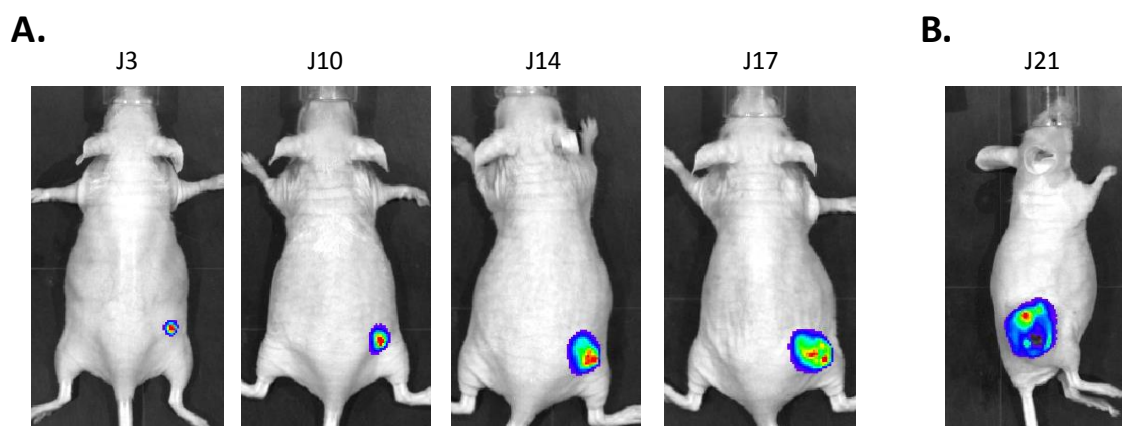


Figure 80 : Signal bioluminescent émis par les cellules B16Bl6-Luc après inoculation sous-cutanée. A) Augmentation du signal de J3 à J17 en fonction de la croissance tumorale. **B)** Aucun signal n'est détecté en cas de nécrose.

La bioluminescence est également le reflet de la topographie tumorale (**Figure 80B**). En effet, les zones totalement dépourvues de signal sont corrélés aux zones nécrotiques (visibles à l'œil). Inversement, les zones rouges, où le signal est le plus fort, pourrait être

corrélées à des régions où l'activité cellulaire est intense. Cette hypothèse n'a pas été vérifiée. Ce modèle a été développé pour étudier la dissémination cellulaire à partir de la tumeur primitive. L'identification et le suivi des cellules circulantes puis des métastases pulmonaires se sont avérés compliqués. Dans un premier temps, malgré nos efforts pour dissimuler la tumeur sous un tissu noir occultant, le signal bioluminescent provenant de la tumeur perturbe celui provenant des métastases (**Figure 81, souris B**). Ceci induit une estimation erronée de l'envahissement pulmonaire. Ensuite, il est délicat d'évaluer si le signal est pertinent ou non (**Figure 81, souris A**). Par exemple pour la souris A, un signal au niveau pulmonaire apparaît à J18, il disparaît 2 jours plus tard pour finalement ré-apparaître à J22. Il semblerait que le signal de J18 ne soit qu'un artefact, peut-être du au signal de la tumeur, et qui ne reflète en rien l'envahissement pulmonaire. Par ailleurs, la plupart des signaux n'apparaissent qu'à des stades tardifs, souvent le jour du sacrifice des animaux. La quantification *ex vivo* du signal provenant des colonies pulmonaires (**Figure 81, souris C**) aurait pu être une alternative pour l'évaluation de l'envahissement. Cependant, la quantité de signal émis est très dépendante du temps post-injection de la luciférine et un retard de 30 secondes peut changer l'estimation finale. En conclusion, l'ensemble de ces paramètres rend l'évaluation de l'efficacité d'un traitement très délicate. L'utilisation de ce modèle est controversée pour un suivi *in vivo* de la dissémination.

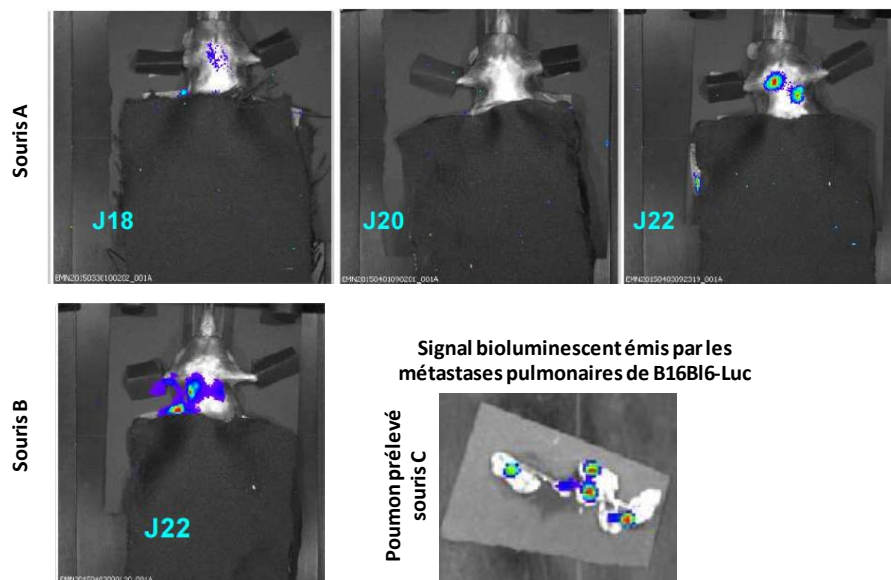


Figure 81 : Signal bioluminescent au niveau pulmonaire après une inoculation sous-cutanée de cellules B16Bl6-Luc. Les animaux sont placés en vue ventrale. Un tissu noir occultant est disposé sur la tumeur afin de dissimuler son signal.

c. Détection des cellules circulantes B16Bl6-Luc

Au vu des difficultés du suivi de la dissémination par imagerie, cette technique ne sera pas utilisée pour l'évaluation d'un traitement. Une autre approche, utilisant également la lignée B16Bl6-Luc est en cours d'essai. L'idée est de déterminer la présence de cellules circulantes par l'amplification de l'ADN luciférase en PCR. Les premiers résultats (non présentés) confirme la pertinence de cette hypothèse ainsi que sa faisabilité.

3. Discussion

Les différents essais sur la lignée B16Bl6 ont montré une diminution significative du nombre de métastases pulmonaires (Degoul et al., 2013, Viallard et al., en cours de soumission). Cependant, il est difficile de savoir si la RIV a agi sur la dissémination à partir des tumeurs primitives, sur les cellules circulantes ou sur les micrométastases installées. Nous avons abordé l'effet de la RIV sur les cellules circulantes avec le modèle des colonies pulmonaires qui se forment après injection i.v. des cellules tumorales. Ce faisant, nous étudions le passage de la circulation sanguine vers les tissus (processus d'extravasation) et le remodelage local pour l'installation des cellules tumorales (transition mesenchymo-épithélial) (Caramel et al., 2013). Dans ce modèle, nous montrons une diminution de l'envahissement tumoral, suggérant que la RIV est active sur des petites tumeurs et/ou sur des cellules circulantes. Il sera intéressant d'injecter les cellules en concomitance avec [¹³¹I]ICF01012 pour préciser son rôle sur les cellules circulantes.

Pour suivre en imagerie optique les processus de dissémination, nous avons construit une lignée B16Bl6-Luc. Cette approche reste à améliorer en raison d'une grande diffusion du signal de la tumeur primitive et l'exérèse de la tumeur primitive sera envisagée pour observer, sans diffusion du signal tumoral, la colonisation des poumons. Des modèles de cellules cancéreuses GFP ont déjà été utilisés pour l'évaluation du traitement par radioimmunothérapie interne sur des carcinomes péritonéales (Boudousq et al., 2010, 2013). Le suivi *in vivo* de l'évaluation des tumeurs pulmonaires par bioluminescentes sera poursuivi.

Mise en évidence des cellules souches de mélanome

Les CSC sont une sous-population de cellules tumorales qui peuvent être en partie responsables de la résistance aux traitements et de la reprise tumorale. Connaître l'effet d'une radiothérapie, notamment d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$, sur ce pool de cellules représente donc un intérêt réel dans la lutte contre le mélanome. Les premières étapes ont été de détecter l'expression des marqueurs CD133 et CD271 dans plusieurs lignées de mélanomes humains. Ces résultats préliminaires constituent une base pour évaluer par la suite l'effet d'une radiothérapie sur cette population.

I. Détection des cellules souches de mélanome

La recherche de cellules souches marquées CD133+ et/ou CD271+ a été effectuée sur trois lignées de mélanomes humains : A375, SK-Mel 3 et SK-Mel 28. A cause d'un nombre faible de cellules marquées (0,1 – 0,2 %), les deux premières lignées ne sont pas exploitées. Les cellules SK-Mel 28 qui présentent une expression de plus ou moins 3% pour les deux marqueurs, seront utilisées pour tester la radiosensibilité des CSC. En revanche, en raison de leur profil amélanique, une radiothérapie avec $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ ne peut pas être envisagée. Elle pourra être remplacée par une irradiation externe.

1. Mise en évidence dans une culture 2D

D'après les premières analyses, il apparaît que la confluence des cellules joue un rôle important dans l'expression de certains marqueurs de cellules souches. Les cellules SK-Mel 28, cultivées en 2D, ont étéensemencées la veille à différentes concentrations dans des flasques T75 cm² (**Figure 82**). Les résultats confirment que le pourcentage de cellules CD133+ ou CD271+ varie en fonction de la confluence des cellules. Ainsi, des cellules avec très peu de contact entre elles (50 000 cellules/flasque) expriment 8,2 % de marqueur

CD271+ et seulement 1,1 % de CD133+. Ces valeurs s'inversent lorsque les cellules sont cultivées à des concentrations beaucoup plus fortes. En effet, à un ensemencement à 3 000 000 cellules, les valeurs sont 1,3 et 3,7 % pour les marqueurs CD271+ et CD133+ respectivement (**Figure 83**).

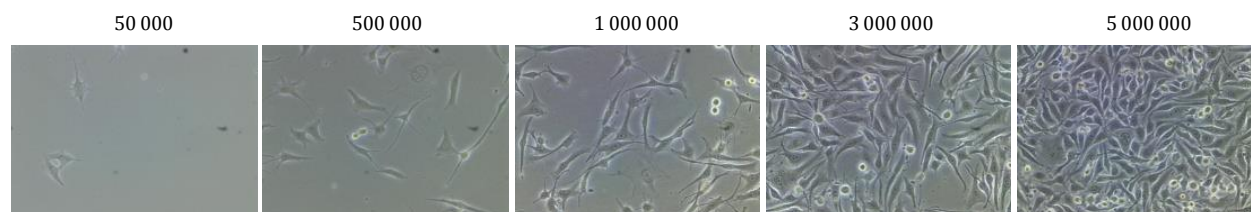


Figure 82 : Photographie des différents ensemencements des flasques T75 cm² avec des cellules SK-Mel 28.

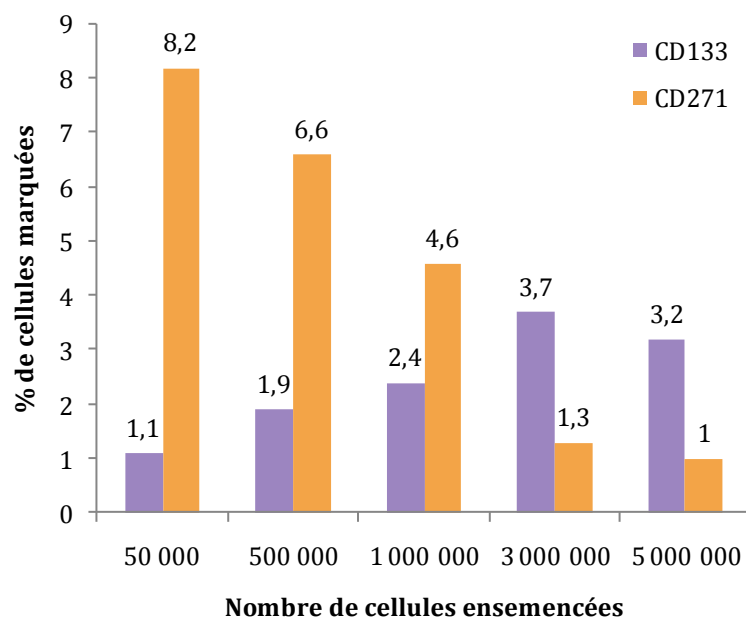


Figure 83 : Pourcentage des cellules SK-Mel 28 marquées CD133+ ou CD271+ en fonction de leur confluence en flasque T75 cm².

2. Mise en évidence des CSC en sphéroïde

En culture 3D, nous avons étudié l'expression des marqueurs CD133+ et CD271+ à différents stades après la formation du sphéroïde. Dans les premières heures qui suivent l'ensemencement dans les puits, les cellules s'agrègent entre elles. Puis elles se divisent et le sphéroïde augmente en taille. A partir d'un stade J4, les cellules s'échappent du sphéroïde

(Figure 84). Les marqueurs CD133+ et CD271+ ont été évalués sur des sphéroïdes au stade J1 jusqu'au stade J7. La tendance observée sur les cellules cultivées en 2D se retrouve dans la culture 3D. Ainsi, plus les cellules sont « à confluence », plus le marqueur CD133+ est exprimé, et inversement pour le marqueur CD271+ qui voit son expression chuter. Les cellules marquées CD133+ atteignent environ 20% des cellules totales à partir de J4. Cette expression reste ensuite stable jusqu'au stade J7. Le pourcentage des cellules marquées CD271+ chute rapidement, avec 1,65% au stade J1. Cette baisse continue pour atteindre environ 0% dans le stade tardif (**Figure 85**).

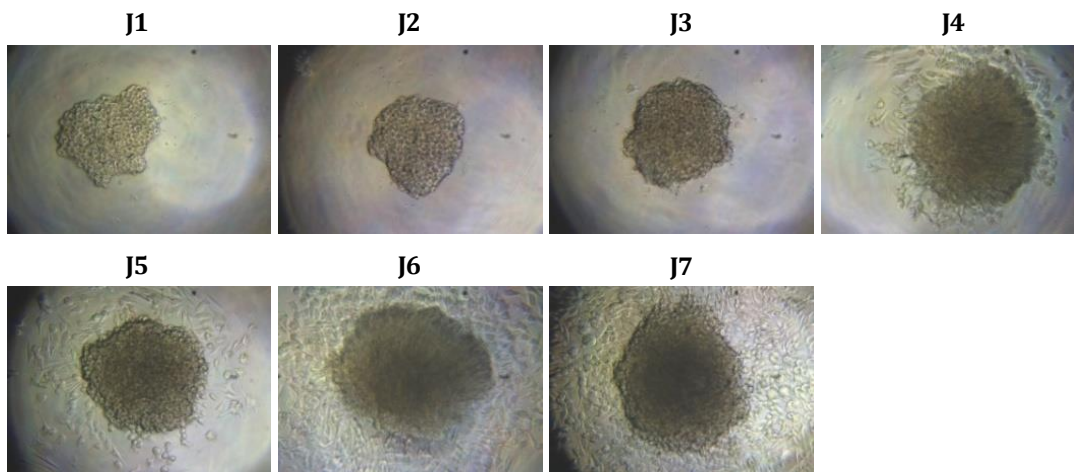


Figure 84 : Photographie des sphéroïdes SK-Mel 28 à différents jours après l'ensemencement en plaque 96 puits.

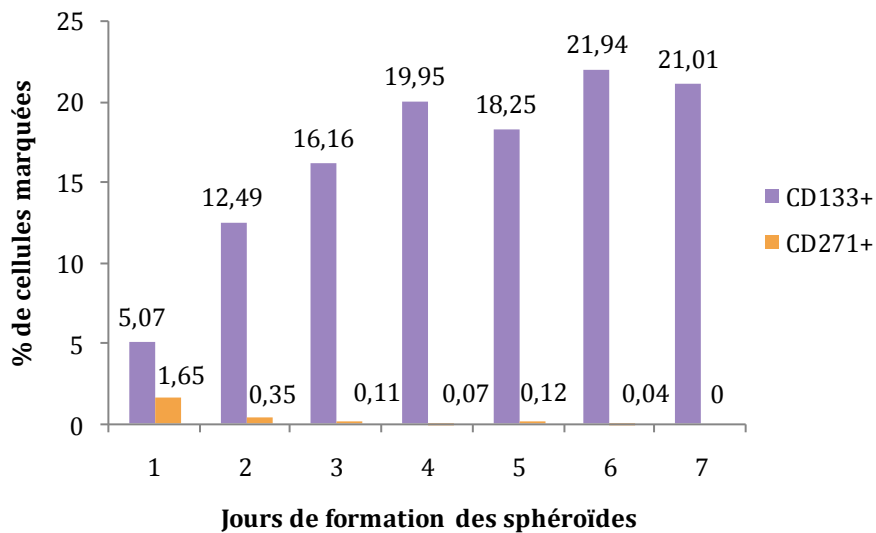


Figure 85 : Pourcentage des cellules SK-Mel 28 marquées CD133+ ou CD271+ en fonction du jour de la formation des sphéroïdes.

II. Discussion

Les cellules souches cancéreuses ont des adaptations cellulaires et génétiques qui leur confèrent une résistance aux approches thérapeutiques classiques. La présence de nombreux transporteurs transmembranaires tels que ABCB5, permet le relargage des agents chimiothérapeutiques dans l'espace extracellulaire, tandis que leur quiescence et leur forte capacité de réparation de l'ADN les protègent des effets de la radiothérapie (Colak and Medema, 2014). Les cellules souches cancéreuses pourraient être en partie responsables de l'échappement aux traitements. La lignée SK-Mel 28 est un bon modèle pour la caractérisation des marqueurs CD133 et CD271 suffisamment présents pour mettre en évidence les cellules qui les arborent par cytométrie en flux. De plus, cette lignée a la capacité de former des sphéroïdes. Ainsi, nous avons pu observer une augmentation des cellules CD133+ dans les cultures 3D par rapport à la culture 2D. En revanche, les cellules marquées CD271+ disparaissent presque complètement lors de la culture en sphéroïde. Cette modification de la quantité de cellules souches en fonction du type de culture a été reportée dans d'autres études. Sur des lignées A375, les cellules CD133+, CD271+ ou ABCB5+ diminuaient lorsque les cellules étaient cultivées en 3D, suggérant que ce type de culture induisait une différenciation cellulaire (Mo et al., 2013). Les stratégies pour cibler les CSC sont en plein développement. Ainsi, un anticorps ciblant les cellules CD133+ de cancer colorectal a montré une fixation spécifique à ces cellules (Lang et al., 2015). Des traitements non spécifiques détruisent également les CSC. C'est le cas de la RIT qui détruit l'ensemble des populations de mélanome sans distinction (Jandl et al., 2013) à l'inverse des thérapies classiques (Morrison et al., 2011). Il sera donc intéressant d'étudier l'efficacité d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ sur les sphéroïdes de la lignée SK-Mel 28 dont la mélanogenèse peut être restaurée par l'action du Psoralen (Isoldi et al., 2004) ou encore dans d'autres lignées de mélanomes pigmentés telle que SK-Mel 3.

Utilisation de radiosensibilisants pour potentialiser l'effet d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$

Le premier radiosensibilisant testé est le coDbait. Les principaux résultats et les conclusions seront exposés ci-dessous. L'article complet (Publication 2) en anglais sera présenté par la suite (p171-195). Par la suite, nous exposerons les résultats obtenus lors de la radiosensibilisation par les nanoparticules de gadolinium.

I. Potentialisation de la RIV par le coDbait

1. Présentation de l'article

La molécule $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ a montré une efficacité anti-tumorale sur le modèle syngénique B16Bl6 et le modèle de xénogreffe SK-Mel 3. Cependant, la régression tumorale n'était pas totale et un échappement au traitement, caractérisé par la reprise de la croissance tumorale, a été observé après l'arrêt du traitement. Pour optimiser les effets de la radiothérapie et réduire la radiorésistance du mélanome, le coDbait a été associé à $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$. Le coDbait est un radiosensibilisant qui mime une cassure double-brin d'ADN et leurre ainsi les mécanismes de réparation. L'objectif est d'évaluer l'efficacité de l'association $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ et coDbait sur deux modèles de mélanomes pigmentés. Une étude des mécanismes mis en jeu par ce double traitement complète ce travail.

2. Résultats

Les doses efficaces d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ dans les deux modèles avait été précédemment déterminées. Pour le modèle murin très pigmenté B16Bl6, une injection de 18,5 MBq est suffisante pour obtenir un ralentissement significatif de la croissance tumorale. En revanche, il est nécessaire d'utiliser une dose de 25 MBq répétée trois fois à une semaine d'intervalle pour avoir un effet sur les tumeurs SK-Mel 3. Enfin de sensibiliser les cellules tumorales à la radiothérapie, des injections intratumorales de coDbait complètent le traitement. Dans le modèle B16Bl6, les injections de coDbait (2 mg/injection) se font 5

heures avant l'injection de TRT (J0), puis aux jours 1, 4, 6 et 8. Dans le modèle SK-Mel 3, le coDbait (1 mg/injection) est administré 5 heures avant chaque TRT puis 24 et 48 heures après.

a. Effet sur la croissance tumorale et la survie des animaux

Dans le modèle B16Bl6, qui a une croissance rapide, l'association de traitement a montré une diminution significative de la croissance tumorale. Le temps de doublement des tumeurs double-traitées augmentent de 170 % par rapport aux tumeurs contrôles (4,5 vs 2,6 jours, respectivement). Associée à cet effet, la médiane de survie augmente par rapport aux animaux contrôles (18 vs 10 jours) et aux animaux simples traités (13 jours pour le coDbait et 15 jours pour [¹³¹I]ICF01012). Les études statistiques ont démontré que l'effet radiosensibilisant du coDbait provient d'un effet additif des deux molécules (Figure 1).

Dans le modèle SK-Mel 3, l'effet d'[¹³¹I]ICF01012 est amélioré par le coDbait, entraînant un ralentissement de la croissance tumorale. Chez les animaux double-traités, le temps de doublement est significativement augmenté par rapport aux animaux contrôles (25,1 vs 12,4 jours, respectivement). La croissance tumorale des tumeurs traitées avec [¹³¹I]ICF01012 + coDbait est réprimer pendant 2 mois après le traitement avant de rechuter. La médiane de survie des animaux [¹³¹I]ICF01012 + coDbait est significativement augmentée par rapport à celle des animaux contrôles (105 vs 58 jours, respectivement). Statistiquement, l'association entre [¹³¹I]ICF01012 et coDbait sur ce modèle de mélanome démontre clairement une synergie des deux molécules sur la survie des souris (Figure 3).

b. Evaluation des effets secondaires dans le modèle syngénique B16Bl6 (Figure 2)

Dans les deux études, le traitement a bien été toléré par les animaux avec une perte de poids qui n'excède pas 10% du poids initial. L'effet du double traitement sur les organes non-cibles pigmentés a été évalué sur les animaux C57Bl6. Les analyses de la rétine ont montré une diminution de la couche contenant les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien chez les animaux traités avec [¹³¹I]ICF01012. Cette altération se restreint autour du nerf optique et l'ajout de coDbait n'augmente pas la toxicité

d'^[131I]ICF01012. L'impact du double traitement sur les mélanocytes présents à la base des follicules pileux n'a montré aucune modification entre les différents groupes.

c. Mécanismes moléculaires associés à la RIV (Figure 4)

La radiothérapie interne induit des cassures double-brins d'ADN, et l'activation des protéines impliquées dans la réparation (γ H2AX, ATM-P, Chk2-P, P53S15, P21, pARP) et les modifications du cycle cellulaire ont été étudiées dans les deux modèles de mélanome. La lignée B16Bl6 est une lignée P53⁺ alors que P53 dans la lignée humaine est mutée entraînant un changement Arg267Trp (Forbes et al., 2006).

Activation des protéines de la réparation (Figure 4) :

Dans le modèle B16Bl6, en général, une augmentation de l'activation de ces protéines est observée chez les animaux traités avec ^[131I]ICF01012 +/- coDbait, excepté pour pARP et γ H2AX. Le taux basal de γ H2AX est même élevé chez les tumeurs contrôles, témoignant de l'instabilité génomique des cellules de mélanome (Gorgoulis et al., 2005). Ce profil est différent dans le modèle SK-Mel 3, avec un taux de γ H2AX faible dans les tumeurs contrôles et qui augmente dans les tumeurs traitées avec ^[131I]ICF01012 +/- coDbait. Par ailleurs, les niveaux de P53S15, ATM-P and Chk2-P sont plus élevés dans le groupe ^[131I]ICF01012 par rapport au groupe ^[131I]ICF01012 + coDbait. En revanche, dans ce modèle l'expression de p21 n'est pas corrélée avec l'activation de P53S15, suggérant une mutation de cette protéine. pARP n'est pas clivé, quel que soit le modèle tumoral ou le groupe, l'apoptose ne serait donc pas impliqué dans la mort cellulaire induit par les différents traitements.

Etude du cycle cellulaire (Figure 5) :

Lors de l'analyse du cycle cellulaire 24 heures après le traitement, les tumeurs B16Bl6 montrent une augmentation significative des cellules en phase G2/M chez les tumeurs traitées avec ^[131I]ICF01012 +/- coDbait comparées aux tumeurs coDbait et contrôles (33.8 \pm 3.5% et 27.1 \pm 1.9% vs. 12.9 \pm 1.2% et 7.9 \pm 1.7%). Un arrêt prolongé des cellules conduit à la sénescence, ce qui pourrait être la cause de la mort cellulaire dans ce

modèle. En revanche dans le modèle SK-Mel 3, il n'y a pas d'arrêt de cycle en G2/M mais une accumulation des cellules en phase S pour le groupe double-traité. Conformément aux résultats trouvés précédemment en western blot, il y a bien présence de cassures double-brins, caractérisées par la présence de la phosphorylation γ H2AX mais il n'y a pas d'expression de p21, donc pas d'arrêt du cycle. Les cellules tumorales qui ne stoppent pas leur cycle cellulaire en dépit de la présence de cassure d'ADN entrent en catastrophe mitotique et après un certain temps, finissent par mourir de nécrose ou d'apoptose. Les études histologiques sur des tumeurs B16Bl6 prélevées longtemps après l'irradiation (10 jours) montrent un phénotype caractéristique : une population de cellules géantes atypiques, avec un cytoplasme étendu et des nucléoles est observée. Cette population n'a pas été observée dans le modèle SK-Mel 3 car les prélèvements ont été effectués trop précocement (24 heures).

3. Discussion

En conclusion, la survie et la croissance tumorale ont été améliorées chez les animaux recevant le traitement combiné par rapport au groupe contrôle ou traitements simples, et ceci dans les deux modèles de mélanomes pigmentés. Dans le modèle B16Bl6, il y a un effet additif des deux molécules. L'effet est synergique dans le modèle SK-Mel 3. Dans les deux modèles, le traitement avec [¹³¹I]ICF01012 a entraîné des cassures de l'ADN, suivi par une activation d'ATM et de p53S15. La protéine p21 a été identifiée dans les cellules murines mais pas dans les cellules humaines. En effet, les cellules SK-Mel 3 sont p53 muté (Arg267Trp) qui ne permet pas la transcription de p21. La perte de fonction de p53 est associée à un ralentissement de la phase S après une irradiation, témoin de cassures non réparées et pouvant conduire à la mort cellulaire. Un autre aspect important est la présence de cassures double-brins spontanées en grand nombre dans les cellules B16Bl6 et dans une moindre mesure dans les cellules SK-Mel 3, suggérant des mécanismes de réparation actifs mais variables d'un modèle à l'autre. Malgré des caractéristiques génétiques différentes entre les cellules qui peuvent faire varier leurs radiosensibilités, l'inhibition et/ou la désorganisation des systèmes de réparation par le coDbait a clairement augmenté l'efficacité d' [¹³¹I]ICF01012, et ceci quel que soit le profil génotypique et phénotypique des

lignées de mélanome. Le transfert clinique de la molécule [¹³¹I]ICF01012 est en cours. Une première étude d'escalade de dose inclura dans patients atteints de mélanomes de stade IV sans tenir compte des mutations somatiques, notamment au niveau de la voie des MAP kinase. L'utilisation du coDbait peut être envisagée en supplément afin de réduire les mécanismes de radiorésistance qui se produisent dans les tumeurs. Les résultats obtenus dans les modèles précliniques pour l'association de [¹³¹I]ICF01012 avec le coDbait promettent d'améliorer encore l'efficacité de la radiothérapie pour les patients atteints de métastases pigmentées résistantes aux thérapies conventionnelles.

ARTICLE 2

Combining DNA repair inhibitor coDbait and targeted radionuclide therapy in melanoma preclinical models

Viallard C, Chezal JM, Mischellany F, Ranchon-Cole I, Pereira B, Herbette A, Besse S, Boudhraa Z, Jacquemot N, Cayre A, Miot-Noirault E, Sun JS, Dutreix M, Degoul F

Journal of Nuclear Medicine

Submitted

2015

Combining DNA repair inhibitor coDbait and targeted radionuclide therapy in melanoma preclinical models

Short running title: Radionuclide therapy improved by coDbait

Claire Viallard¹, Jean-Michel Chezal¹, Florence Mishellany², Isabelle Ranchon-Cole³, Bruno Pereira⁴, Aurélie Herbette⁵, Sophie Besse¹, Zied Boudhraa¹, Nathalie Jacquemot³, Anne Cayre², Elisabeth Miot-Noirault¹, Jian-Sheng Sun⁶, Marie Dutreix⁵, Françoise Degoul¹(✉)

1. Clermont Université, Université d'Auvergne, Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France. Inserm, U 990, F-63000 Clermont-Ferrand, France.
2. Anatomopathology department, Centre Jean Perrin, Comprehensive Cancer Center, 58 rue Montalembert, 63011 Clermont-Ferrand, France.
3. Clermont Université, Université d'Auvergne, UFR Pharmacie Laboratoire de Biophysique Neurosensorielle, Inserm U 1107, Clermont-Ferrand, F-63001 France
4. DRCI, CHU, 63003 Clermont-Ferrand
5. CNRS-UMR3347, INSERMU1021, Institut Curie, Université Paris Sud, Bat 110, centre Universitaire 91405 Orsay, cedex
6. DNA Therapeutics, SA, 4 rue Pierre-Fontaine, 91058 Evry Cedex

Disclosure of potential conflict of Interest:

M. Dutreix and J-S Sun are cofounders of DNA therapeutics.

***Corresponding author: Dr Françoise DEGOUL, PhD** UMR 990 INSERM Uda, Rue Montalembert, BP 184

63005 Clermont-Ferrand cedex Tel : (33) 04 73 15 08 14; fax: +33 47 315 0801

E-mail : francoise.degoul@inserm.fr

First author: Claire Viallard, PhD student, UMR 990 INSERM Uda, Rue Montalembert, BP 184

63005 Clermont-Ferrand cedex Tel : (33) 04 73 15 08 14; fax: +33 47 315 0801

claire.viallard@inserm.fr

Word count (excluding abstract): 5102

Financial support: This work was supported by an INCA grant. CV was supported by a fellowship from INSERM/Auvergne Council.

Abstract

Rationale: Melanoma resistance to therapeutics remains a challenge. Alongside chemotherapy and immunotherapy, targeted radionuclide therapy (TRT) using radiolabelled melanin ligands offers an alternative for the efficacious treatment of disseminated pigmented melanoma. We previously demonstrated that [¹³¹I]ICF01012, a melanin-targeting ligand, induced a significant slowing of melanoma growth. To overcome melanoma radioresistance and increase TRT efficacy, we studied the combination of pan DNA repair inhibitor coDbait and [¹³¹I]ICF01012 in murine (B16Bl6) and human (SK-Mel 3) melanomas. **Methods:** Mice bearing B16Bl6 and SKMel3 preclinical models were treated by intravenous injection of [¹³¹I]ICF01012 (18.5 MBq and 75 MBq, respectively) and/or with intra and peri-tumoral injections of coDbait (10 mg). Tumor growth and mice survival were followed. Anatomopathological and molecular studies were performed on *in vivo* samples. Statistical analyses were performed by ANOVA followed by post-hoc tests and by log Rank tests and considered significant when $p < 0.05$. **Results:** In both models, the addition of coDbait enhanced TRT efficacy as estimated by tumour growth and median survival parameters in [¹³¹I]ICF01012 + coDbait group vs. control and single treatment groups. While an additive effect of co-Dbait and TRT was observed in B16Bl6, a synergistic one was pointed out in the slow growing SK-Mel 3 tumours. CoDbait did not worsen the DNA lesions induced by TRT, but aborted or delayed their repair as observed by the presence of micronuclei in B16Bl6 tumours and by cell cycle blockade in S phase in SK-Mel 3 tumours. Also, coDbait combination with TRT did not induce any general toxicity or increase TRT side effects in pigmented tissues (e.g. hair follicles, eyes). **Conclusion:** Combination of [¹³¹I]ICF01012 with coDbait is thus a promising treatment for patients with pigmented metastatic melanoma.

Keywords: Targeted radionuclide therapy, melanoma, coDbait, DNA repair.

Introduction

Melanoma caused 55 000 deaths in 2012, accounting for 0.7% of all deaths from cancer ¹. The pejorative features of this cancer reside in its metastatic propensity and its high resistance to treatments, leading to frequent relapse for new targeted and immunotherapies ². A specific trait of cutaneous melanoma is the presence of biopigments, namely melanins, initially produced by melanocytes to protect skin from UV radiation. These polymers can serve as a melanoma-specific target through the use of melanin-targeting ligands such as antibodies ³ or small molecules of the arylcarboxamide family ⁴. In preclinical models, different arylcarboxamide derivatives (ICF01012; MIP-1145) labeled with a β^- -emitting radionuclide (iodine-131, $t_{1/2} = 8.02$ d) induced significant slowing of tumour growth ⁵⁻⁸. In a first human study, an MIP-1145 analogue, [¹³¹I]BA52, was associated with a 2-year survival in 3/5 patients with metastatic melanoma ⁹. This study is important since it underlines the safety and efficacy of melanin-TRT against disseminated melanomas and the need to stratify patients. Melanins are present in 32–60% of analyzed metastases as demonstrated in a SPECT-CT imaging study with the melanin radiotracer [¹²³I]BZA2 ¹⁰. We also demonstrated a clear correlation between melanin content and melanin-TRT efficacy in preclinical models ^{6,11}. The dosimetry is obviously a major point for successful radiotherapy; however, the maximum administrable dose is limited due to potential adverse effects on retina pointed out in highly pigmented mice ⁸, but not yet reported in humans ⁹. A way to increase the efficacy of radiation is to use radiosensitizers. Melanoma has long been considered as a radioresistant tumour ¹² and this recalcitrance may firstly stem from the presence of melanins acting as a free-radical shield around the melanoma cell nucleus. In fungi, melanins do exert a radioprotective role by quenching free electrons and free radicals generated from water hydrolysis or by scattering Compton effects ¹³. Secondly, melanoma presents a high DNA instability counterbalanced by efficient repair mechanisms ¹⁴⁻¹⁶, which contributes to radioresistance ¹⁷. Modifying the DNA repair system is therefore of interest to radiosensitize melanoma. Various

entities possess such properties, such as PARP inhibitors currently undergoing clinical trials ¹⁸. However, coDbait disorganizes the “pan” DNA repair system ¹⁹⁻²¹. It has been tested on different tumours in combination with both external beam radiotherapy (EBR) ^{22,23} and chemotherapy ²⁴. When administered subcutaneously, coDbait did not induce toxicity in rats or monkeys ²⁵. To date, no study has investigated the combination of coDbait with TRT. Therefore, the ability of coDbait to radiosensitise melanomas to [¹³¹I]ICF01012 TRT was tested in syngeneic murine B16Bl6 and human xenograft SK-Mel 3 in which we previously studied the effect of TRT ^{6,11}. We also evaluated the side effects the syngeneic model and mechanisms underlying TRT ± coDbait in both melanomas.

Materials & Methods

Cell culture and coDbait

Murine B16Bl6 and human SK-Mel 3 melanoma cell lines were obtained from the laboratory of Prof. Fidler (Houston, Texas, USA) and American Type Culture Collection (ATCC, Biovalley, Marne-La-Vallée) and were cultured as previously reported ¹¹. B16Bl6 is a cell line wild type for p53, b-raf and n-ras genes ²⁶, while SK-Mel 3 harbours mutated P53 (Arg267Trp) and B-RAF (V600E) phenotypes ^{27,28}. Dbait fused with cholesterol (coDbait) was from DNA Therapeutics (Evry, France) and corresponds to clinical DT01 ²¹.

Tumour models

Male C57BL/6J mice and female Nude mice (6 weeks old) were obtained from Charles River Laboratories (L'Abresle, France). All animal studies were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the ethics committee (C2E2A, number CE64-12). To establish the tumours, 3×10^5 B16Bl6 cells (C57BL/6J mice) and 5×10^6 SK-Mel 3 cells (Nude mice) in 100 μ L PBS buffer were injected subcutaneously into the right flank. Mice were i.v. injected with [¹³¹I]ICF01012 after 10 days for B16Bl6 (mean tumour volume: 30–100 mm³) and 35 days for SK-Mel 3 (mean tumour volume: 30–200 mm³). The length and width of the tumours were measured using a caliper. Tumour volume was determined with the formula: volume (mm³) = (length (mm) \times width² (mm))/2. Mice were weighed three times per week and sacrificed when tumours reached 2000 mm³. This endpoint was considered as day of death in survival analyses.

Radiolabelling of [¹³¹I]ICF01012

ICF01012 was labelled with [¹³¹I]NaI (881-1472 GBq, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) at high specific activity using a radioiododestannylation reaction as described elsewhere ⁵. [¹³¹I]ICF01012

was obtained with good radiochemical yields (60–87%), high radiochemical purities (>98%) and specific activity in the range 57–115 TBq/mmol.

Radiotherapy protocols for mice bearing melanomas

After 10 days and 35 days of tumour growth, [¹³¹I]ICF01012 treatment was administered intravenously in mice bearing B16Bl6 (18.75 MBq, day 0) and SK-Mel 3 (3 × 25 MBq, days 0, 7 and 14) melanomas, respectively (see supplementary Fig). Two independent experiments with 10 mice per group were performed for the B16Bl6 model, and one experiment with 6 mice per group for the SK-Mel 3 model. In both models, coDbait diluted in 5% glucose was injected into the tumour and in the peritumoral area 5 h before each TRT (2 mg and 1 mg for B16F6 and SK-Mel3, respectively). Further injections of coDbait were made at days 1, 4, 6, 8 after TRT for B16Bl6 (2 mg per injection) or at 24 h and 48 h after each radiotherapy for the SK-Mel3 model (1 mg per injection). Controls received 5% glucose solution in the same manner. For molecular studies, three additional mice per group were killed 24 h and/or 10 days post-irradiation. Tumours were removed and divided into two parts, one fixed in AFA for histology and one frozen in liquid N₂. Metastases were counted on lung using a binocular microscope.

Histological analyses

Histological (tumours and eyes) and cell cycle analyses were performed as previously described⁸. Briefly, normal skin and melanoma tumour pieces fixed in formol solution were mounted in paraffin. 4 µm slices were stained with haematoxylin-phloxin saffron (HPS). An anti-PS100 antibody (Dako) was used to stain melanocytes. The secondary horseradish peroxidase (HRP) antibody was visualized with diaminobenzidine (DAB). The number of melanocytes was quantified as the number of PS100-positive cells per field. At least three fields per slide were counted by a pathologist. The necrotic cells were identified as cells with intense nuclear labelling (pycnotic nuclei) and a very red cytoplasm, and the percentage of necrosis referred to the necrotic area relative to the tumour area.

Micronuclei assessment was performed on HES staining as previously described ²¹, approximately 3 500 cells per groups have been counted.

Eyes were placed in fixative solution and embedded in paraffin. Sections of 5 µm were cut and prepared for haematoxylin-eosin saffron staining. The thickness of the retina pigment epithelium and that of photoreceptor were measured both near to and far from the optic nerve using MetaMorph software from the CICS platform (Clermont-Ferrand, France).

Flow cytometry DNA analysis

B16Bl6 tumor samples were mechanically disaggregated in PBS solution with 26G needles and filtered through a 70 µm nylon filter. The suspensions of cells were spun (400 g, 8 min, 4 °C), and the supernatant was removed. The dry pellets obtained were suspended in 500 µL of ribonuclease A (1 mg/ml, Sigma-Aldrich, France), and 500 µL of propidium iodide (0.1 mg/mL, Sigma-Aldrich) were added. After 30 min at 4 °C in the dark, events in the different cell cycle phases were gated manually using the BD-LSRII flow cytometer (CICS platform, FACS Diva software (BD Biosciences), Clermont-Ferrand, France) at wavelengths of 488 nm (excitation) and 620 nm (emission). The data were analyzed with ModFit LT cell-cycle analysis software (Verity Software House, Topsham).

Molecular studies

For Western blot, proteins were extracted from 10 mg of crushed tumour in buffer (6 M urea, 5 mM NaF, 2.5 mM sodium pryrophosphate, 1 mM EDTA, 0.5% TritonX100, 1 mM activated sodium orthovanadate, 1X protease inhibitors). Proteins (30 µg) were separated in 8% or 12.5% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, St Quentin-en-Yvelines, France). We used the following antibodies: ATM-S1981P (36810, Abcam, Paris, France), Chk2-T68P (85743, Abcam), p53-S15P (9284, Cell Signalling, Ozyme, St-Quentin-en-Yvelines, France), γH2AX (2577, Cell Signalling), p21 (6246, Santa Cruz, Clinisciences, Nanterre, France), and GAPDH (25778, Santa

Cruz). VEGF level was determined by ELISA (Raybiotech, Tebu-bio SA, Le Perray-en-Yvelines, France) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm SD except for Figures 1a and 3a where they are represented as mean \pm SEM. Statistical analyses were conducted using Stata software (version 13, StataCorp, College Station, TX, US). A two-tailed p value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance. Comparisons concerning quantitative parameters (Western blot quantification, VEGF content, lung metastases distribution, tumour doubling time) between treatment groups were made using ANOVA or a non-parametric Kruskal-Wallis test according to ANOVA hypotheses (assumption of normality studied by Shapiro-Wilk and homoscedasticity by Bartlett's test). When appropriate (previous tests such as $p < 0.05$), an appropriate *post hoc* test (Pht) was considered: Tukey-Kramer (TK) followed ANOVA and Dunn (D) for Kruskal-Wallis. Censored data (survival) were estimated using the Kaplan-Meier method. The log-rank test was used in univariate analysis to compare independent groups. The results were expressed as hazard ratios (HR) after Cox proportional hazards regression (Cox). The type of interaction was described as additive when corresponding to the effect being equal to that of the theoretically calculated effects of [¹³¹I]ICF01012 or coDbait alone and supra-additive (synergistic) when the effect of combined [¹³¹I]ICF01012 plus coDbait is considered to be more efficient than the calculated effect of single use.

Results

CoDbait treatment plus TRT strongly slowed tumour growth and increased survival in the syngeneic B16Bl6 model by disturbing DNA repair

The administration of coDbait (5 sessions of 2 mg) during the first week following TRT significantly increased [¹³¹I]ICF01012 efficacy (Figure 1). [¹³¹I]ICF01012 + coDbait significantly slowed B16Bl6 tumour growth, the tumour doubling time (DT) being extended by 170% compared with control. Combined treatment was significantly better than either single treatment (Figure 1a) (PHT, $p < 0.001$ compared with control and coDbait groups, $p = 0.04$ compared with [¹³¹I]ICF01012 group). The evolution of tumour growth using the random effects model demonstrated the additional effects of both molecules. Likewise, median survival increased significantly for mice receiving [¹³¹I]ICF01012 + coDbait treatment (18 days) compared with control (10 days) (Cox, $p < 0.001$) and the single-treatment groups (13 and 15 days for coDbait and [¹³¹I]ICF01012, respectively) (Cox, $p = 0.001$ and $p = 0.05$, respectively) (Figure 1b). Decrease of lung metastasis number by TRT was not further improved by addition of coDbait (Supplementary Figure 2a) nor was the VEGF tumor content (Supplementary Figure 2b).

Histology analyses were performed on B16Bl6 tumours removed 24 h (2 mg of coDbait) or 10 days (10 mg of coDbait) after irradiation (18.5 MBq). Morphological alterations following TRT (Supplementary Figure 2c) were not increased with coDbait. At 24 h, the mitotic index decreased similarly in TRT and TRT + coDbait (mean: 14 and 13 mitoses per 10 high fields) compared with control and coDbait tumours (mean: >20 mitoses per 10 high fields). Interestingly, 24 h post-TRT, necrosis was significantly increased (PHT, $p < 0.001$) in the combined treatment group compared with the others (Supplementary Figure 2d). Interestingly, ten days after the treatments, the number of micronuclei was significantly higher in tumours receiving TRT + coDbait (Figure 1c).

CoDbait treatment plus TRT did not worsen [¹³¹I]ICF01012 toxicity.

As [¹³¹I]ICF01012 targets pigmented organs, toxicity effects were studied in eyes and skin. As no histological damage was detected on the ciliary body and choroid structures ⁸, we focused the analyses on retinal changes, specifically in the outer nuclear layer containing photoreceptors and retinal pigmentary epithelium. Compared with the control group, we observed a significant decrease in retina thickness immediately around the optic nerve area 10 days following irradiation in mice receiving [¹³¹I]ICF01012 (REM, $p < 0.001$) or [¹³¹I]ICF01012 + coDbait (REM, $p < 0.001$), but no additional reduction with coDbait, the difference between the two irradiated groups being non-significant (Figure 2a). The reported leukocyte decrease (Figure 2b) and slight weight loss (Figure 2c) induced by TRT were not modified by the addition of coDbait. These results suggest that coDbait addition to TRT did not increase TRT adverse effects or induce specific toxicity. We evaluated the impact of the combined treatments in hair follicle melanocytes revealed by counting PS100-labelled cells (Figure 2d). The number of melanocytes was identical in controls, single and associated treatment groups (3 to 5/fields, 10 fields counted) (Figure 2e).

Combination with coDbait significantly enhanced [¹³¹I]ICF01012 radiotherapy efficacy in SK-Mel 3 human melanomas

[¹³¹I]ICF01012 (3 x 25 MBq) injection in the SK-Mel 3 model produced a significant slowing in tumour progression compared with control group (doubling time: 12.4 vs 25.1 days, PHt, $p = 0.006$). In SK-Mel 3, the effect of [¹³¹I]ICF01012 was improved by coDbait, leading to slowed tumour growth (Figure 3a) (PHt, $p = 0.06$). The benefit of the association between TRT and coDbait was statistically supra-additive demonstrating a clear synergy of the two molecules on tumor growth control (comparison coDbait/combination: $p < 0.001$; comparison TRT/combination $p = 0.005$)

A statistically significant increase in the survival rate of mice receiving both compounds against single treatments was demonstrated (Cox, $p = 0.005$ and $p = 0.017$ compared with coDbait and

[¹³¹I]ICF01012 respectively) (Figure 3b). In parallel to tumor growth, the association between TRT and coDbait was again statistically supra-additive demonstrating a clear synergy of the two molecules on mice survival (comparison coDbait/combination: $p=0.005$; comparison TRT/combination $p=0.017$). Tumour growth was controlled for 2 months before relapse. Double treatment was well tolerated; weight loss did not exceed 10% of the initial animal weight (data not shown). Histology studies showed the emergence of cells with atypical nuclei and enlarged cytoplasm in tumours receiving [¹³¹I]ICF01012 ± coDbait (Figure 3c). In these groups necrosis was present in each animal and represented 20% in 2/5 mice with double treatment. The number of mitotic cells (<10 mitosis per 10 high fields) decreased compared with control groups (>15 mitosis per 10 high fields) (Figure 3d).

***In vivo* antitumour mechanisms of [¹³¹I]ICF01012 ± coDbait administration on B16Bl6 and SK-Mel 3 tumours**

[¹³¹I]ICF01012 TRT was expected to induce DNA double-strand breaks (DSB) and the subsequent repair mechanisms. We monitored the modifications (level and/or specific phosphorylation) of proteins involved in DNA repair and cell cycle control/death: γH2AX, ATM-S1981P, P53-S15P, P21, and PARP in both models and Chk2-T68P only in human tumours (Figure 4a and b). The basal γH2AX level was high in the B16Bl6 model with no significant modification observed in tumours receiving TRT and/or coDbait (Figure 4a), and low in SK-Mel 3 tumours: γH2AX increased in TRT ± coDbait groups compared with the controls (Figure 4b). However, ATM was shown to be phosphorylated at S1981 by [¹³¹I]ICF01012 in both models. ATM activation was also revealed by phosphorylation of P53 on serine 15 leading to an induction of P21 expression in only the B16Bl6 model. The levels of P53-S15P, P21, ATM-S1981P were not significantly changed with coDbait addition in B16Bl6, while P53-S15P, ATM-S1981P and Chk2-T68P levels were higher in [¹³¹I]ICF01012 than in [¹³¹I]ICF01012 + coDbait SK-Mel3 tumours (PHt test, $p < 0.05$) (Figure 4c and

d). CoDbait, by trapping repair systems, should increase tumour cell death. In both models, however, cleavage of PARP was not detected, indicating that apoptosis is not involved in the tumoural cell death induced by these treatments.

We then analyzed cell cycle modifications (Figure 5a and 5b). In the P53 wild-type B16Bl6 tumours display 24 h after treatment, a significant decrease in cells in G1 ($44.3 \pm 6.2\%$ and $52.5 \pm 1.5\%$ vs. $64.9 \pm 4.1\%$ and $65.7 \pm 3.5\%$) and an increase in G2/M cells ($33.8 \pm 3.5\%$ and $27.1 \pm 1.9\%$ vs. $12.9 \pm 1.2\%$ and $7.9 \pm 1.7\%$) could be observed between groups receiving or not receiving [^{131}I]ICF01012 treatment (PHt test, $p < 0.05$). This pattern suggests that [^{131}I]ICF01012 treated cells died from unrepaired damage that ultimately pass the G2/M checkpoint arrest leading to mitotic catastrophe in senescent or necrotic cells. Interestingly, coDbait addition significantly decreased G2/M blockade (PHt test, $p < 0.05$), suggesting that the disorganization of repair machinery could accelerate such cell death. In the human xenograft, 24 h following treatment, we did observe a progressive increase of cells in S phase from control to double treated groups that became significant in the [^{131}I]ICF01012 + coDbait group compared with controls (Figure 5b).

Discussion

Melanoma [¹³¹I]ICF01012 TRT is applicable on melanin-positive disseminated lesions. Using adapted dosimetry, tumour growth control and survival improvement can be observed in highly pigmented B16Bl6 tumours and moderate SK-Mel 3 pigmented tumours with 18.5 MBq and 3 × 25 MBq [¹³¹I]ICF01012 activities respectively ^{8,11}. We demonstrated here the possibility to increase [¹³¹I]ICF01012 TRT efficiency for melanoma growth control with a pan DNA repair disruptor ¹⁹⁻²¹. In both models, survival and tumor growth control were improved in mice receiving double treatment compared to those receiving single ones. This increase was shown to be additive for the B16Bl6 model and synergistic in SK-Mel 3 one. Assessment of radiosensitization required synergy demonstration, however the additive effects is also of clinical interest and may be linked in this case to the ability of cell to repair DNA .

In both melanoma models DNA DSBs were caused by [¹³¹I]ICF01012 TRT as shown by the activation of the DSB sensor ATM. ATM phosphorylation leads to P53 phosphorylation on serine 15 in the two tumor types , which in turn induces the expression of P21 but only in murine cells. Although P53 could undergo this modification in SK-Mel 3, the identified mutation (Arg267Trp) occurring in the DNA binding protein did not allow p21 transcription. On the contrary, in B16Bl6 tumours, P21 expression occurred and should block mitosis promoting factor activation (cyclin B1/CDk1; Chk1) ²⁹ leading to mitotic giant cells. No G2/M nor G1/S blockade was seen in the SK-Mel 3 receiving 25 MBq [¹³¹I]ICF01012. An important feature of human melanomas resides in a defective G2 checkpoint ^{16,29} that could abrogate G2/M blockage in irradiated SK-Mel 3 tumours. P53 loss of function has been associated with significant slowing of S-phase following irradiation ³⁰. An increase in cells in S-phase was observed in irradiated tumours, reaching significance with the addition of coDbait. Accumulation of cell in S-phase often reveals unrepaired damage that slows down the replication and may lead to cell death.

Another important parameter in radioresistance is the ability of tumour cells to repair DNA lesions. We observed a high basal rate of γ H2AX in B16Bl6 and to a lesser extent in SK-Mel 3 tumour controls, indicating the presence of spontaneous DNA breaks or replication stress ^{17,31}, and suggesting active repair mechanisms. Inhibiting and/or disorganizing DNA repair system by coDbait clearly increased the effects of [¹³¹I]ICF01012 TRT in both models in regard to growth control and survival. In irradiated B16Bl6 tumours, micronuclei that testify the lack of effective DNA repair were higher in double treated tumours. These radiosensitizing effects are comparable to those observed in preclinical models treated by EBR ^{21,23}. Interestingly, coDbait injection alone induced a non-significant decrease in tumour growth as previously reported ²³. CoDbait was shown to capture proteins involved in DSB and single strand-break repair ¹⁹ and so should enhance tumour cell death. We observed this effect in B16Bl6 irradiated tumours receiving coDbait injection compared with TRT alone, with a significant increase in necrosis. For SK-Mel 3 tumour, we have cell cycle blockade after one irradiation plus coDbait, which might be increased in treatment conditions after the two additional cures. The positive association of coDbait with TRT on melanoma whatever their p53 and b-raf status is of importance in treating patients with disseminated lesions, ineligible or resistant to available therapies. Another positive aspect is the absence of toxic effects after coDbait treatment, as demonstrated in the syngeneic B16 model (no modification of weight or decrease in vital signs). More importantly, in the murine melanoma model, [¹³¹I]ICF01012 side effects on retina were not increased by coDbait even though it can readily diffuse in the body ³². The same applied to the hair follicle melanocytes, which were not altered in terms of number and function in groups receiving coDbait and/or [¹³¹I]ICF01012.

Although active therapeutics are now available to treat melanoma, *i.e.* kinase inhibitors and immune system modulators, they encounter resistance mechanisms ³³, and in many cases, patients with advanced melanomas continue to die. The development of targeted therapies against intrinsic melanoma properties such as the presence of melanins offered another window for those patients

without therapy proposal. The ongoing clinical transfer for [¹³¹I]ICF01012 TRT with a first into human escalation dose phase will include patients with stage IV melanomas. In the following years, we can propose to associate coDbait with [¹³¹I]ICF01012 TRT as in a first clinical trial including patients presenting melanoma skin metastases coDbait in association with external beam radiotherapy induces tumor growth decrease ³⁴.

Conclusion

The results obtained in the preclinical models for the association of [¹³¹I]ICF01012 TRT with coDbait are then promising to improve further on treatment efficiency for patients with pigmented disseminated metastases resistant to therapeutics.

Acknowledgements: We thank Béatrice Dirat and Pierre Labarre for their technical participation in this project. We also acknowledge the local CICS platform facilities.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. October 2014;DOI: 10.1002/ijc.29210. doi:10.1002/ijc.29210.
2. Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science*. 2014;346(6212):945-949. doi:10.1126/science.1253735.
3. Revskaya E, Jongco AM, Sellers RS, et al. Radioimmunotherapy of experimental human metastatic melanoma with melanin-binding antibodies and in combination with dacarbazine. *Clin Cancer Res*. 2009;15(7):2373-2379. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2376.
4. Chezal J-M, Papon J, Labarre P, et al. Evaluation of radiolabeled (hetero)aromatic analogues of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide for imaging and targeted radionuclide therapy of melanoma. *J Med Chem*. 2008;51(11):3133-3144. doi:10.1021/jm701424g.
5. Bonnet-Duquennoy M, Papon J, Mishellany F, et al. Targeted radionuclide therapy of melanoma: anti-tumoural efficacy studies of a new ¹³¹I labelled potential agent. *Int J Cancer*. 2009;125(3):708-716. doi:10.1002/ijc.24413.
6. Bonnet M, Mishellany F, Papon J, et al. Anti-melanoma efficacy of internal radionuclide therapy in relation to melanin target distribution. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010;23(5):e1-e11. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00716.x.
7. Joyal JL, Barrett JA, Marquis JC, et al. Preclinical evaluation of an ¹³¹I-labeled benzamide for targeted radiotherapy of metastatic melanoma. *Cancer Res*. 2010;70(10):4045-4053. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4414.
8. Degoul F, Borel M, Jacquemot N, et al. In vivo efficacy of melanoma internal radionuclide therapy with a ¹³¹I-labelled melanin-targeting heteroarylcarboxamide molecule. *Int J Cancer*. 2013;133(5):1042-1053. doi:10.1002/ijc.28103.
9. Mier W, Kratochwil C, Hassel JC, et al. Radiopharmaceutical therapy of patients with metastasized melanoma with the melanin-binding benzamide ¹³¹I-BA52. *J Nucl Med*. 2014;55(1):9-14. doi:10.2967/jnumed.112.112789.
10. Cachin F, Miot-Noirault E, Gillet B, et al. (¹²³I)-BZA2 as a melanin-targeted radiotracer for the identification of melanoma metastases: results and perspectives of a multicenter phase III clinical trial. *J Nucl Med*. 2014;55(1):15-22. doi:10.2967/jnumed.113.123554.
11. Viallard C, Perrot Y, Boudhraa Z, et al. [¹²³I]ICF01012 melanoma imaging and [¹³¹I]ICF01012 dosimetry allow adapted internal targeted radiotherapy in preclinical melanoma models. *Eur J Dermatol EJD*. 2015;25(1):29-35. doi:10.1684/ejd.2014.2481.
12. Khan MK, Khan N, Almasan A, Macklis R. Future of radiation therapy for malignant melanoma in an era of newer, more effective biological agents. *OncoTargets Ther*. 2011;4:137-148. doi:10.2147/OTT.S20257.

-
13. Dadachova E, Bryan RA, Howell RC, et al. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008;21(2):192-199. doi:10.1111/j.1755-148X.2007.00430.x.
 14. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, et al. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin Cancer Res.* 2005;11(13):4912-4922. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2088.
 15. Warters RL, Adamson PJ, Pond CD, Leachman SA. Melanoma cells express elevated levels of phosphorylated histone H2AX foci. *J Invest Dermatol.* 2005;124(4):807-817. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23674.x.
 16. Kaufmann WK, Nevis KR, Qu P, et al. Defective cell cycle checkpoint functions in melanoma are associated with altered patterns of gene expression. *J Invest Dermatol.* 2008;128(1):175-187. doi:10.1038/sj.jid.5700935.
 17. Amundson SA, Do KT, Vinikoor LC, et al. Integrating global gene expression and radiation survival parameters across the 60 cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *Cancer Res.* 2008;68(2):415-424. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2120.
 18. Plummer R, Lorigan P, Steven N, et al. A phase II study of the potent PARP inhibitor, Rucaparib (PF-01367338, AG014699), with temozolomide in patients with metastatic melanoma demonstrating evidence of chemopotential. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;71(5):1191-1199. doi:10.1007/s00280-013-2113-1.
 19. Croset A, Cordelières FP, Berthault N, et al. Inhibition of DNA damage repair by artificial activation of PARP with siDNA. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(15):7344-7355. doi:10.1093/nar/gkt522.
 20. Quanz M, Chassoux D, Berthault N, Agrario C, Sun J-S, Dutreix M. Hyperactivation of DNA-PK by double-strand break mimicking molecules disorganizes DNA damage response. *PLoS One.* 2009;4(7):e6298. doi:10.1371/journal.pone.0006298.
 21. Biau J, Devun F, Jdey W, et al. A preclinical study combining the DNA repair inhibitor dbait with radiotherapy for the treatment of melanoma. *Neoplasia.* 2014;16(10):835-844. doi:10.1016/j.neo.2014.08.008.
 22. Coquery N, Pannetier N, Farion R, et al. Distribution and radiosensitizing effect of cholesterol-coupled Dbait molecule in rat model of glioblastoma. *PLoS One.* 2012;7(7):e40567. doi:10.1371/journal.pone.0040567.
 23. Quanz M, Berthault N, Roulin C, et al. Small-molecule drugs mimicking DNA damage: a new strategy for sensitizing tumors to radiotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009;15(4):1308-1316. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2108.
 24. Devun F, Bousquet G, Biau J, et al. Preclinical study of the DNA repair inhibitor Dbait in combination with chemotherapy in colorectal cancer. *J Gastroenterol.* 2012;47(3):266-275. doi:10.1007/s00535-011-0483-x.

-
25. Schlegel A, Buhler C, Devun F, et al. Pharmacokinetics and Toxicity in Rats and Monkeys of coDbait: A Therapeutic Double-stranded DNA Oligonucleotide Conjugated to Cholesterol. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2012;1:e33. doi:10.1038/mtna.2012.27.
 26. Chen L, Zheng S, Sun Z, et al. Cryptotanshinone has diverse effects on cell cycle events in melanoma cell lines with different metastatic capacity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;68(1):17-27. doi:10.1007/s00280-010-1440-8.
 27. Bamford S, Dawson E, Forbes S, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer*. 2004;91(2):355-358. doi:10.1038/sj.bjc.6601894.
 28. Forbes S, Clements J, Dawson E, et al. COSMIC 2005. *Br J Cancer*. 2006;94(2):318-322. doi:10.1038/sj.bjc.6602928.
 29. Omolo B, Carson C, Chu H, et al. A prognostic signature of G(2) checkpoint function in melanoma cell lines. *Cell Cycle*. 2013;12(7):1071-1082. doi:10.4161/cc.24067.
 30. Zölzer F, Mußfeldt T, Streffer C. Differential S-phase progression after irradiation of p53 functional versus non-functional tumour cells. *Radiol Oncol*. 2014;48(4):354-360. doi:10.2478/raon-2014-0032.
 31. Gorgoulis VG, Vassiliou L-VF, Karakaidos P, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*. 2005;434(7035):907-913. doi:10.1038/nature03485.
 32. Berthault N, Maury B, Agrario C, et al. Comparison of distribution and activity of nanoparticles with short interfering DNA (Dbait) in various living systems. *Cancer Gene Ther*. 2011;18(10):695-706. doi:10.1038/cgt.2011.39.
 33. Kim T, Amaria RN, Spencer C, Reuben A, Cooper ZA, Wargo JA. Combining targeted therapy and immune checkpoint inhibitors in the treatment of metastatic melanoma. *Cancer Biol Med*. 2014;11(4):237-246. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2014.04.002.
 34. Letourneau C, Dreno B, Kirova Y, et al. First-in-human phase I study of the DNA repair inhibitor DT01 in combination with radiotherapy in patients with in transit melanoma. *J Clin Oncol*. 2015;(Abstract number : 2555). <http://meetinglibrary.asco.org/content/143029-156>. Accessed June 18, 2015.

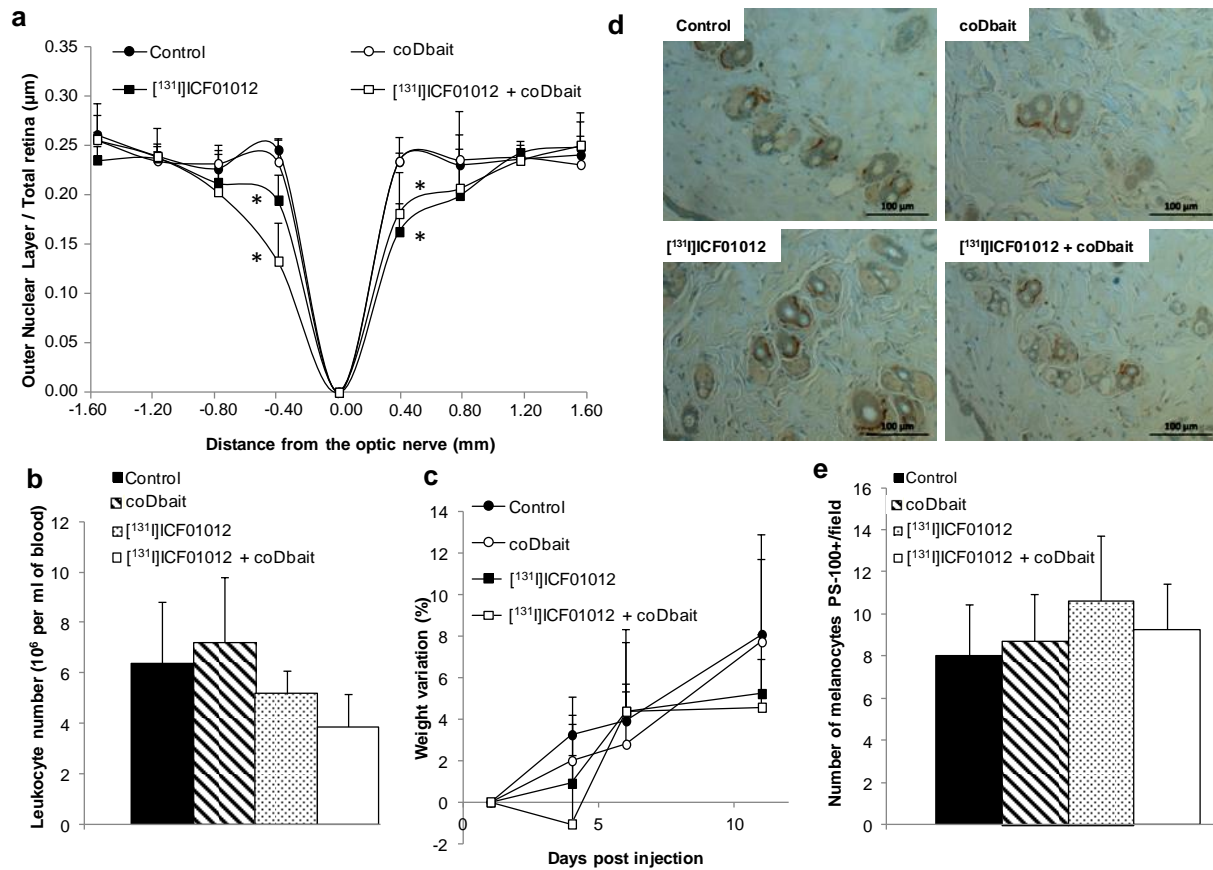


Figure 2. Side effects associated with treatments in pigmented C57Bl6 mice. **a.** Evaluation of [¹³¹I]ICF01012 + coDbait toxicity on mice retina 10 days post irradiation ($n = 4$ per group). The significant ratio decrease observed following [¹³¹I]ICF01012 around the optic nerve was not further increased with coDbait addition. **b.** % variation from initial values showed no statistically significant weight loss in the four groups. **c.** White blood cell quantification in the four groups showed a non-significant decrease in irradiated mice. **d.** Evaluation of [¹³¹I]ICF01012 radiotoxicity on skin by melanocyte-specific staining of PS100 protein. Representative histological sections of mice skins from the different groups showed a similar number of melanocytes in the hair follicles. **e.** Quantification of PS-100 stained cells showed no statistically variation of the hair follicle melanocytes. *, $p < 0.05$.

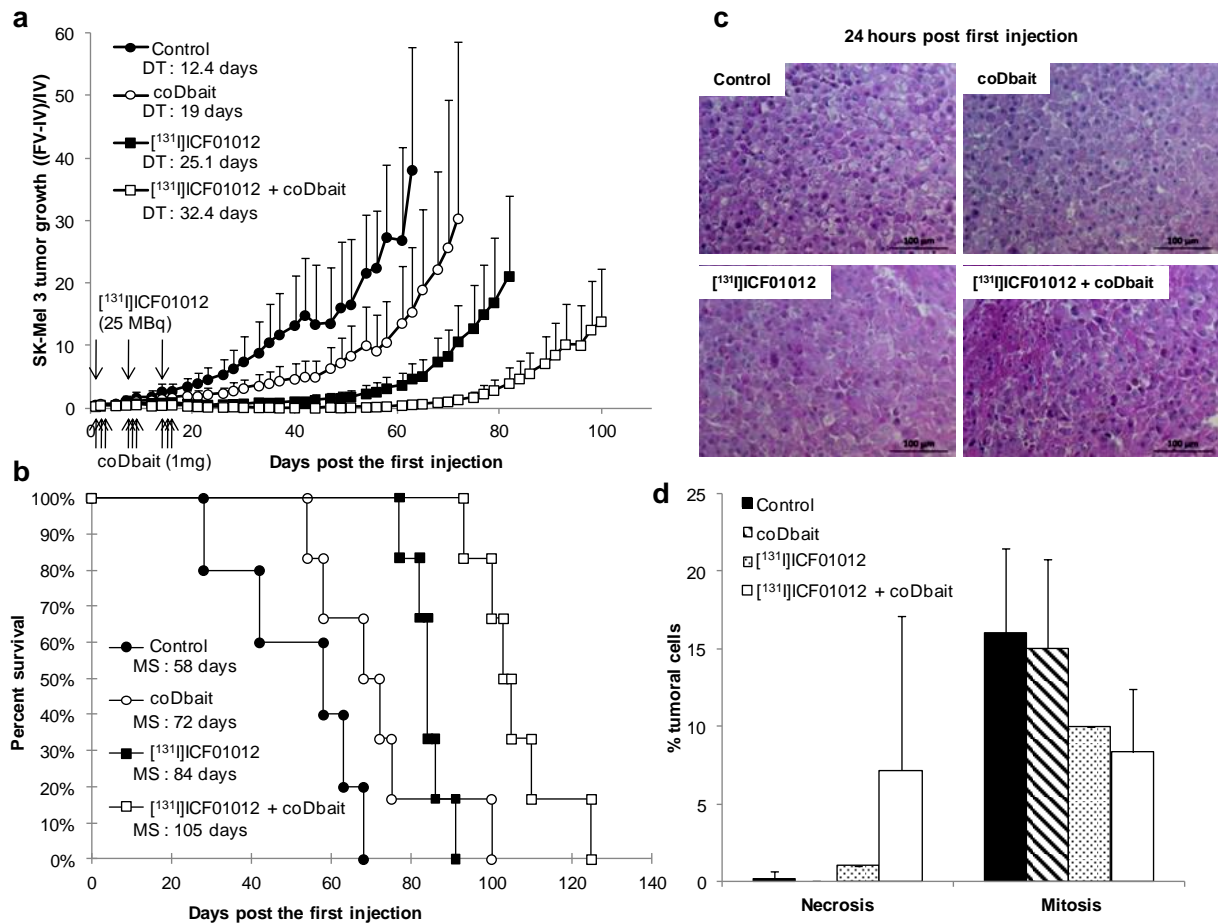


Figure 3. Effect of coDbait \pm $[^{131}\text{I}]$ ICF01012 TRT in SK-Mel 3 model. **a.** The tumour growth was calculated with the ratio of final volume (FV) minus initial volume (IV) to initial volume (IV). The doubling time (DT) was calculated with the exponential value of tumour growth with six mice in each group. **b.** Percentage survival of mice ($n = 6$ /group) receiving the different treatments. **c.** HES representative histological sections and of SK-Mel 3 sampled 24 h after $[^{131}\text{I}]$ ICF01012 injection (25 MBq) and/or one injection of coDbait (1 mg). **d.** The percentage of necrosis established by counting the cells on 3 HPF. *, $p < 0.05$

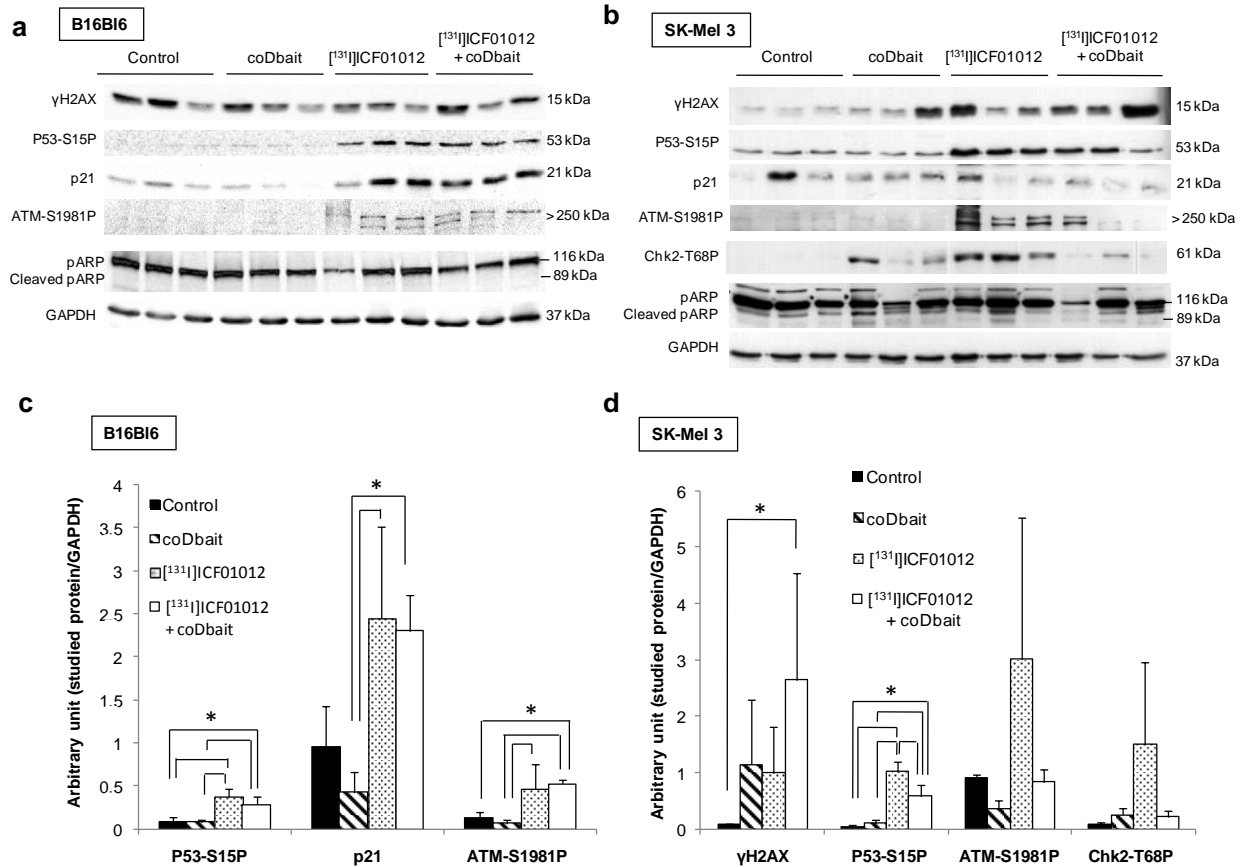


Figure 4. Mechanistic studies of [¹³¹I]ICF01012 ± coDbait on tumour extracts. Western blot analysis of p53 phosphorylation (S15), ATM phosphorylation (S1981), Chk2 phosphorylation (T68) p21 expression and PARP cleavage in tumours 24 h p.i in B16Bl6 (**a**) and SK-Mel 3 models (**b**). The corresponding quantifications are given on graphs (**c**) and (**d**) in B16Bl6 and SK-Mel 3 respectively *, $p < 0.05$

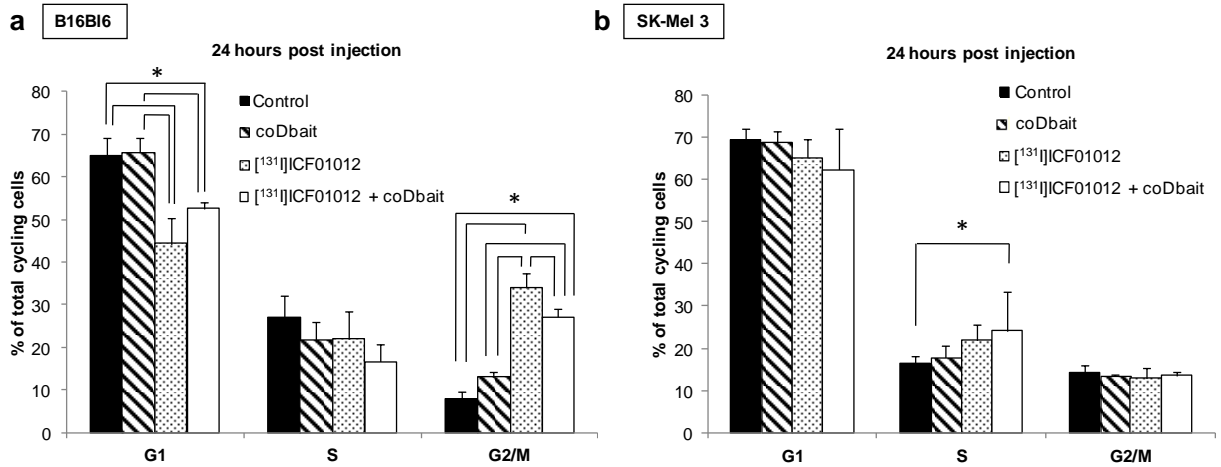
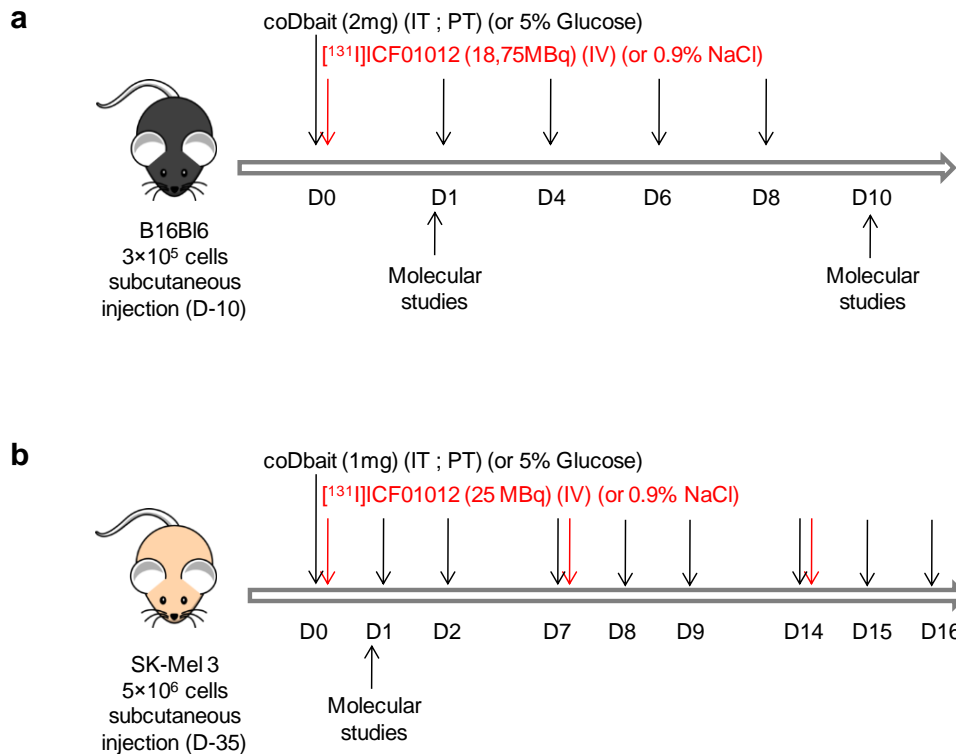


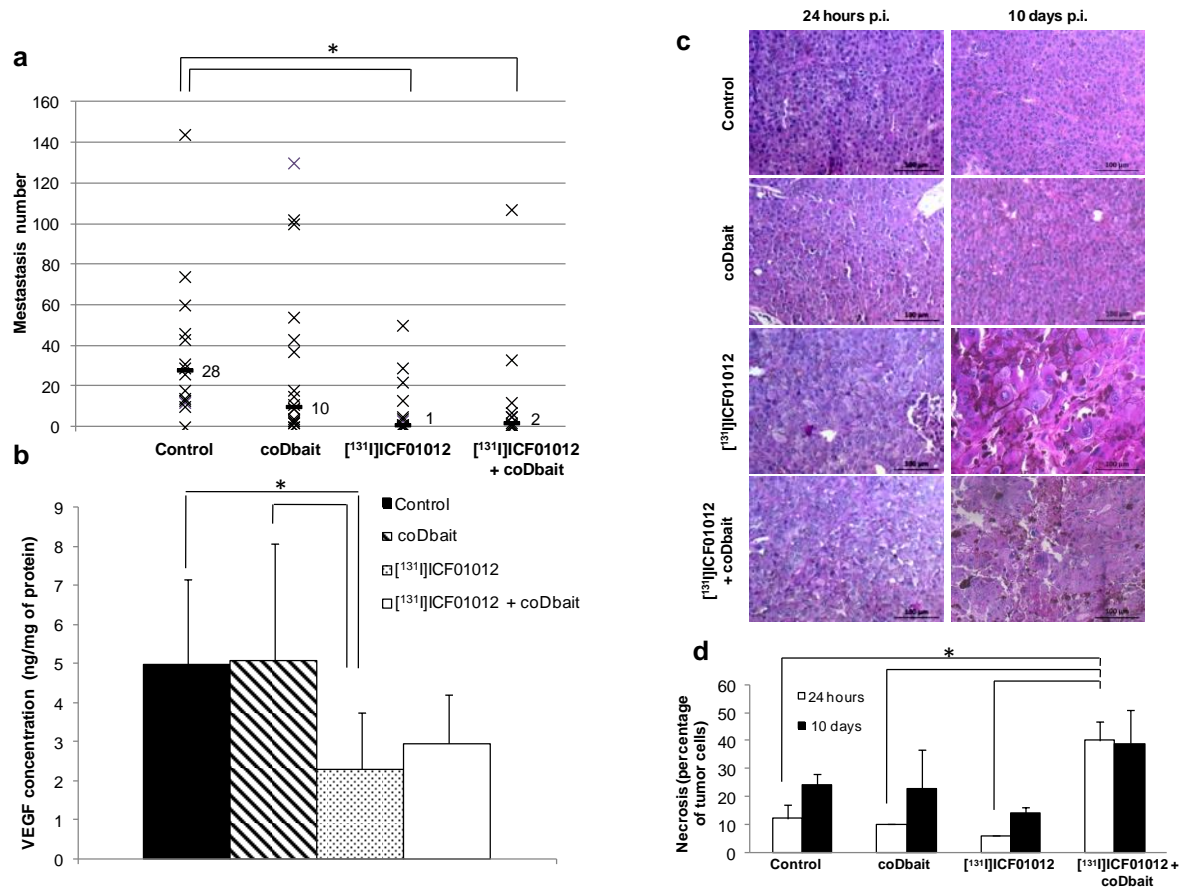
Figure 5 Cell cycle modifications induced 24 h after treatment in B16Bl6 (a) and SK-Mel 3 models (b).*, $p < 0.05$

Supplementary Figure 1



Schedules of experimental *in vivo* radiotherapy protocols in B16Bl6 (a) and SK-Mel 3 models (b).

Supplementary Figure 2



Effects of combined treatment on B16Bl6 dissemination and anatomopathologic features

a. The number of lung metastases was significantly decreased in mice receiving [¹³¹I]ICF01012 ± coDbait (*n*=15 each) compared with control (*n*=14) and coDbait (*n*=18) groups. **b.** Tumour VEGF content was decreased significantly in [¹³¹I]ICF01012 treatment compared with control and coDbait. **c:** HPS representative histological sections of B16Bl6 tumours 24 h or 10 days post-[¹³¹I]ICF01012 irradiation with one dose of coDbait (for 24 h, 2 mg) or with complete treatment (10 days, 5 x 2 mg). 24 h post-irradiation, tumour cells were larger, with a marked nucleolus in both groups, with and without coDbait. An atypical population of giant cells with expanded cytoplasm and sharpened nucleoli in the TRT group was observed 10 days post-[¹³¹I]ICF01012 injection in all samples, representing 10–20% of the tumour cells **d.** The percentage of necrosis was established by counting the cells on 3 HPF. *, *p* < 0.05

II. Radiosensibilisation du mélanome avec les nanoparticules de gadolinium

Les nanoparticules à bases de gadolinium (nanoparticules) possèdent un atome lourd dont les électrons périphériques « arrachés » par des irradiations peuvent augmenter les lésions (Mowat et al., 2011). Leur utilisation en association avec une radiothérapie externe a montré une potentialisation des effets des irradiations (Miladi et al., 2014). Dans un objectif similaire, ils ont été associés avec $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. Marc Janier, IMTHERNAT à Lyon.

1. Injections de nanoparticules de gadolinium associées à $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$

a. Effet sur un modèle de mélanome murin B16Bl6

Après 10 jours de pousse tumorale de B16Bl6, les animaux sont séparés en quatre groupes homogènes : le groupe « contrôle » qui reçoit l'excipient des deux traitements en i.v. et i.t., le groupe « Nanoparticules » qui est traité avec 40 mM de nanoparticules en i.t. pendant 5 jours consécutifs, le groupe « $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ » qui reçoit une injection i.v. de 18,5 MBq et le groupe « $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ + Nanoparticules » qui reçoit les deux précédents traitements. Les animaux simples traités reçoivent également les excipients des traitements non-injectés.

Cinq jours après l'irradiation, une différence significative avec le volume tumoral basal est observée pour les groupes contrôle et simples traités. Cette différence n'est observée qu'à partir de J10 pour le groupe $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ + Nanoparticules. Une augmentation du temps de doublement des tumeurs $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ + Nanoparticules (4,1 jours) témoigne également du ralentissement de la croissance tumorale. Cette augmentation n'est significative qu'avec le groupe contrôle (2,7 jours, Fisher $p=0,047$) (**Figure 86**). La comparaison du volume tumoral entre les différents groupes montre une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ + Nanoparticules ainsi que le groupe contrôle et $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ ($p<0,05$, Tuckey). En revanche, il n'y a pas de

différence de volume tumoral entre le groupe $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ et $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012} + \text{Nanoparticules}$.

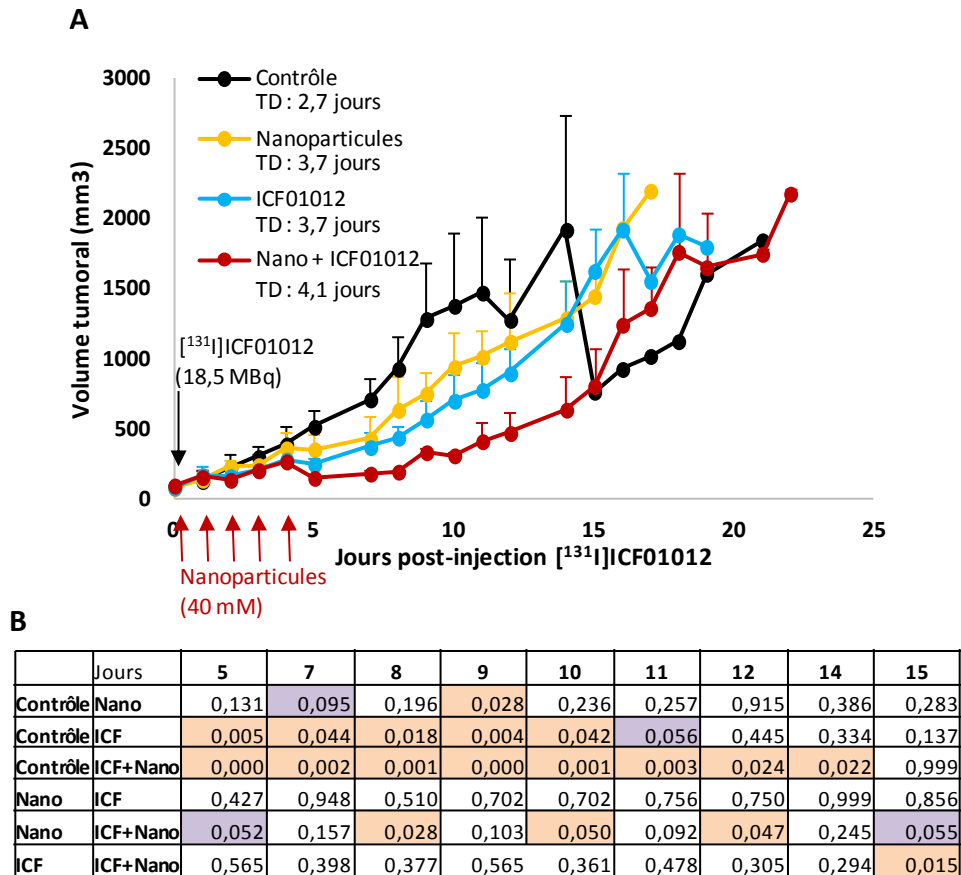


Figure 86 : Effet radiosensibilisant des nanoparticules de gadolinium sur un modèle de mélanome murin B16Bl6 traité avec une irradiation d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ (18,75 MBq). A) Volume tumoral (mm^3) après les différents traitements. TD : temps de doublement des tumeurs (jours). **B)** Valeurs des p value de la comparaison des volumes tumoraux des différents groupes (Test Tuckey). Les valeurs en orange sont inférieures à 0,05, les valeurs en violet sont proches de la significativité ($0,100 < x < 0,05$). ICF : $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$, Nano : Nanoparticules.

Associée à cet effet, la médiane de survie des animaux recevant le traitement combiné augmente significativement par rapport aux animaux contrôles (21 vs 14,5 jours respectivement, Kaplan-Meier, $p=0,039$) et aux groupes nanoparticules (16 jours, $p=0,006$) et $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ (16 jours, $p=0,031$) (**Figure 87A**). En observant l'invasion pulmonaire, nous remarquons une diminution significative du nombre de métastases dans le groupe $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012} + \text{Nanoparticules}$ par rapport au groupe contrôle (0 vs 6 métastases, respectivement) (Kruskal-Wallis, $p=0,008$) (**Figure 87B**).

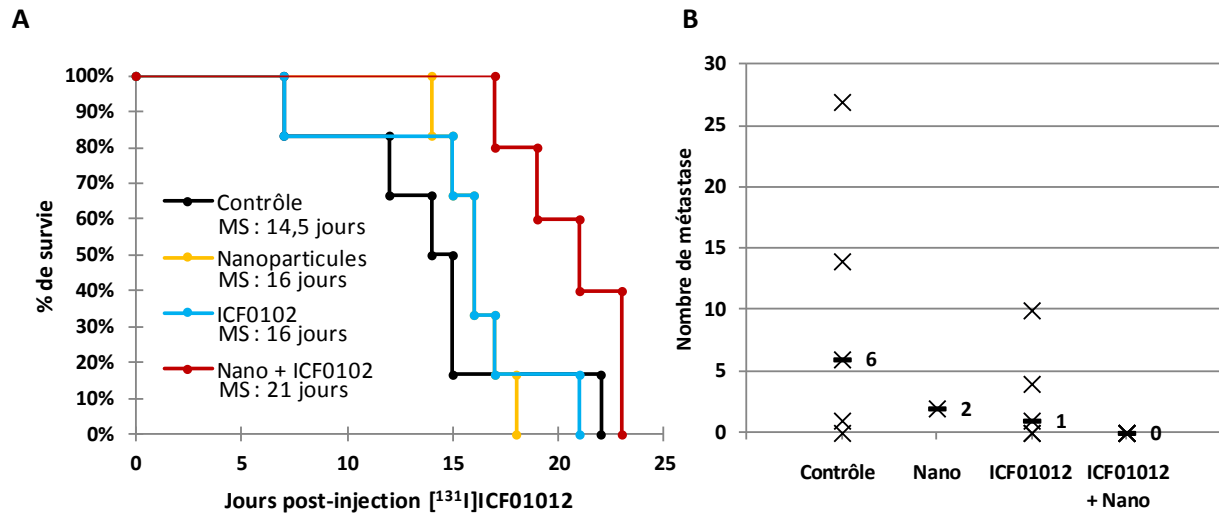


Figure 87 : Effet des nanoparticules de gadolinium sur la survie (A) et l'invasion pulmonaire (B) des animaux traités avec $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012} \pm$ Nanoparticules. Nano : Nanoparticules

b. Analyses anatomopathologiques

Les tumeurs ont été prélevées 24h après l'injection d' $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ (n=3 contrôle ; n=3 Nanoparticules, n=2 $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ et n=2 $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012} +$ Nanoparticules). La mélanine se distribue dans plusieurs secteurs : les macrophages, les cellules tumorales nécrosées et les espaces intercellulaires. Un début d'élargissement des cellules tumorales correspondant à des atypies cellulaires est observée dans les groupes ayant reçu $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ (**Figure 88**). En revanche, aucune différence supplémentaire n'est observée lors de l'association des nanoparticules avec $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$.

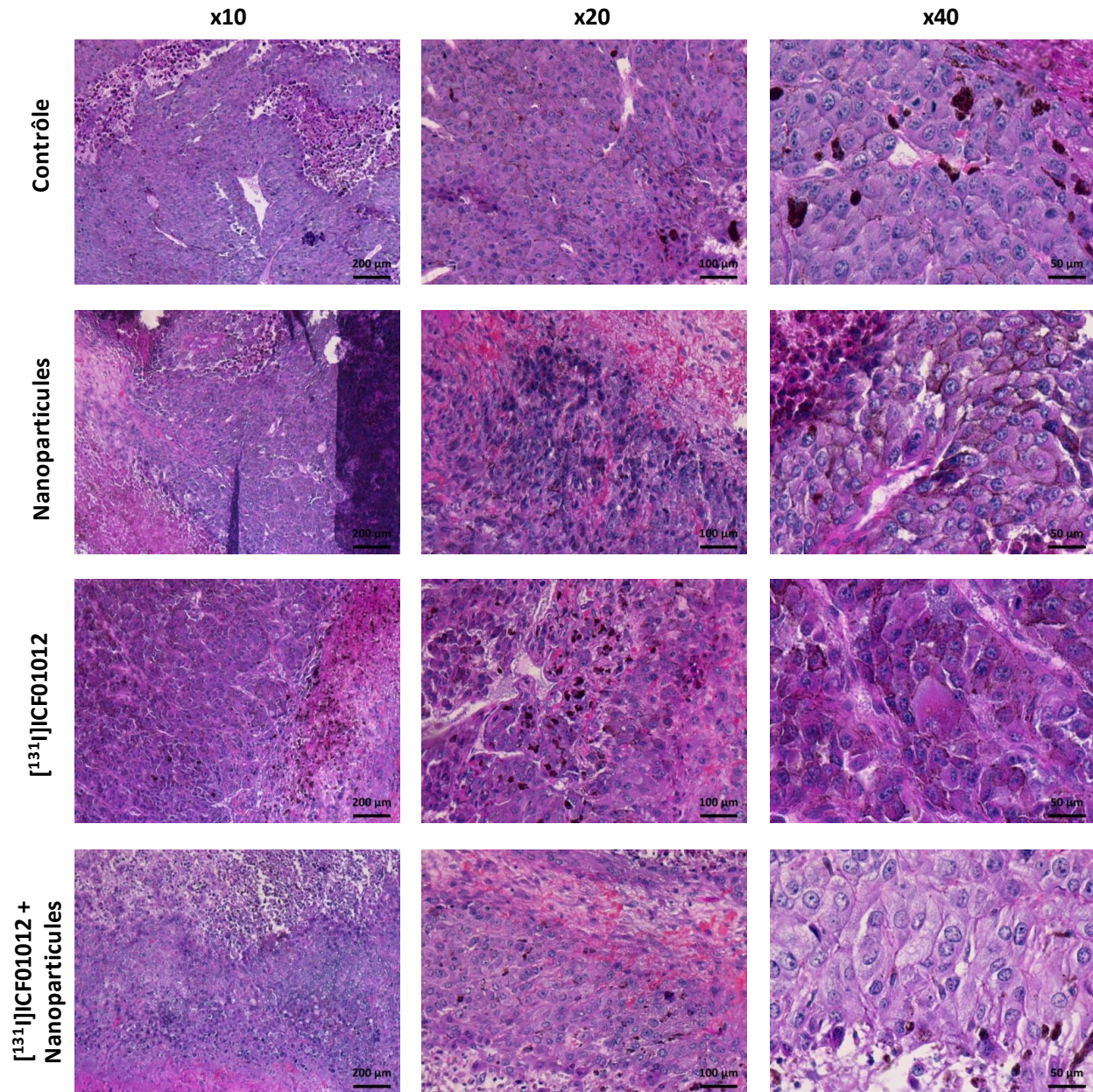


Figure 88 : Histologie des tumeurs B16Bl6 après différents traitements : Contrôle, GBN, $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ et $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ + Nanoparticules. Les tumeurs sont prélevées 24 heures post-irradiation, coloration HES.

2. Discussion

Les études *in vivo* de la potentialisation de la RIV $[^{131}\text{I}]\text{ICF01012}$ par des nanoparticules de gadolinium montrent une différence significative entre le groupe

contrôle et le groupe [¹³¹I]ICF01012 ± Nanoparticules en termes de volume tumoral, de temps de doublement et de métastases pulmonaires. En revanche, excepté pour la médiane de survie des animaux, les effets du traitement Nanoparticules ne sont significativement pas différents de ceux observés sur le groupe traité avec la radiothérapie seule.

D'après ces premiers résultats, l'ajout de nanoparticules de gadolinium ne semble pas améliorer l'effet d'[¹³¹I]ICF01012 et plusieurs facteurs pourraient expliquer cette absence d'effet. Premièrement, les nanoparticules ont une durée de vie en intratumorale courte, environ 15 minutes (Miladi et al., 2014). Ce temps de présence fugace pourrait n'être pas suffisant pour potentialiser l'effet de la radiothérapie malgré les cinq injections successives réalisées. Ensuite, le rayon γ à 80 keV de l'iode 131 est supérieur au « K-shell electron binding » du gadolinium (50,4 keV) et leur proportion est faible (1%). D'après les simulations de l'effet physique de l'iode 131 sur le gadolinium, l'augmentation de la dose absorbée due à la présence de nanoparticules ne dépasse pas 1%, ce qui est négligeable dans un traitement par radiothérapie (calculs réalisés par Dr. Yann Perrot, données non montrées). En revanche, l'iode 125 pourrait être testé pour un effet radiosensibilisant.

En observant les courbes des volumes tumoraux des animaux traités avec [¹³¹I]ICF01012 et [¹³¹I]ICF01012 + Nanoparticules, il semble cependant avoir un effet des nanoparticules. Celui-ci pourrait s'expliquer par la formation de nanospots énergétiques de type cascade d'électrons Auger qui peuvent induire des réactions d'oxydation des macromolécules biologiques et *in fine* la mort cellulaire (Pouget and Mather, 2014). Ces études qui sont les premières à documenter l'association nanoparticules de gadolinium et radiothérapie interne sont à poursuivre. Il serait ainsi pertinent de caractériser *in vitro* l'éventuel effet potentialisant de la RIV et des nanoparticules sur la prolifération, l'augmentation des cassures doubles-brins ou la présence de ROS sur des cultures 3D de mélanomes pigmentées.

Discussions et perspectives

Bien que les mélanomes cutanés ne représentent que 4% des cancer dermatologiques, ils sont pourtant responsables d'environ 80% des décès (Bandarchi et al., 2010). Le mélanome cutané est un cancer de la peau survenant presque exclusivement dans la population blanche, son incidence est plus faible chez les populations d'origine africaine qui possèdent une pigmentation plus foncée. Depuis 60 ans, son incidence a augmenté d'environ 600 % dans la monde (Jennings and Murphy, 2009). L'agressivité du mélanome provient de sa forte capacité à métastaser, et lorsque ce stade est atteint, le taux de survie à 5 ans est d'environ 15-20 % (Gray-Schopfer et al., 2007). Depuis 2011, de nouvelles stratégies encourageantes ont été approuvées par la FDA. Par exemple le vemurafenib, qui est un inhibiteur de la protéine kinase BRAF V600E, augmente la médiane de survie des patients d'environ 16 mois (Curti and Urba, 2012). Cependant, ce traitement n'est administrable qu'aux patients porteurs de la mutation, soit environ 50% des cas de mélanome et des phénomènes de résistance apparaissent fréquemment (Wellbrock, 2014). Le développement de nouvelles cibles et stratégies thérapeutiques est donc toujours d'intérêt. Parmi les caractéristiques intrinsèques du mélanome, la production de mélanine semble être une cible de choix. En effet, ce pigment est retrouvé dans environ 90% des cas de lésions primitives et 50% des métastases (Cachin et al., 2014).

L'utilisation de molécules vectrices, couplées à des radioisotopes, et possédant une forte affinité pour la mélanine est une option thérapeutique développée par l'UMR990 Inserm/Uda et d'autres laboratoires (Joyal et al., 2010; Mier et al., 2014). Ainsi avec le transfert clinique réussi du radiotracer BA-52 (Mier et al., 2014), et l'allongement de la survie des patients de 2 ans, cette stratégie est plus que jamais d'actualité. Les premières

molécules développées par l'UMR990 (Moins et al., 2002) ont été pharmacomodulées afin d'améliorer leurs rétentions tumorales. Parmi les nouveaux vecteurs, la molécule ICF01012 est celle qui a montré les caractéristiques les plus intéressantes en terme de fixation tumorale et d'élimination des organes non-cibles (Chezal et al., 2008). Elle possède un iode qui peut être remplacé par ses isotopes radioactifs. Son marquage avec l'iode 125 ou 131 avait déjà été réalisé avec succès dans des études précédentes (Chezal et al., 2008; Bonnet et al., 2010), cependant le couplage avec l'isotope 123, conventionnellement utilisé en clinique, n'avait jamais été réalisé jusqu'à présent. Un des premiers aspects de nos travaux a été de démontrer que la molécule ICF01012 conservait ses propriétés lorsqu'elle était marquée à l'iode 123, notamment la fixation aux tissus mélanisés et l'élimination rapide des organes non-cibles (Viallard et al., 2015). L'aspect théranostique d'ICF01012 est un des ses avantages et l'évaluation préalable par imagerie des lésions métastatiques permet de statuer sur leur pigmentation et donc la présence de la cible thérapeutique. Nous avons montré par des études dosimétriques qu'il était essentiel de déterminer en amont du traitement la dose absorbée par la tumeur en fonction de sa pigmentation. En effet, en radiation externe, il est généralement admis que des doses comprises entre 30 et 60 Gy sont nécessaires pour obtenir un effet palliatif sur le développement du mélanome métastatique (Zygoianni et al., 2011). Or, l'étude dosimétrique réalisée sur des tumeurs humaines SK-Mel 3, montre que lors d'une injection de 25 MBq, la dose absorbée n'est pas suffisante pour obtenir l'effet escompté. En effet, il est nécessaire de multiplier les injections pour atteindre le palier de 53 Gy, dose efficace pour obtenir le ralentissement de la croissance tumorale (Viallard et al., 2015). Ce protocole d'injections répétées a également été utilisé avec le vecteur [¹³¹I]MIP-1145 (Joyal et al., 2010) et montre des performances semblables à celles d' [¹³¹I]ICF01012.

Les mécanismes de la RIV ont été préalablement décrits dans la lignée B16Bl6 (Degoul et al., 2013). Ce modèle diffère de celui que nous avons utilisé, les tumeurs lors de l'irradiation devant être palpables pour réaliser les études de radiosensibilisation (injection intra-tumorales) les tumeurs ont été ainsi traitées à J10 post-inoculation des cellules au lieu de J6. Ceci n'affecte pas les mécanismes induits par la RIV avec l'activation des voies de réparation de l'ADN et l'arrêt en G2/M du cycle cellulaire. Nous avons également travaillé

sur une autre lignée de mélanome : les SK-Mel 3, caractérisées par une mutation de p53 (Arg267Trp) (Forbes et al., 2006) modifiant ses capacités de fixation à l'ADN ce qui peut rendre compte de l'absence de la protéine p21 dans les extraits tumoraux post-irradiation.

Le modèle B16Bl6 permet une approche des processus métastatiques dans un organisme intègre au niveau du système immunitaire. L'efficacité de la RIV sur les métastases (spontanées ou colonies pulmonaires) est particulièrement intéressante puisqu'elle démontre ainsi la possibilité de traiter des petites tumeurs accessibles par la circulation sanguine. Il serait également intéressant d'étudier l'effet de la RIV sur les modèles de mélanome développés par d'autres laboratoires (van der Weyden et al., 2015).

La mélanine n'est pas uniquement présente dans les mélanomes. Elle est retrouvée notamment dans les follicules pileux, et l'épithélium pigmentaire rétinien (Hu et al., 2008). La fixation d'ICF01012, couplée à l'iode 131 émetteur β^- , à ces cellules pourraient entraîner des effets secondaires. Les mélanocytes présents à la base des follicules pileux ne présentent aucune modification morphologique après un traitement avec [^{131}I]ICF01012. En revanche, la fixation d' [^{131}I]ICF01012 au niveau de l'EPR entraîne une diminution de la couche contenant les photorécepteurs autour du nerf optique. Cependant, les souris C57Bl6 ont une pigmentation rétinienne très forte qui ne reflète pas la celle retrouvée chez l'homme. De plus, une dosimétrie réalisée chez le singe (Joyal et al., 2010) extrapolée à l'homme a montré que la dose absorbée au niveau de l'œil du benzamide MIP1145 est de $1,30 \pm 0,67$ mGy/MBq. Lors de l'étude clinique de la molécule BA52 (Mier et al., 2014) aucun effet secondaire sur cet organe n'a été reporté. En conclusion, la fixation à l'œil d' [^{131}I]ICF01012 ne devrait pas être un problème majeur pour le transfert clinique de la molécule.

Cependant, après un traitement avec [^{131}I]ICF01012 la régression tumorale n'est pas complète et une reprise de la croissance est observée, suggérant la mise en place de mécanismes de radiorésistance (Khan et al., 2011). Le mélanome est un cancer résistant à l'ensemble des thérapies développées contre sa progression (chimiothérapie et radiothérapie), l'inhibition des stratégies d'immunosuppression mises en place par ces cellules étant limitée par les maladies auto-immunes qu'elles peuvent générer (Zimmer et

al., 2012). En termes de radiorésistance et de chimiorésistance, la mélanine elle-même est un acteur important. La fonction initiale de la mélanine est de protéger l'ADN des kératinocytes des effets délétères des rayons UV. Elle possède des sites insaturés qui réagissent avec les ROS et les radicaux libres afin d'inhiber les réactions d'oxydoréduction (De Leeuw et al., 2001). Ainsi, elle capte les ROS produits par la radiothérapie et diminue par conséquent l'efficacité des traitements (Kunwar et al., 2012). Par ailleurs, la plasticité des mélanomes permet aux tumeurs d'évoluer et de sélectionner des cellules qui vont être résistantes. Ainsi des mutations somatiques vont générer des métastases hétérogènes entre elles mais également au sein d'une même tumeur (Yancovitz et al., 2012). Cette hétérogénéité peut expliquer la difficulté à éradiquer totalement une tumeur avec un seul principe actif. Des combinaisons de chimiothérapies sont actuellement testées comme par exemple des anti-BRAF couplés à des anti-MEK (Ascierto et al., 2015). L'avantage de la RIV est de ne pas exercer de différences en termes de génotypes, car les radiations sont émises et peuvent atteindre le génome des différentes cellules. Ceci a été démontré par l'utilisation d'une stratégie de RIT sur les mélanomes (Jandl et al., 2013). Les cellules souches cancéreuses sont également un enjeu actuel dans les traitements anti-cancéreux. Cette population rare et quiescente constitue un pool de cellules décrites comme chimio et radiorésistantes (Colak and Medema, 2014). En effet, la radiosensibilité des cellules peuvent être augmentée par l'inhibition du facteur de transcription *SLUG*, associé au phénotype des CSC (Arienti et al., 2013). Les thérapies actuelles semblent enrichir les tumeurs avec une population susceptible de reformer rapidement une tumeur hétérogène (Morrison et al., 2011). Un anticorps marqué à l'iode 131 et reconnaissant spécifiquement les cellules CD133+ a montré la possibilité de ciblage spécifique des CSC (Lang et al., 2015). Dans cette hypothèse, nous avons commencé à caractériser les cellules dites initiatrices de tumeur, leur statut après une RIV sera déterminé afin de voir leur évolution au cours de ce traitement.

Le génotype particulier de certaines lignées leur procure des sensibilités différentes face au traitement, notamment le profil d'activation de p53 (Amundson et al., 2008; Satyamoorthy et al., 2000) ou la présence de mutation dans les gènes *b-raf* et *n-ras* (Sambade et al., 2011). Afin de lutter contre les phénomènes de radiorésistance, une équipe

a développé des leurres de réparation de l'ADN (Quanz et al., 2009a, 2009b). Le coDbait est une petite molécule d'ADN imitant cassure double-brin. Au niveau intracellulaire, ces courtes séquences d'ADN vont agir comme substrat mimétique pour les enzymes de réparation et ainsi sensibiliser les cellules aux effets d'une irradiation. Le coDbait a montré une augmentation significative de l'efficacité de la radiothérapie externe (Biau et al., 2014; Quanz et al., 2009b) ou de la chimiothérapie (Devun et al., 2012). En associant le coDbait avec [¹³¹I]ICF01012 nous avons démontré pour la première fois la potentialisation de l'efficacité d'une radiothérapie interne par le coDbait (Viallard et al., 2015, en cours de soumission). Nos travaux ont montré une augmentation significative de l'efficacité d' [¹³¹I]ICF01012 associé à des injections successives de coDbait sur un modèle murin B16Bl6 et humain SK-Mel 3 de mélanome pigmenté. L'association des deux traitements est synergique dans le modèle SK-Mel 3 et additif dans le modèle B16Bl6. Ces résultats rejoignent ceux retrouvés dans une étude récente associant le coDbait à plusieurs irradiations externe sur le mélanome amélanique SK-Mel 28 (Biau et al., 2014).

Pour augmenter l'efficacité d' [¹³¹I]ICF01012, nous avons également testé des nanoparticules de gadolinium qui sous l'effet des radiations externes amplifient les effets de celles-ci (Mowat et al., 2011). Il avait été montré qu'une irradiation externe de 10 Gy combinée avec des GBN (Miladi et al., 2014) induisait une diminution significative du volume tumoral des tumeurs SQ20B par rapport à l'effet des rayons seuls. Les essais d'association des GBN avec [¹³¹I]ICF01012 (réalisés à Lyon par l'équipe du Dr. Janier) accentuent l'effet de la RIV mais sans atteindre de différence significative entre le groupe de souris traitées avec [¹³¹I]ICF01012 et le groupe recevant le double traitement. Les résultats de l'étude ne permettent pas de statuer avec affirmation de l'effet potentialisant des GBN. Une expérience supplémentaire réalisée dans nos nouveaux locaux est programmée prochainement.

D'autres approches peuvent également améliorer l'efficacité de la radiothérapie. La vascularisation tumorale, très perméable et hétérogène, est responsable de la dissémination tumorale ainsi que la présence de zones hypoxiques (Goel et al., 2011). En dehors de la diminution des métastases, la restauration de la vascularisation permet un meilleur adressage aux tumeurs des traitements systémiques mais également une meilleure

oxygénation des tumeurs, élément essentiel pour l'efficacité de la radiothérapie (Potente et al., 2011). Une stratégie a montré qu'après la restauration de la cohésion de l'épithélium vasculaire, le cisplatine injecté en i.v. avait un effet significativement plus important sur la croissance tumorale des tumeurs B16F10 (Agrawal et al., 2014) La radiothérapie interne nécessite une bonne distribution de la molécule associée à la présence d'oxygène. Il serait donc pertinent d'associer cette stratégie de normalisation vasculaire avec [¹³¹I]ICF01012.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux confirment l'efficacité de la molécule [¹³¹I]ICF01012 pour la détection et thérapie du mélanome métastatique pigmenté. Cette stratégie de vectorisation développée par l'UMR990 Inserm/Uda est en cours de transfert clinique de phase I. Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet translationnel PRTK soutenu par l'INCA/DGOS. Les premiers patients devraient être admis dans l'étude à la fin de l'année 2015, au Centre Jean Perrin de Clermont-Ferrand.

ANNEXE

ARTICLE 3

Evaluation of two (125)I-radiolabeled acridine derivatives for Auger-electron radionuclide therapy of melanoma

Gardette M, **Viallard C**, Paillas S, Guerquin-Kern JL, Papon J, Moins N,
Labarre P, Desbois N, Wong-Wah-Chung P, Palle S, Wu TD, Pouget JP, Miot-
Noirault E, Chezal JM, Degoul F.

Invest New Drugs

Aug;32(4):587-97

2014

Evaluation of two ^{125}I -radiolabeled acridine derivatives for Auger-electron radionuclide therapy of melanoma

Maryline Gardette · Claire Viillard · Salomé Paillas · Jean-Luc Guerquin-Kern · Janine Papon · Nicole Moins · Pierre Labarre · Nicolas Desbois · Pascal Wong-Wah-Chung · Sabine Palle · Ting-Di Wu · Jean-Pierre Pouget · Elisabeth Miot-Noirault · Jean-Michel Chezal · Françoise Degoul

Received: 28 January 2014 / Accepted: 5 March 2014 / Published online: 2 April 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Summary We previously selected two melanin-targeting radioligands [^{125}I]ICF01035 and [^{125}I]ICF01040 for melanoma-targeted ^{125}I radionuclide therapy according to their pharmacological profile in mice bearing B16F0 tumors. Here we demonstrate *in vitro* that these compounds present different radiotoxicities in relation to melanin and acidic vesicle contents in B16F0, B16F0 PTU and A375 cell lines. ICF01035 is effectively observed in nuclei of achromic (A375) melanoma or in melanosomes of melanized melanoma (B16F0), while ICF01040 stays in cytoplasmic vesicles in both cells. [^{125}I]ICF01035 induced a similar survival fraction (A_{50}) in all cell lines and led to a significant decrease in S-phase cells in

amelanotic cell lines. [^{125}I]ICF01040 induced a higher A_{50} in B16 cell lines compared to [^{125}I]ICF01035 ones. [^{125}I]ICF01040 induced a G2/M blockade in both A375 and B16F0 PTU, associated with its presence in cytoplasmic acidic vesicles. These results suggest that the radiotoxicity of [^{125}I]ICF01035 and [^{125}I]ICF01040 are not exclusively reliant on DNA alterations compatible with γ rays but likely result from local dose deposition (Auger electrons) leading to toxic compound leaks from acidic vesicles. *In vivo*, [^{125}I]ICF01035 significantly reduced the number of B16F0 lung colonies, enabling a significant increase in survival of the treated mice. Targeting melanosomes or acidic vesicles is thus an option for future melanoma therapy.

M. Gardette · C. Viillard · J. Papon · N. Moins · P. Labarre · E. Miot-Noirault · J.-M. Chezal · F. Degoul (✉)
Université d'Auvergne, Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée,
Clermont Université, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France
e-mail: francoise.degoul@inserm.fr

M. Gardette · C. Viillard · J. Papon · N. Moins · P. Labarre · E. Miot-Noirault · J.-M. Chezal · F. Degoul
Inserm, U 990, 63005 Clermont-Ferrand, France

M. Gardette · C. Viillard · J. Papon · N. Moins · P. Labarre · E. Miot-Noirault · J.-M. Chezal · F. Degoul
Centre Jean Perrin, 63011 Clermont-Ferrand, France

S. Paillas · J.-P. Pouget
IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier,
34298 Montpellier, France

S. Paillas · J.-P. Pouget
INSERM, U896, 34298 Montpellier, France

S. Paillas · J.-P. Pouget
Université Montpellier 1, 34298 Montpellier, France

J.-L. Guerquin-Kern · T.-D. Wu
Laboratoire de Microscopie Ionique, Institut Curie, Orsay 91405,
France

J.-L. Guerquin-Kern · T.-D. Wu
INSERM, U759, Orsay 91405, France

N. Desbois
ICHUB (UMR6302), Université de Bourgogne, BP47870,
21078 Dijon, France

P. Wong-Wah-Chung
CNRS, LCE, FRE 3416, Équipe MPO, Europôle de l'Arbois, Aix
Marseille Université, Bâtiment Villemin, BP 80,
13545 Aix-en-Provence Cedex 4, France

S. Palle
Centre de Microscopie Confocale Multiphotonique, Université Jean
Monnet, Université de Lyon, Pôle Optique et Vision,
42023 Saint-Etienne Cedex 2, France

Keywords Melanoma · Melanin · Acidic vesicles · Targeted radionuclide therapy · Auger electron emitter · Iodine 125

Abbreviations

TRT	Targeted radionuclide therapy
ICF01035	<i>N</i> -(2-diethylaminoethyl)-9,10-dihydro-7-iodo-9-oxoacridine-4-carboxamide hydrochloride salt
ICF01040	<i>N</i> -(2-diethylaminoethyl)-5-iodoacridine-4-carboxamide dihydrochloride salt

Introduction

Melanoma is the most severe type of skin cancer, with a high potential for metastatic spread. Melanoma incidence rates continue to rise worldwide [1]. The unsatisfactory results of current targeted therapies for metastatic melanoma highlight the need to develop alternative or additional therapeutic strategies [2]. Clinical studies targeting the MAPK pathway by inhibiting BRAF mutant V600E kinase activity underline the capacity of tumor cells to acquire resistance to this single treatment [3]. Targeted radionuclide therapy (TRT) represents an alternative or an additional weapon to conventional chemo- and immunotherapy for melanoma treatment. TRT can deliver radiation specifically to tumor cells by using specific carriers while sparing the normal tissues and organs. Identified targets are usually membrane receptors that can be recognized by specific labeled antibodies with different isotopes for radioimmunotherapy (RIT). For example, ^{90}Y trium or ^{131}I odine anti-CD20 antibodies are used for the treatment of B-cell non-Hodgkin lymphomas [4]. For melanoma, MC1R-specific receptors can be targeted with ^{188}Re peptide analogs of alpha melanocyte stimulating hormone [5]. However, this approach could be compromised by the significant renal uptake of this radiotracer family and the MC1R different expression level as its genetic variations [6]. Melanins offer another interesting target in melanoma. Melanins are pigments produced specifically by cutaneous and ocular melanocytes, cells from the pigmented epithelium, iris and ciliary bodies in eyes. Primary melanomas (90 %) are usually pigmented [7] while 50 % of metastases still harbor melanins in clinical studies [8, 9]. Melanin targeting has long been a strategy, first for imaging and more recently for TRT, via two approaches: radiolabeled peptides/antibodies or small organic molecules. Monoclonal anti-melanin antibody or melanin-targeting peptide strategies are efficient in preclinical melanoma models (reviewed in [10]). Among the small molecules binding to melanins, various compounds have yielded promising results for TRT, including methylene blue [11] and more recently various arylcarboxamide analogs [12–14]. At clinical level, radioimmunotherapy mainly uses β -emitters (e.g. ^{90}Y , ^{131}I) that produce electrons with ranges between 0.05 and 12 mm. This kind of specific treatment carries a few adverse effects,

like myelosuppression [15] associated with the slow distribution of ^{90}Y -labeled antibodies or with the γ -rays associated with ^{131}I causing non-specific irradiation. To circumvent these issues, other isotopes such as α or Auger electron-emitting radionuclides are of interest due to their high-linear energy transfer (LET) particles that deliver high radiation doses in a restricted area. Alpha emitters tend to be difficult to produce or handle safely, but some Auger electron donors are used in clinical practice, such as ^{123}I for imaging [16] and ^{125}I [17] for brachytherapy. High energy deposition is kept to an extremely small volume around the site of decay (nm^3) [18] where its short radiation range induces little damage to surrounding tissues [19], while the close proximity of isotope to DNA facilitates radiotherapeutic effectiveness [20].

In order to target the DNA of pigmented melanoma cells, melanin-targeting ligands bearing acridine or acridone cores, known for their DNA intercalating properties, have been designed. Among the molecules synthesized, two compounds ICF01035 and ICF01040 were selected as candidates for therapeutic application due to their favorable pharmacokinetic profiles *in vivo* with high and lasting tumor uptakes in melanoma [21]. They still exhibited DNA intercalating properties *in vitro* and induced a significant radiotoxicity on murine melanoma cells when radiolabeled with ^{125}I [22], but [^{125}I]ICF01040 displayed a higher radiotoxicity than [^{125}I]ICF01035 despite similar cellular uptake. Interestingly, compound ICF01035 exhibited a stronger affinity for melanin than ICF01040, suggesting a predominant targeting to melanosome compartments, that was also assessed by SIMS analysis [22]. Taken together, these results suggest that the radiotoxicity of these ^{125}I -labeled compounds could be correlated to their subcellular distributions.

In malignant melanoma, two major organelles can scavenge xenobiotics: melanosomes, which can sequester compounds by a binding to melanins [23], and acidic organelles (i.e. lysosomes), that can concentrate organic bases due to their membrane potential [24]. We thus ran an *in vitro* study on the subcellular localization of these two compounds in melanotic and amelanotic cell lines focusing on their cellular uptake and radiotoxic effects. [^{125}I]ICF01035 and [^{125}I]ICF01040 were also tested for their antitumor properties *in vivo* in the melanoma B16F0 lung colony model.

Materials and methods

Synthesis and radiolabeling of ICF01035 and ICF01040

ICF01035 and **ICF01040** were synthesized as previously described [21]. The radioiodinated compounds [^{125}I]ICF01035 and [^{125}I]ICF01040 were obtained following the procedure described in [21] at high specific activity (81.4 TBq/mmol) and with excellent radiochemical purity

(>99 %) using a radioiododestannylation procedure based on the corresponding tributylstannyl derivatives.

Cell lines

The cell lines were purchased from ATCC (Manassas, VA):

- B16F0 cell line: pigmented murine melanoma originating from a spontaneous primary tumor.
- A375 cell line: amelanotic human melanoma originating from a primary tumor.
- B16F0 PTU cell line: obtained in the laboratory after treating B16F0 with phenylthiourea (PTU) to inhibit melanogenesis. Melanin quantity was measured after PTU treatment in B16F0 cells (data not shown). After four passages, the cells obtained were declared amelanotic.

All these cell lines were maintained as monolayers in 75-cm² culture flasks in adapted medium. B16F0 and A375 were cultivated in DMEM medium (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France), and the B16F0 PTU cell line was cultivated for at least four passages in DMEM medium supplemented with 100 μ M of PTU. All these media were supplemented with 10 % fetal calf serum (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) and 5 mL of a 100X solution of vitamins (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 5 mL of 100 mM sodium pyruvate (Invitrogen Cergy-Pontoise, France), 5 mL of 100X non-essential amino acids (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and 2 mg of gentamycin base (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Cells were grown at 37 °C in a humidified incubator containing 5 % CO₂.

Confocal microscopy

The emission/detection wavelengths were determined for each compound on a Fluoroskan spectrofluorimeter (Fluorescent Ascent FL™, Labsystems, Gometz-le-Chatel, France) as ICF01035 $\lambda_{\text{excitation}}=357$ nm, $\lambda_{\text{emission}}=462$ nm; ICF01040 $\lambda_{\text{excitation}}=391$ nm, $\lambda_{\text{emission}}=456$ nm.

For subcellular localizations, visualization was performed on a Leica TCS SP2 AOBS confocal microscope equipped with a 63 \times 1.4 oil-immersion objective lens with a 2.2 zoom (all from Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France). Images were acquired using a dual-band 488-nm argon and 543-nm helium/neon laser and collected using Leica Confocal Software.

Nuclear and melanosome visualization

30. 10³ cells were grown on a cover glass in 1 mL of complete medium for 16 h at 37 °C. The cells were treated by the appropriate compound at 4 \times IC₅₀ (i.e. 16 μ M for **ICF01035** and 2.4 μ M for **ICF01040** as previously determined [22]) for

2 h, fixed by 30 min incubation in AFA (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France), then incubated at 37 °C for 15 min in Triton (0.2 % in PBS) (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) to allow membrane permeabilization before a 30 min saturation step in PBS/SVF (10 %). Cells were stained with a rat TRP1 (tyrosinase-related protein, marker of melanosomes) antibody (1/100 dilution) (Santa Cruz, DE) and Alexa Fluor® 647 anti-rat (1/750 dilution) (Santa Cruz, DE) and propidium iodide (2 μ g/mL) (Santa Cruz, DE) was used to label the nucleus.

Acidic organelles labeling

10. 10⁴ cells were grown in 6-well multidishes in 2 mL of medium for 16 h at 37 °C, then treated by the appropriate compound at 4 \times IC₅₀ for 2 h (see above). At 30 min before analysis, the cells were treated by Lyso sensor green (LSG, $\lambda_{\text{excitation}}=440$ nm, $\lambda_{\text{emission}}=505$ nm, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) at a final concentration of 1 nM.

Determination of α parameter

To determine the α parameter [25], the pH of a 1-octanol-saturated PBS solution (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) was modified by adding aqueous HCl 1 N solution (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France), then the lipophilicity of radioiodinated compounds, i.e. log p, was determined in each pH-adjusted solution. Briefly, the radiolabeled compound was prepared in the appropriate pH-adjusted PBS solution (pH range: 2–11), 1-octanol was added and mixed, and the activity of each phase after decantation and separation was measured. p was calculated as a ratio of activities (octanol/PBS solution) and log transformed to express lipophilicity. The ratio of log p for the more acidic value to log p in the more basic conditions gives the α parameter.

Determination of acidic organelles compartment

For each cell line, the quantity of acidic organelles was determined using LSG. 50,000 cells were grown in 96-well multidishes in 150 μ L of complete medium for 16 h at 37 °C. Cells were incubated for 1 h at 37 °C with 10 μ M of LSG, then fluorescence at 485/530 nm was determined using the Fluoroskan spectrofluorimeter. The fluorescence measured was directly correlated to the number of acidic vesicles.

Determination of cell melanin content

Cells were grown in 10 cm-diameter petri dishes for 16 h. After recovery, cells were pelleted by centrifugation at 3,000g for 10 min and further treated with aqueous KOH 1N solution (1.10⁶ cells/mL). After 1 h incubation at 60 °C, melanin content was determined using a Multiskan spectrophotometer

(MS, Labsystems, VA) at a wavelength of 405 nm (100 μ L of each in triplicate) and comparatively to the synthetic melanin standard curve.

Cellular uptake

10^6 B16F0 cells were grown in 10 cm-diameter culture dishes in 10 mL of complete medium for 24 h at 37 °C. The appropriate radioiodinated compound was added (1.85 MBq/dish), and cellular uptake was determined after different incubation times. At each timepoint, cells were washed with cold PBS, scraped and counted, and radioactivity was determined on a γ -counter (Wizard 1480, Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France). Cellular uptake was calculated as percent total radioactivity added (TAA) into the dish, and expressed per million cells.

Clonogenicity assay

The radiocytotoxicity efficiency was assessed by the ability of cells to form colonies following drug treatment. Cells were plated into 6-well multidishes (200 cells/well) and allowed to adhere for 16 h before treatment. Then, the cells were treated with activities ranging between 0.7 and 44.8 kBq/mL for [125 I]ICF01035 and 0.7 to 11.2 kBq/mL for [125 I]ICF01040 in culture medium. After a 48 h drug exposure, the drug-containing medium was replaced by fresh medium and the cells were grown for an additional 8 day at 37 °C. After this time, the dishes were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), fixed with methanol (MeOH), and stained by violet crystal (0.2 % in water) (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France). Colonies of more than 50 cells were counted. The cloning efficiency of control cells was about 70 %. The surviving fraction was calculated as the ratio of cloning efficiencies of treated to untreated cells. The antiproliferative activity of the drugs is expressed as an inhibition percentage:

$$100 - \left[\frac{\text{Number of treated colonies}}{\text{Number of control colonies}} \right] \times 100$$

Cell cycle analysis

10^6 B16F0 cells were grown in 10 cm-diameter culture dishes in 10 mL of complete medium for 24 h at 37 °C. Radioiodinated ICF01035 and ICF01040 compounds were added (1.85 MBq/dish), and 24 h later the cells were trypsinized, fixed in 70 % ethanol at –20 °C for 3 h and kept in alcohol 70 % (1 million/0.5 mL) at –20 °C until FACS analysis. Cells were stained with cell cycle kit reagent from Merck Millipore (Merck Millipore, Guyancourt, France) for 30 min at room temperature in the dark before analysis using an Muse® flow cytometer (Merck Millipore, Guyancourt, France).

In vivo antitumor tests

All experiments were carried out in C57BL6 male mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) in compliance with French laws governing animal experimentation.

B16F0 were resuspended in PBS after trypsination and injected into the tail vein (1.5×10^5 cells per mouse in 0.2 mL). Treatment was administered *i.v.* via a tail vein at D5 (one injection of 74 MBq) or at D5 and D14 (two injections of 74 MBq, 1.1 pmol) following cell injection. Treatment efficacy was determined by measuring median of survival and by removing the lungs and counting lung colonies at D20 post-cell inoculation. For lung colony numbering, we used 8, 9 and 10 mice in control, [125 I]ICF01035 and [125 I]ICF01040 groups, respectively. For survival analysis, the groups contained 10, 6 and 7 mice for control, 1×74 MBq [125 I]ICF01035 and 2×74 Mbq [125 I]ICF01035, respectively.

Secondary ion mass spectrometry analysis

B16F0 cells were injected intravenously into male C57BL/6J mice to obtain, within 12 day, tumor cell colonies in lungs mimicking pulmonary micrometastases. After compound administration (0.1 μ mole/mouse), mice (2 per point) were sacrificed at times 24 h, 72 h, 5 day and 8 day post-administration. Typical sample preparation for SIMS analysis was previously described [26]. Briefly, lungs were removed and small pieces of tissue including B16 melanoma colonies were isolated and fixed by slam-freezing on an LN2-precooled metal mirror. Samples were dehydrated by freeze-drying starting at –110 to –10 °C before embedding in Spurr resin. Serial 0.4 μ m-thick sections were deposited on stainless steel holders for SIMS analysis or on glass slides for light microscopy observation. SIMS imaging was performed using a NanoSIMS-50™ ion microprobe (CAMECA, France) at the PICT-IBISA facility of the Curie Institute (Orsay, France). The instrument is equipped with a magnetic mass spectrometer using a parallel detection system that allows the simultaneous detection of up to five species from the same microvolume. The primary ion beam was generated by a caesium source and accelerated to get an impact energy of 16 keV. For typical experiments, probe size was 100 nm in diameter (defined as 16–84 % rise distance of the signal intensity), with a current of 1.5 pA. The probe scanned the surface of the sample in a 256 \times 256 pixel raster. Depending on the analysis, dwell time ranged from 10 to 30 ms per pixel and width of the scanned area ranged from 100 to 20 μ m. The magnetic field is set to detect the heaviest mass (here, $m_{T-} = 127$) on one of the largest-radius detectors. The other movable detectors were positioned to detect $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, $^{31}\text{P}^-$ and $^{32}\text{S}^-$. However, with the magnetic field used to detect iodine, there is a limitation with spacing between adjacent detectors that precluded the simultaneous detection of $^{31}\text{P}^-$.

and $^{32}\text{S}^-$ ions. Therefore, in the present determination of cellular ICF01035 distribution, images were acquired in two sequential series ($^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, $^{31}\text{P}^-$ and $^{127}\text{I}^-$ then $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, $^{32}\text{S}^-$ and $^{127}\text{I}^-$). Tissue structures were identified by detecting $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ions reflecting tissue and intracellular nitrogen content or by imaging the distribution of $^{32}\text{S}^-$ ions. The distribution of ^{31}P is used to study the distribution of phosphate-rich molecules and consequently to localize nuclei. The resulting map of $^{127}\text{I}^-$ iodine ions reflected the tissue and cellular distribution of the compounds and their iodinated metabolites. For each anion selected, the count measured using the detector is directly related to the local concentration of the element. The raw data was a 16-bit 256×256 pixel image resulting from the probe scanning over the surface of the sample. The intensity of each pixel corresponds to the direct local measurement of flux of the secondary ions. Image processing was performed using the ImageJ public-domain Java image processing software to obtain proper colocalization of the observed structures on the processed maps for all the ion species, and allowed further correlation with light microscope images.

Statistical analyses

In all experiments, data are reported as mean \pm SEM and were analyzed using Student's *t*-test or ANOVA tests with level of significance set at 0.05. For survival studies, a log Rank test was used. Analyses were performed using XLSTAT Software (Addinsoft, Paris, France).

Results

ICF01035 and ICF01040 subcellular localization in the pigmented B16F0 cells

To characterize the subcellular localization of the two compounds, confocal microscopy was used after labeling by relevant antibodies or markers of cell architecture. Figure 1a and b summarizes the confocal microscopy observation focused on B16F0 melanoma cells. For this microscopy study, were used propidium iodine for nuclei labeling and an antibody recognizing TRP1, a melanogenesis enzyme, for melanosome localization.

ICF01035 showed a cytoplasmic punctiform accumulation (Fig. 1a). Image merging revealed co-localization with TRP1 signal only. This result illustrated a melanosomal sequestration of ICF01035 as the only organelles expressing this enzyme.

ICF01040 showed a cytoplasmic punctiform accumulation (Fig. 1b). After cell treatment by ICF01040, the TRP1 signal was diffuse, so the nature of the organelles that scavenge this compound remain unknown.

Characterization of acidic organelle involvement in ICF01035 and ICF01040 subcellular localization

Two organelles can retain these molecules in cytoplasmic melanoma cells: melanosomes or acidic organelles, i.e. lysosomes [24, 23]. A375 amelanotic cells lines were used to

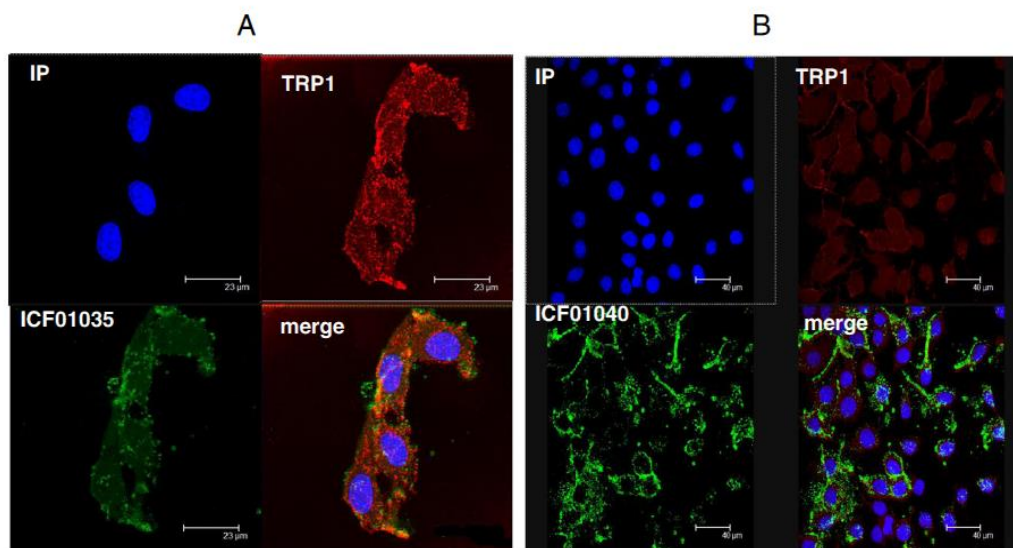


Fig. 1 Subcellular localization of ICF01035 and ICF01040 in the pigmented B16F0 cell line. Nuclear compartment was determined by iodine propidium (IP) labeling (blue), melanosomes by TRP1 labeling (red) and ICF01035 and ICF01040 by their autofluorescence (green). Visualization was done after a 2 h incubation with compounds at $4 \times \text{IC}_{50}$ (a: ICF01035, b: ICF01040) (green). **a** For ICF01035, a cytoplasmic punctiform accumulation was visualized, and this signal clearly co-

localized with TRP1 labeling, suggesting an accumulation of ICF01035 in melanosomes. There was no visible co-localization between ICF01035 and IP signals. **b** For ICF01040, a cytoplasmic punctiform localization was observed. No colocalization could be seen between IP and compound signal. After treatment of cells by ICF01040, TRP1 signal was diffuse. ICF01040 accumulated into cytoplasmic non-defined organelles

exclude the pigmented melanosome (i.e. stage-III and IV melanosomes) scavenging. We also used B16F0 PTU, a cell line without melanin but presenting the same native characteristics as B16F0.

a) α parameter determination:

The α parameter reflects the lipophilicity variations for a compound between its ionized and un-ionized forms in acidic media. If α parameter value is around 1, the compound's lipophilicity is weakly affected by pH variations. This was the case of **ICF01035**, with an α parameter value of 0.90 ± 0.07 ($n=3$). In contrast, the lipophilicity of ICF0040 was pH-dependent, as revealed by an α parameter of 0.10 ± 0.03 ($n=3$). This statistically significant difference ($p=0.004$, Student test) indicated that the lipophilic properties of **ICF01040** should be modified in acidic media, in contrast to **ICF01035**.

b) Study in amelanotic cell lines:

- Determination of acidic compartment in cell lines LSG, a fluorophore linked to a weak base, is a pH-

dependent marker of acidic organelles, as its fluorescence increases proportionally with number of acidic vesicles. Acidic organelle quantification was performed in B16F0, A375 and B16F0 PTU cell lines (Fig. 2a). Figure 2a reports the results obtained as relative fluorescence units measured in each cell lines. After labeling, measured fluorescence in B16F0 and B16F0 PTU was nearly identical (0.2 and 0.19 respectively) whereas A375 cells showed significantly less LSG accumulation (0.12). These data showed that B16F0 and B16F0 PTU possess the same bigger acidic compartment than A375.

- Subcellular localization of **ICF01035** and **ICF01040** in amelanotic cell lines:

ICF01035 predominantly accumulated in nuclei (Fig. 2b) whereas **ICF01040** was mainly sequestered in the cytoplasmic compartment. In order to identify the organelles involved in the cytoplasmic sequestration of **ICF01040**, acidic organelles were labeled by an LSG tracker. There was perfect co-localization between tracker and **ICF01040** (Fig. 2b). In amelanotic A375 cells, **ICF01035** reached the nucleus whereas ICF01040 was scavenged in acidic organelles.

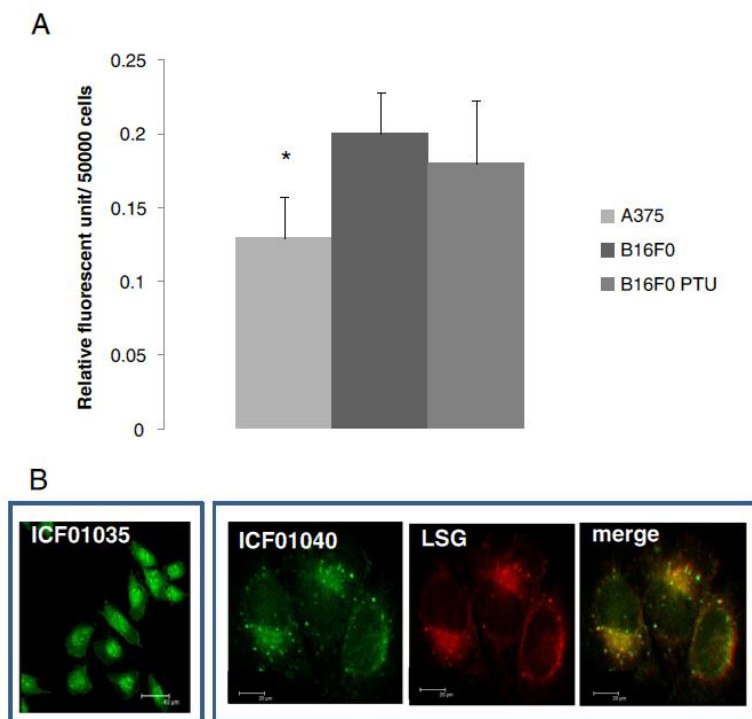


Fig. 2 Characterization of acidic compartments and **ICF01035** and **ICF01040** localization in pigmented and amelanotic cell lines. **a** The quantification of acidic organelles was performed in B16F0, A375 and B16F0 PTU cell lines with LSG fluorescence proportional to the acidic compartment. After 1 h cell incubation with LSG (10 μ M), B16F0 and B16F0 PTU exhibited the same fluorescence level (485/530 nm). A375 displayed a statistically significantly lower acidic compartment than

B16F0 and B16F0 PTU. * $p < 0.05$, Student's *t*-test. **b** Subcellular localization of compounds in the amelanotic A375 cell line. Acidic organelles were revealed by LSG accumulation 2 h post-incubation with compounds at $4 \times IC_{50}$. *Left*: In amelanotic cell lines, **ICF01035** was visualized in cell nuclei. *Right*: For **ICF01040**, a punctiform cytoplasmic accumulation was observed. The **ICF01040** signal co-localized perfectly with LSG signal, suggesting acidic organelle sequestration

Cellular uptake and radiotoxic effects of [125 I]ICF01035 and [125 I]ICF01040

We then studied the intracellular uptake and radiotoxic capacities of the two radioiodinated compounds in B16F0, B16F0 PTU and A375. For both parameters, cells were incubated with an excess of the labeled compounds to ensure that binding to melanins was at the optimal rate. [125 I]ICF01035 uptake in A375 and B16F0 PTU (Fig. 3a) and comparatively to pigmented cells B16F0 was decreased by half for all incubation times, after a 24 h treatment: [125 I]ICF01035 uptake was around 15 % TAA/ 10^6 cells in A375 and B16F0 PTU cells vs 30 % in B16F0 cells. In A375, comparatively to B16F0, [125 I]ICF01040 cellular uptake (Fig. 3b) was significantly reduced three-fold until 24 h after treatment, at around 8 % of TAA was uptake in A375 cells vs 25–30 % in B16F0 and B16F0 PTU cells (differences between these cell lines were not significant). Comparatively to A375, [125 I]ICF01040 uptake in B16F0 PTU increased over time. The radiotoxicity of radiolabeled compounds was determined in vitro via a clonogenic survival assay. After high specific activity labeling, increasing activities of [125 I]ICF01035 and [125 I]ICF01040

were tested and the A_{50} (activity inducing a 50 % growth inhibition) was determined (Fig. 3c). [125 I]ICF01035 A_{50} was the same for A375, B16F0 and B16F0 PTU while its uptake was significantly decreased in amelanotic cell lines (Fig. 3c). For [125 I]ICF01040, A_{50} was around 2 kBq/mL in B16F0 PTU and B16F0 cells and three-fold higher than the radiotoxicity observed in A375 (A_{50} : 7 kBq/mL) (Fig. 3c). This decrease in radiotoxicity in A375 cells could be explained by the significantly smaller uptake in the A375 cell line compared to both B16 cell lines (Fig. 3b). The cell cycle analysis performed following 24 h exposure showed that non-melanotic A375 and B16F0 PTU cells were blocked in the G2/M phase with [125 I]ICF01040, whereas [125 I]ICF01035 induced a decrease of S-phase cells in both cell lines. However, we did not observe significant cell cycle modification in B16F0 cells incubated with [125 I]ICF01035 or [125 I]ICF01040 (Fig. 4).

In vivo radiotherapy efficacy of [125 I]ICF01035 and [125 I]ICF01040 on lung B16F0 colonies

The therapeutic efficacy of both 125 I-radiolabeled compounds was evaluated on lung colonies mimicking micro-lesions or

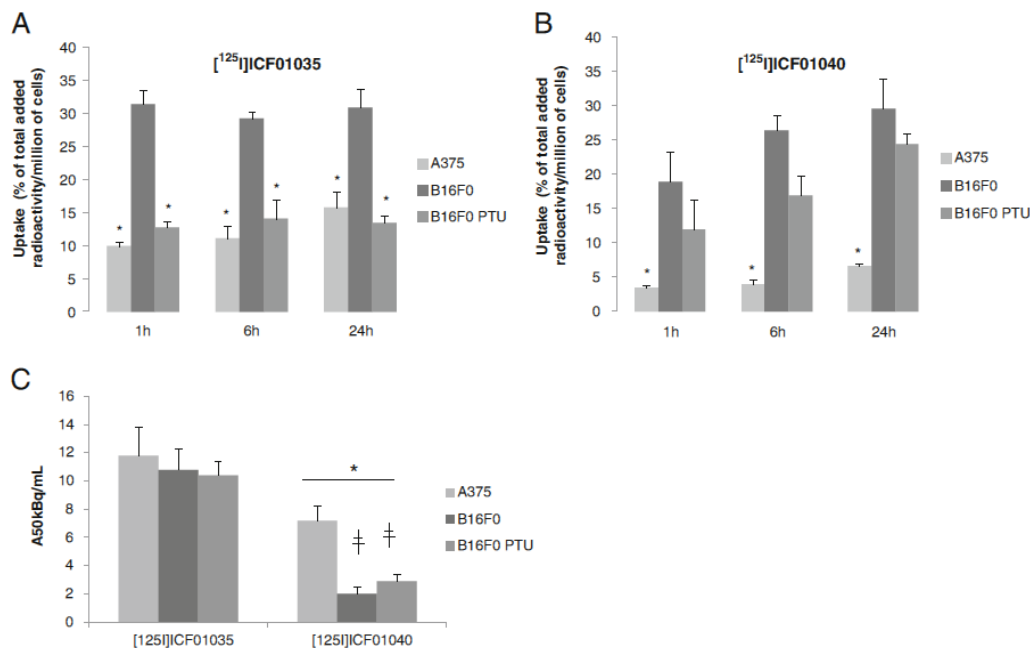


Fig. 3 [125 I]ICF01035 (a) and [125 I]ICF01040 (b) kinetic uptakes and radiotoxicity (c) in B16F0, A375 and B16F0 PTU cell lines. The uptake of both radiolabeled compounds (a and b) was determined after 1, 6 and 24 h of incubation with 1.85 MBq/dish. Uptake was expressed in % of total added activity (TAA)/ 10^6 cells. a [125 I]ICF01035 kinetic uptakes were similar in B16F0 PTU and A375 cell lines but significantly lower for pigmented B16F0. b [125 I]ICF01040 kinetic uptakes were similar in B16F0 and B16F0PTU cell lines and lower in A375 cells. * indicates significant difference at $p < 0.05$, Student's *t*-test. c Radiotoxicity properties of [125 I]ICF01035 and [125 I]ICF01040 were determined on B16F0,

A375 and B16F0PTU cell lines using in vitro clonogenic assays. Efficacy was determined by measuring of A_{50} , i.e. activity allowing a 50 % growth inhibition. The A_{50} of [125 I]ICF01035 was the same in the three cell lines tested. For [125 I]ICF01040, A_{50} was the same in B16F0 and B16F0 PTU. A375 showed lower significant radiotoxic efficacy compared to both B16F0 and B16F0 PTU. ‡ indicates significant difference at $p < 0.05$, Student's *t*-test. [125 I]ICF01040 showed significantly higher radiotoxicity than [125 I]ICF01035 for all cell lines. * indicates significant difference at $p < 0.05$, Student's *t*-test

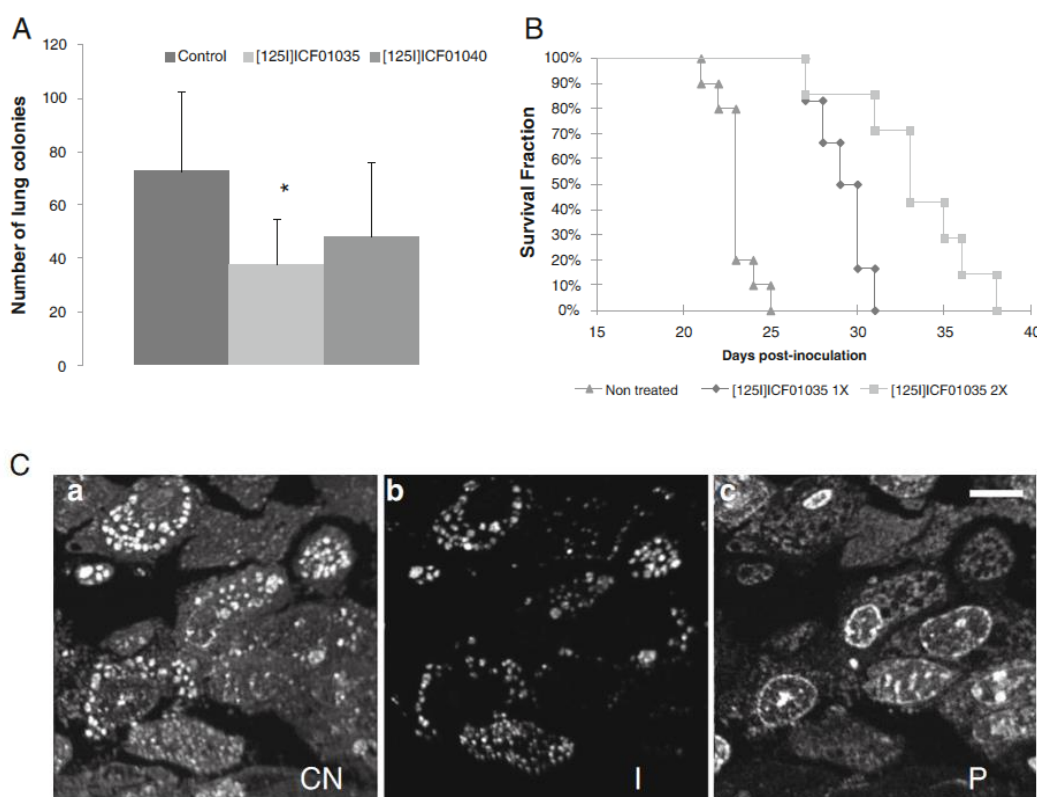


Fig. 5 In vivo studies of [^{125}I]ICF01035 and [^{125}I]ICF01040 on B16F0 lung colonies. **a** The efficacy of radiotherapy by a single injection of [^{125}I]ICF01035 or [^{125}I]ICF01040 was determined by counting lung colonies at 14 days post-treatment. The intravenous injection of [^{125}I]ICF01035 or [^{125}I]ICF01040 (74 MBq/0.2 mL) was administered 5 days after cell injection. After [^{125}I]ICF01035 treatment, number of residual colonies was significantly decreased compared to controls. For [^{125}I]ICF01040, number of colonies was not statistically different to controls. * indicates significant difference at $p < 0.05$, Student's *t*-test. **b** [^{125}I]ICF01035 (74 MBq) was administered once or two times at 5 and 14 days post-cell injection. Each treatment induced a significant increase in median survival with a median survival time of 23 days in non-treated

mice compared to 30 and 33 days for 1x and 2x [^{125}I]ICF01035 injections, respectively ($p < 0.05$, Log Rank test). **c** SIMS analysis images from a $30 \times 30 \mu\text{m}$ field on pulmonary pigmented melanoma colonies 24 h post-injection. **a** distribution of CN ions revealed various structures in particular melanin polymers. **b** distribution of ^{127}I ions that might correspond to ICF01035. **c** Distribution of phosphorus signal revealed the condensed chromatin in nuclei. Iodide signal **b** was very high in the cytoplasmic compartment and represented clearly-outlined structures. Images of iodide (**b**) and CN ion (**a**) signals exhibited similar bright structures, illustrating an evident co-localization at the melanin pigment sites in melanosomes. Phosphorous (**c**) and iodide (**b**) signals gave a separate pattern showing no iodide signals in nuclei. Scale bar = $5 \mu\text{m}$

previously been demonstrated for anticancer drugs [27] but also for melanin-binding molecules [28]. Interestingly, the radiotoxicity of [^{125}I]ICF01035 could thus be tied to endogenous melanogenic cytotoxicity (EMC), as Auger electrons resulting from ^{125}I radiation can alter membrane integrity [29] and lead to toxic molecule release associated with melanin production [27]. This EMC should be higher in pigmented cell lines containing stage III and IV melanosomes than in lines with stages I and II melanosomes [27]. However, [^{125}I]ICF01035 only induced a decrease in S-phase in amelanotic cells, suggesting that nuclear location of Auger emitters is also necessary to decrease cell proliferation. [^{125}I]ICF01035 radiotoxicity could then be supported by at least two mechanisms, one involving melanosoma EMC and the other cell death due to the DNA breaks observed in B16F0 cells (data not shown).

ICF01040 was mainly observed in the cytoplasmic compartment, showing that [^{125}I]ICF01040 radiotoxicity did not rely on direct DNA breaks. [^{125}I]ICF01040 toxicity was not melanin-dependent. Therefore, this cytoplasmic localization could be due to acidic organelles present in high numbers in all three melanoma cell lines offering a refuge to this protonable molecule by lipophilicity modification. Indeed, we observed that ICF01040 uptake and radiotoxicity were tightly correlated to amount of acidic organelles. Moreover, in A375 cells and compared to [^{125}I]ICF01035, [^{125}I]ICF01040 had a higher A_{50} (7 kBq/mL vs 11 kBq/mL, respectively). This suggested that [^{125}I]ICF01040 was concentrated in radiosensitive organelles essential for cells. These results were supported by previous studies that have identified acidic vesicle scavenging for iodobenzamides [30].

In conclusion, *in vitro* studies found that despite different subcellular localizations, both compounds induced radiotoxic effects in melanomas, with higher performance for **ICF01040** located in acidic vesicles. *In vivo*, lung colony count was only significantly reduced in [¹²⁵I]**ICF01035**-treated mice, translating into a significant increase in lifespan. We posit that [¹²⁵I]**ICF01035** was more efficient than [¹²⁵I]**ICF01040** in lung colony treatment due to its pharmacological profile and notably its higher tumoral accumulation [22] leading to a higher biological period (269 h) than [¹²⁵I]**ICF01040** (43 h). SIMS analysis applied to *in vivo* specimens provided strong evidence that **ICF01035** was delivered in B16F0 melanosomes. Despite being sequestered in the cytoplasmic compartment, [¹²⁵I]**ICF01035** nevertheless showed radiotherapeutic efficacy leading to cell death.

The melanoma models developed here demonstrated compelling properties of melanin-targeting ligands radiolabeled with ¹²⁵I that is an Auger electron emitter but also an X- and γ -ray-emitting radionuclide. A mixed radiation effect likely supports the observed radiotoxicity. Microdosimetry should now be performed in order to decipher the precise mechanisms underpinning the radiocytotoxicity of these two ¹²⁵I-radiolabeled acridine derivatives.

Acknowledgments The French Ligue Régionale contre le Cancer provided financial sponsorship for this project. The Auvergne Regional Council and the INSERM provided funding for Maryline Gardette's PhD work. The authors thank the PICT-IBISA imaging facility in the Institut Curie for allowing us to use the NanoSIMS microprobe.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Little EG, Eide MJ (2012) Update on the current state of melanoma incidence. *Dermatol Clin* 30:355–361
- Finn L, Markovic SN, Joseph RW (2012) Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Med* 10:23
- Smalley KS, Aplin AE, Flaherty KT, Hoeller C, Bosserhoff AK, Haass NK, Bosenberg M, Ribas A, Barnhill R, Kudchadkar R, Messina JL (2012) Meeting report from the 2011 International Melanoma Congress, Tampa, Florida. *Pigment Cell Melanoma Res* 25:E1–E11
- Davies AJ (2007) Radioimmunotherapy for B-cell lymphoma: Y90 ibritumomab tiuxetan and I(131) tositumomab. *Oncogene* 26:3614–3628
- Miao Y, Quinn TP (2008) Peptide-targeted radionuclide therapy for melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 67:213–228
- Eberle AN, Bapst JP, Calame M, Tanner H, Froidevaux S (2010) MSH radiopeptides for targeting melanoma metastases. *Adv Exp Med Biol* 681:133–142
- Koch SE, Lange JR (2000) Amelanotic melanoma: the great masquerader. *J Am Acad Dermatol* 42:731–734
- Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, Hahka-Kemppinen M, Kahari VM, Pyrhonen S (2002) High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. *Int J Cancer* 97:432–438
- Ghanem N, Althoefer C, Hogerle S, Nitzsche E, Lohmann C, Schafer O, Kotter E, Langer M (2005) Detectability of liver metastases in malignant melanoma: prospective comparison of magnetic resonance imaging and positron emission tomography. *Eur J Radiol* 54:264–270
- Quinn T, Zhang X, Miao Y (2010) Targeted melanoma imaging and therapy with radiolabeled alpha-melanocyte stimulating hormone peptide analogues. In: *G Ital Dermatol Venereol* vol 145. Italy, pp 245–258
- Link EM (1999) Targeting melanoma with 211At/131I-methylene blue: preclinical and clinical experience. *Hybridoma* 18:77–82
- Bonnet-Duquennoy M, Papon J, Mishellany F, Labarre P, Guerquin-Kern JL, Wu TD, Gardette M, Maublant J, Penault-Llorca F, Miot-Noirault E, Cayre A, Madelmont JC, Chezal JM, Moins N (2009) Targeted radionuclide therapy of melanoma: anti-tumoural efficacy studies of a new 131I-labelled potential agent. *Int J Cancer* 125:708–716
- Bonnet M, Mishellany F, Papon J, Cayre A, Penault-Llorca F, Madelmont JC, Miot-Noirault E, Chezal JM, Moins N (2010) Anti-melanoma efficacy of internal radionuclide therapy in relation to melanin target distribution. *Pigment Cell Melanoma Res* 23:e1–e11
- Joyal JL, Barrett JA, Marquis JC, Chen J, Hillier SM, Maresca KP, Boyd M, Gage K, Nimmagadda S, Kronauge JF, Friebe M, Dinkelborg L, Stubbs JB, Stabin MG, Mairs R, Pomper MG, Babich JW (2010) Preclinical evaluation of an 131I-labeled benzamide for targeted radiotherapy of metastatic melanoma. *Cancer Res* 70:4045–4053
- Oriuchi N, Higuchi T, Hanaoka H, Iida Y, Endo K (2005) Current status of cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibody. *Ann Nucl Med* 19:355–365
- Chirumamilla A, Travin MI (2011) Cardiac applications of 123I-mIBG imaging. *Semin Nucl Med* 41:374–387
- Al-Haj AN, Lobriguito AM, Lagarde CS (2004) Radiation dose profile in 125I brachytherapy: an 8-year review. *Radiat Prot Dosim* 111:115–119
- Kassis AI, Adelstein SJ (2005) Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *J Nucl Med* 46(Suppl 1):4S–12S
- Barendswaard EC, Humm JL, O'Donoghue JA, Sgouros G, Finn RD, Scott AM, Larson SM, Welt S (2001) Relative therapeutic efficacy of (125)I- and (131)I-labeled monoclonal antibody A33 in a human colon cancer xenograft. *J Nucl Med* 42:1251–1256
- Ickenstein LM, Edwards K, Sjoberg S, Carlsson J, Gedda L (2006) A novel 125I-labeled daunorubicin derivative for radionuclide-based cancer therapy. *Nucl Med Biol* 33:773–783
- Desbois N, Gardette M, Papon J, Labarre P, Maisonal A, Auzeloux P, Lartigue C, Bouchon B, Debiton E, Blache Y, Chavignon O, Teulade JC, Maublant J, Madelmont JC, Moins N, Chezal JM (2008) Design, synthesis and preliminary biological evaluation of acridine compounds as potential agents for a combined targeted chemo-radionuclide therapy approach to melanoma. *Bioorg Med Chem* 16:7671–7690
- Gardette M, Papon J, Bonnet M, Desbois N, Labarre P, Wu TD, Miot-Noirault E, Madelmont JC, Guerquin-Kern JL, Chezal JM, Moins N (2010) Evaluation of new iodinated acridine derivatives for targeted radionuclide therapy of melanoma using 125I, an Auger electron emitter. *Investig New Drugs* 29:1253–1263
- Svensson SP, Lindgren S, Powell W, Green H (2003) Melanin inhibits cytotoxic effects of doxorubicin and daunorubicin in MOLT 4 cells. *Pigment Cell Res* 16:351–354
- Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A (2000) Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anti-cancer agents. *Pharmacol Ther* 85:217–229
- Duvvuri M, Gong Y, Chatterji D, Krise JP (2004) Weak base permeability characteristics influence the intracellular sequestration site in the multidrug-resistant human leukemic cell line HL-60. *J Biol Chem* 279:32367–32372, United States

26. Guerquin-Kern JL, Wu TD, Quintana C, Croisy A (2005) Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). *Biochim Biophys Acta* 1724:228–238
27. Chen KG, Leapman RD, Zhang G, Lai B, Valencia JC, Cardarelli CO, Vieira WD, Hearing VJ, Gottesman MM (2009) Influence of melanosome dynamics on melanoma drug sensitivity. *J Natl Cancer Inst* 101:1259–1271
28. Wolf M, Eskerski H, Bauder-Wust U, Haberkorn U, Eisenhut M (2006) Alkylating benzamides with melanoma cytotoxicity: experimental chemotherapy in a mouse melanoma model. *Melanoma Res* 16:487–496
29. Santoro L, Boutaleb S, Garambois V, Bascoul-Mollevi C, Boudousq V, Kotzki PO, Pelegrin M, Navarro-Teulon I, Pelegrin A, Pouget JP (2009) Noninternalizing monoclonal antibodies are suitable candidates for ¹²⁵I radioimmunotherapy of small-volume peritoneal carcinomatosis. *J Nucl Med* 50: 2033–2041
30. Wolf M, Bauder-Wust U, Eskerski H, Bauer C, Eisenhut M (2007) Role of acidic cell organelles in the higher nonmelanoma retention of melanoma markers based on N-(2-dialkylaminoethyl)benzamides and the cytotoxicity of alkylating benzamides. *Melanoma Res* 17: 61–73

ANNEXE

ARTICLE 4

Radiolabeled dendritic probes as tools for high *in vivo* tumor uptake: application to melanoma

Parat A, Kryza D, Degoul F, Taleb J, **Viallard C**, Janier M, Garofalo A,
Bonazza P, Heinrich L, Cohen R, Miot-Noirault E, Chezal JM, Billotey C, Felder-
Flesch D

Journal of Materials Chemistry

(3),2560-2571

2015



Cite this: DOI: 10.1039/c5tb00235d

Radiolabeled dendritic probes as tools for high *in vivo* tumor targeting: application to melanoma†

Audrey Parat,^a David Kryza,^{bc} Françoise Degoul,^{de} Jacqueline Taleb,^c Claire Viillard,^{de} Marc Janier,^{bc} Antonio Garofalo,^a Pauline Bonazza,^c Laurence Heinrich-Balard,^f Richard Cohen,^f Elisabeth Miot-Noirault,^{de} Jean-Michel Chezal,^{de} Claire Billotey^{cg} and Delphine Felder-Flesch^{*a}

Received 2nd February 2015
Accepted 18th February 2015

DOI: 10.1039/c5tb00235d

www.rsc.org/MaterialsB

In bioimaging, targeting allows refining the diagnosis by improving the sensitivity and especially the specificity for an earlier diagnosis. Two ¹¹¹In-radiolabeled dendritic nanoprobess (DPs) (¹¹¹In-2, ¹¹¹In-3) and their model counterparts (¹¹¹In-1, ¹¹¹In-4) are designed and assessed for *in vitro* and *in vivo* tumor targeting efficiency in a murine melanoma models. Tumor uptake is correlated to dendrimer multivalency and reaches values as high as 12.7 ± 1.6% ID g⁻¹ at 4 h post intravenous injection for ¹¹¹In-3 vs. 1.5 ± 0.5% ID g⁻¹ for the unfunctionalized DP, and over 11% ID g⁻¹ for any tumor weight whatsoever.

Introduction

The design of small dendrimers emerges as a powerful and challenging strategy for developing sophisticated nanostructures with excellent performances.¹ Indeed, development of molecular nanomaterials with well-defined structures and advanced functions has made a significant impact on biomedicine.² Dendrimers are widely regarded as versatile nanocarriers owing to their unique properties such as perfectly monodisperse chemical structure and highly branched 3D architecture. Dendrimers are synthesized from branch monomer units which allow the precise control of shape, size, charges, hydrophilicity and peripheral functionality in order to tune pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Dendrimers have been developed as contrast agents for Magnetic Resonance Imaging (MRI),³ optical⁴ or nuclear medicine imaging.⁵ They have also been evaluated in therapy as carriers for drug delivery⁶ or as radiation sensitizers.⁷

One possible approach to increase targeting efficiency is to build systems containing two different ligands showing specificity towards an identical over-expressed receptor of the target cells. Such molecular “bi-specific” objects⁸ combined to a pre-targeting system (the therapeutic agent is secondly injected)⁹ are already estimated in targeted radionuclide therapy (TRT).¹⁰ Another approach is to combine several recognition elements of the targets within a same object. Such a principle is used for *in vitro* identification of specific cells by cellular sorting with fluorescent markers (FACS system). Multivalent nanoplatforms such as dendrimers and dendrons have evidenced a “polyvalency effect” corresponding to an enhanced extracellular membrane receptor binding.¹¹ For example, P. T. Hammond and co-workers showed,¹² by the development of ligand-clustered “patchy” nanoparticles for *in vivo* tumor targeting, that a precise control over the elements promoting and controlling multivalent presentation on targeted therapeutic carriers could enhance the efficacy and specificity of targeted delivery. We go a step further trying to reach an intracellular target in experimental tumor model.

Metastatic melanoma is a very aggressive disease for which no long-term (curative) treatment is currently available.¹³ Since 2011, six therapies targeting deregulated kinases or immune system used alone or in combination (*i.e.* Vemurafenib, Dabrafenib, Trametinib, Ipilimumab, Peginterferon alfa-2b, and Pembrolizumab) were approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for late-stage melanoma. Despite promising early results, these treatments are limited by their high relapse rates and undesired side-effects. Due to the high mortality rates still observed in the advanced stages of the disease, extensive researches for both new diagnosis modalities and effective therapies are still of interest. Among the panel of therapeutic options, TRT emerged as a potential tool to

^aInstitut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg (IPCMS), UMR CNRS-Université de Strasbourg 7504, 23 rue du loess, BP 43, 67034 Strasbourg Cedex 2, France. E-mail: Delphine.Felder@ipcms.unistra.fr; Fax: +33 3 88 10 72 46; Tel: +33 3 88 10 71 63

^bILM UMR5306-Université Claude Bernard Lyon 1, France

^cHospices Civils de Lyon, plateforme IMTHERNAT, Hôpital Edouard Herriot, Pavillon B, 5 Place d'Arsonval, 69437 Lyon, France

^dClermont Université, Université d'Auvergne, Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^eINSERM, U 990, F-63005 Clermont-Ferrand, France

^fUniversité de Lyon, Université Claude Bernard Lyon-1, ISPB faculté de pharmacie, MATEIS CNRS UMR 5510, 8 avenue Rockefeller, F-69373 Lyon cedex 08, France

^gUniversité Jean Monnet, Equipe Mixte de Recherche 3738, Ciblage Thérapeutique en Oncologie, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5tb00235d

selectively treat disseminated forms of melanoma. In this context, radiolabeled ligands directed towards Melanocortin-1 (MC1) receptor or melanin-producing cells have been the most extensively studied.¹⁴ A recent first human study underscored the great potential of melanin-targeting radiopharmaceuticals to significantly increase the survival rate of patients with disseminated melanoma.¹⁵ Nevertheless, the inter-individual heterogeneity in metastasis melanin expression, pointed out the necessity to identify melanin-positive subpopulation before performing TRT. Because the disseminated metastatic lesions of melanoma could occur throughout the body, patient stratification should be based on molecular imaging and more especially scintigraphic techniques which are more sensitive. Several melanin-targeting radiotracers, mainly from the (hetero) arylcarboxamide family, have been assessed for pigmented melanoma Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) or Positron Emission Tomography (PET) imaging purposes.¹⁶

To our knowledge, radio-halogenated (hetero)arylcarboxamide derivatives seem to be the most promising pigmented melanoma-seeking imaging agents in nuclear imaging,¹⁷ while their radio-metallated (*e.g.* ^{99m}Tc) analogues have received little attention due to disappointing results such as compounds washing out from the tumor, prominent uptake in nontarget tissues (kidneys, liver) or rapid excretion of the probes.¹⁸

Therefore, considering their cooperative effect¹⁹ and transfection properties,²⁰ dendrimers and bifunctional dendrons seem to be optimal candidates as intracellular targeting probes. To confirm such hypothesis we synthesized four ¹¹¹In-radio-labeled nanoprobes, either dendritic and of different generations (G), 2 (G1) and 3 (G2) bearing respectively 2 and 4 melanin-targeting ligand; or linear and with (1) or without (4) any targeting ligand. Their *in vitro* and *in vivo* targeting efficiency towards melanin, a biopigment produced within vesicles called melanosomes located inside pigmented melanoma cell lines were assessed and compared.

Experimental section

Materials and methods

All reactions were performed under an argon atmosphere. All the solvents, dichloromethane (DCM), tetrahydrofuran (THF), acetonitrile (CH₃CN), toluene, acetone, ether, methanol (MeOH), dimethylformamide (DMF), ethyl acetate (EtOAc), cyclohexane (cHex), were HPLC grade (chromasolv®, Sigma-Aldrich) and further purified in a solvent system containing drying columns or dried over 4 Å molecular sieves. All commercially available reagents were used without further purification. Flash column chromatography was performed on silica gel (high-purity grade, 230–400 mesh, 40–63 μm, Sigma-Aldrich) according to a standard technique. Gel permeation chromatography was performed on LH20 Sephadex® (GE HealthCare) or Bio-Beads SX-8 (BioRad). Nuclear magnetic resonance spectra (¹H and ¹³C) were recorded on a Bruker spectrometer (300 MHz). Chemical shifts for ¹H and ¹³C spectra are recorded in parts per million and are calibrated to solvent residual peaks (for example:

CHCl₃: ¹H 7.26 ppm, ¹³C 77.16 ppm, MeOH: ¹H 3.31 ppm, ¹³C 49.00 ppm) and reference. Multiplicities are indicated by s (singlet), br s (broad singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), qt (quintuplet) and m (multiplet). Coupling constants, *J*, are reported in Hertz. Exact mass was obtained through Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

Multisteps syntheses

Compound 5. (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphate (BOP, 0.03 g, 0.07 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA, 0.027 mL, 0.15 mmol) were added to a suspension of tri-*tert*-butyl 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetate (DOTA-tris(*t*Bu-ester), 0.037 g, 0.06 mmol) and amine **R**^{25b} (0.03 g, 0.06 mmol) in DMF (4 mL). The mixture was stirred at RT for 48 h then the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude mixture was diluted in EtOAc (10 mL), washed with brine (5 mL, 2 times), dried over MgSO₄, filtered and evaporated under vacuum. The residue was purified by size exclusion chromatography (LH20, DCM/MeOH 50 : 50) to give compound 5 (0.05 mmol, 83%) as yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 1.25–1.49 (m, 33H, CH₃, *t*Bu), 1.70–2.70 (br s, 24H, CH₂ DOTA), 2.80–3.55 (m, 18H, CH₂O PEG and CONHCH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂), 3.89 (m, 2H, CONHCH₂-CH₂N(CH₂CH₃)₂), 7.27 (m, 1H, NH), 7.87 (d, *J* = 9.21 Hz, 1H, Ar-8-*H*), 8.07 (d, *J* = 9.21 Hz, 1H, Ar-7-*H*), 8.57 (s, 1H, Ar-5-*H*), 8.58 (m, 2H, NH), 9.43 (s, 1H, Ar-3-*H*), 10.47 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, δ): 172.2, 171.8, 164.9, 156.1, 145.7, 144.7, 143.3, 139.7, 136.3, 129.6, 125.5, 120.5, 112.6, 81.8, 73.8, 70.6, 70.4, 70.1, 69.3, 56.1, 55.7, 55.5, 51.2, 47.6, 39.8, 39.3, 28.0, 9.7. MS (MALDI-TOF) *m/z* calculated for C₅₀H₈₅N₁₁O₁₁: 1015.64, obtained: [M + H]⁺ = 1016.61, [M + Na]⁺ = 1038.60.

Compound 1. Bromotrimethylsilane (TMSBr, 0.16 mL, 1.18 mmol) was added to a suspension of 5 (0.04 g, 0.04 mmol) in DCM (5 mL). The solution was stirred at RT for 4 h leading to trimethylsilyl carboxylate esters, which were hydrolyzed in 2 h by addition of an excess of MeOH (15 mL). Then, the solvents were evaporated *in vacuo* and the obtained residue was purified by size exclusion chromatography (LH20, CH₂Cl₂/MeOH 50 : 50) to give the linear carrier 1 (0.02 mmol, 50%) as yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, δ): 1.41 (m, 6H, CH₃), 2.00–3.90 (m, 44H, CH₂ DOTA, CH₂O PEG and CONHCH₂CH₂N(CH₂-CH₃)₂), 7.95 (br s, 1H, Ar-8-*H*), 8.08 (br s, 1H, Ar-7-*H*), 8.41 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, Ar-5-*H*), 9.38 (m, 1H, Ar-3-*H*); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD, δ): 177.6, 173.2, 165.0, 155.7, 144.0, 143.5, 142.6, 140.4, 136.0, 129.4, 124.2, 111.9, 69.5, 69.3, 68.4, 68.3, 68.2, 57.8, 50.6, 38.8, 38.5, 33.7, 7.1. MS (MALDI-TOF) *m/z* calcd for C₃₈H₆₁N₁₁O₁₁, 847.46; found, [M + H]⁺ = 848.57, [M + Na]⁺ = 870.27 (Fig. 1).

Compound 6. Synthesized according to a procedure described in the literature.²¹

Compound 7. Synthesized according to a procedure described in the literature.²²

Compound 8. 5 mL of a solution of trifluoroacetic acid (TFA) in CH₂Cl₂ (1/4, 10 mL) was added dropwise at 0 °C to a suspension of 7 (0.04 g, 0.05 mmol) in 5 mL of CH₂Cl₂. The

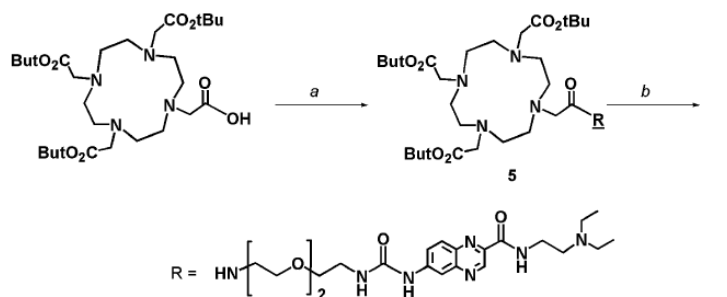


Fig. 1 Synthetic route for the preparation of linear probe 1. (a) BOP, DIPEA, DMF, RT, 83%; (b) TMSBr, CH_2Cl_2 , RT, 50%.

reaction mixture was then stirred 4 h at RT until total deprotection of the esters. Then, the solvent was evaporated under reduced pressure and the excess of TFA was removed by several washings (ether) and co-evaporation (3 times). The residue was dissolved in DMF (4 mL) in the presence of amine R^{25b} (0.06 g, 0.12 mmol), BOP (0.07 g, 0.13 mmol) and DIPEA (0.06 mL, 0.30 mmol). The mixture was stirred at RT for 48 h then the solvent was evaporated under vacuum. The crude was purified by size exclusion chromatography (LH20, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 50 : 50) to give compound 8 (0.043 mmol, 87%) as brown oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ): 1.1 (dd, $J = 7.02$ and 7.23 Hz, 12H, CH_3), 2.23 (s, 1H, H alkyne), 2.37 (dd, $J = 6.15$ and 6.36 Hz, 4H, CH_2CONH), 2.53 (t, $J = 5.7$ Hz, 4H, CH_2CONH PAMAM), 2.64–2.84 (m, 24H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CH_2NHCONH and $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 3.39–89 (m, 58H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, CH_2O PEG, CH_2N alkyne and NCH_2 PAMAM), 6.23 (m, 2H, NH), 7.29 (m, 2H, NH), 7.53 (m, 2H, NH), 7.96 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, Ar-8-H), 8.05 (s, 2H, NH), 8.25 (m, 2H, Ar-7-H), 8.40 (m, 2H, NH), 9.32 (s, 2H, Ar-5-H), 9.50 (s, 2H, Ar-3-H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ): 172.6, 172.4, 164.1, 155.5, 145.1, 143.9, 143.8, 141.0, 136.5, 130.1, 124.5, 113.1, 77.7, 73.8, 70.8, 70.5, 70.4, 70.3, 70.2, 70.1, 70.0, 69.8, 69.7, 67.1, 51.6, 49.4, 47.3, 41.5, 39.6, 39.5, 39.1, 36.9, 36.8, 33.9, 27.9, 11.2. MS (MALDI-TOF) m/z calcd for $\text{C}_{75}\text{H}_{121}\text{N}_{17}\text{O}_{20}$, 1579.90; found, $[\text{M} + \text{H}]^+ = 1581.92$ (Fig. 2).

Compound 9. Adapted from a procedure described in literature.²³ BOP (0.1 g, 0.23 mmol) and DIPEA (0.12 mL, 0.68 mmol)

were added to a suspension of DOTA (0.1 g, 0.17 mmol) and amino-dPEG@ N_3 (0.07 g, 0.19 mmol) in DMF (4 mL). The mixture was stirred at RT for 48 h then the solvent evaporated under vacuum. The crude mixture was diluted with CH_2Cl_2 (20 mL), washed with brine (10 mL, 2 times), dried over MgSO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100 to 95 : 5) to give compound 8 (0.14 mmol, 82%) as colourless oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ (ppm) 1.45 (s, 27H, $t\text{Bu}$), 1.90–3.2 (bs, 24H, CH_2 DOTA), 3.37 (q, $J = 4.62$ Hz, 2H, CH_2N_3), 3.53 (t, $J = 5.46$ Hz, 2H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.57–3.71 (m, 28H, CH_2O PEG), 7.27 (m, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ (ppm) 172.5, 172.3, 171.5, 81.7, 70.4, 70.3, 70.2, 70.0, 69.8, 69.3, 55.9, 55.6, 50.5, 39.0, 27.9. MS (MALDI-TOF) m/z calculated for $\text{C}_{44}\text{H}_{84}\text{N}_8\text{O}_{14}$: 948.61, obtained: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 949.56$, $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 971.58$.

Compound 10. A mixture of azide precursor 9 (0.033 g, 0.035 mmol) and alkyne-dendron 8 (0.05 g, 0.032 mmol) in THF/ H_2O (4 mL (1/1)) in the presence of 5% mol of $\text{Cu}(\text{II}) \text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and 10% mol of sodium ascorbate was stirred at RT for 72 h. After evaporation of the solvents under vacuum, the crude mixture was dissolved in water (30 mL) and one spatula of Chelex100 (Bio-Rad) was added to the solution. The reaction mixture was stirred at RT for 1 h. The resin was filtered and washed with water (3×30 mL). The filtrate was evaporated *in vacuo* and the obtained residue was purified by

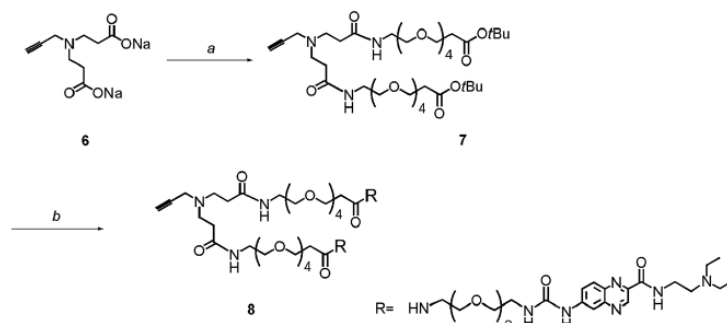


Fig. 2 Synthesis of generation 1 alkyne-PAMAM-PEG functionalized dendron 8. (a) EDC·HCl, HOBt, DIPEA, CH_3CN , RT (67%); (b) (1) TFA/ CH_2Cl_2 (9/1), (2) R (amine form), BOP, DIPEA, DMF, RT (87%).

size exclusion chromatography (LH20, CH₂Cl₂/MeOH 50 : 50) to yield compound **10** (0.014 mmol, 46%) as yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, δ): 0.95–1.61 (m, 39H, CH₃, *t*Bu), 2.13–4.00 (m, 144H, CH₂COO*t*Bu DOTA, OCH₂CH₂CONH, CH₂CONH PAMAM, CONHCH₂CH₂O, OCH₂CH₂NHCONH, CONHCH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂), CH₂O PEG, CH₂N next to triazole ring, NCH₂ PAMAM and CH₂ DOTA, 4.63 (m, 2H, CH₂ next to triazole ring), 7.96–8.10 (m, 5H, Ar-8-*H*, Ar-7-*H*, H triazole ring), 8.38 (br s, 2H, Ar-5-*H*), 9.42 (br s, 2H, Ar-3-*H*); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD, δ): 173.3, 172.6, 171.9, 164.5, 155.9, 144.4, 143.6, 143.1, 141.5, 136.6, 129.9, 124.4, 112.5, 81.3, 72.2, 70.1, 70.0, 69.9, 69.8, 69.7, 69.6, 69.1, 69.0, 68.9, 68.8, 68.5, 68.2, 66.8, 60.7, 51.0, 49.9, 49.0, 39.3, 38.9, 36.1, 33.1, 29.3, 27.8, 26.9, 21.1, 9.7. MS (MALDI-TOF) *m/z* calcd for C₁₁₉H₂₀₅N₂₅O₃₄, 2528.51; found, [M + Na]⁺ = 2555.28.

Compound 2. TMSBr (0.047 mL, 0.35 mmol) was added to a suspension of **10** (0.03 g, 0.02 mmol) in DCM (5 mL). After 4 h stirring, silylestere were hydrolyzed by addition of an excess of MeOH (15 mL) and the mixture was stirred at RT for 2 h. Then, the solvents were evaporated under vacuum and the obtained residue was purified by size exclusion chromatography (LH20, MeOH 100%) to give dendritic carrier **2** (0.01 mmol, 50%) as yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, δ): 1.00–1.49 (m, 12H, CH₃), 2.50–3.95 (m, 144H, CH₂COO*t*Bu DOTA, OCH₂CH₂CONH, CH₂CONH PAMAM, CONHCH₂CH₂O, OCH₂CH₂NHCONH, CONHCH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂), CH₂O PEG, CH₂N next to triazole ring, NCH₂ PAMAM and CH₂ DOTA), 4.64 (m, 2H, CH₂ next to triazole ring), 7.96–8.12 (m, 5H, Ar-8-*H*, Ar-7-*H*, H triazole ring), 8.39 (br s, 2H, Ar-5-*H*), 9.43 (br s, 2H, Ar-3-*H*); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD, δ): 172.8, 172.2, 171.9, 164.5, 155.4, 144.1, 143.2, 142.7,

140.9, 136.2, 129.4, 124.1, 124.0, 112.1, 71.7, 69.6, 69.5, 69.4, 68.7, 68.6, 68.5, 66.3, 65.7, 60.3, 50.6, 50.2, 49.5, 48.5, 38.9, 38.5, 38.4, 35.7, 34.9, 33.8, 32.6, 28.8, 20.6, 8.61. MS (MALDI-TOF) *m/z* calcd for C₁₀₇H₁₈₁N₂₅O₃₄, 2360.32; found, [M – DOTACH₂CH₂]⁺ = 1931.96, [M – DOTA]⁺ = 1975.99, [M – quinoxaline]⁺ = 2007.88 (Fig. 3).

Compound 11. Adapted from a procedure described in literature.^{21,23} Briefly, BOP (0.3 g, 0.73 mmol) and DIPEA (0.26 mL, 1.52 mmol) were added to a suspension of **11** (0.1 g, 0.15 mmol) and amino-PEG@₃-CO₂*t*Bu (0.21 g, 0.67 mmol) in DMF (6 mL). The mixture was stirred at RT for 96 h then the solvent was evaporated under vacuum. The crude mixture was diluted with CH₂Cl₂ (15 mL), washed with brine (10 mL, 2 times), dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by size exclusion chromatography (LH20, CH₂Cl₂/MeOH 50 : 50) to give **11** (0.13 mmol, 88%) as yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.45 (s, 36H, *t*Bu), 2.24 (bs, 1H, H alkyne), 2.30–3.00 (m, 24H, CH₂COO*t*Bu, CH₂CONH PAMAM, CH₂CONHCH₂CH₂O), 3.10–3.71 (m, 88H, CH₂N and NCH₂ PAMAM, CH₂O PEG, CONHCH₂CH₂O), 3.79 (m, 2H, CH₂ alkyne), 5.30 (m, 2H, NH), 7.20 (bs, 4H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.2, 170.9, 170.7, 80.3, 73.9, 70.4, 70.3, 70.2, 70.0, 69.9, 69.2, 52.7, 50.5, 49.0, 39.9, 39.1, 36.0, 33.1, 27.9. MS (MALDI-TOF) *m/z* calculated for C₈₅H₁₅₇N₉O₃₀: 1784.10, obtained: [M + H]⁺ = 1785.15.

Compound 12. 5 mL of a solution of TFA in CH₂Cl₂ (1/4, 10 mL) was added dropwise at 0 °C to a suspension of **11** (0.05 g, 0.03 mmol) in 5 mL of DCM. The reaction mixture was stirred 4 h at RT and the volatiles were evaporated. The excess of TFA was

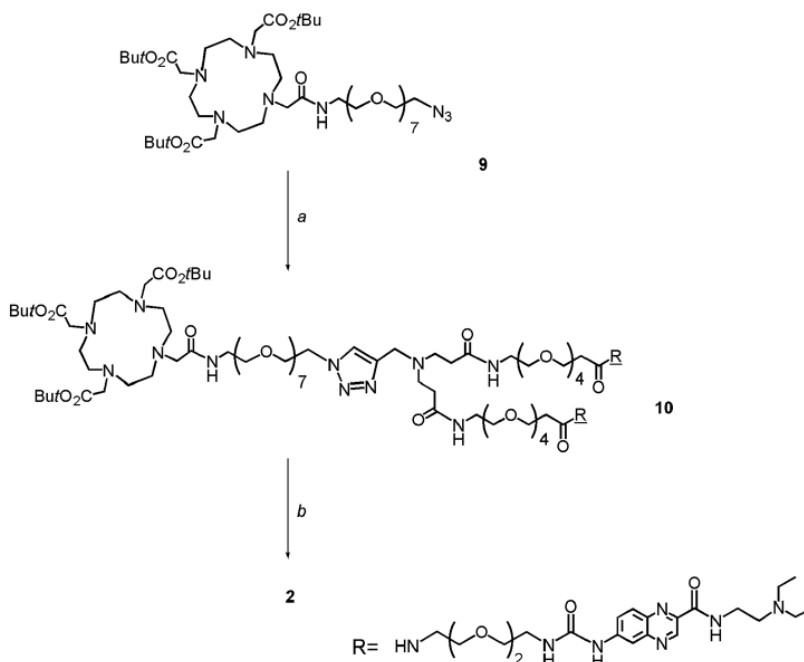


Fig. 3 Synthesis of generation 1 dendritic probe **2**. (a) **8**, Cu(II)SO₄/Asc. Sodium, THF/H₂O (4/1) (46%); (b) TMSBr, CH₂Cl₂ (50%).

removed by washing of the residue with ether and co-evaporation (3 times). Then, the residue was dissolved in DMF (4 mL) in presence of amine **R**^{25b} (0.06 g, 0.14 mmol), BOP (0.07 g, 0.15 mmol) and DIPEA (0.06 mL, 0.32 mmol). The mixture was stirred at RT for 96 h then the solvent was evaporated under vacuum. The crude mixture was purified by size exclusion chromatography (LH20, CH₂Cl₂/MeOH 50 : 50) to give **12** (0.022 mmol, 74%) as brown oil. ¹H NMR (300 MHz, MeOD, δ): 1.32 (t, 24H, $J = 7.02$ Hz, CH₃), 2.41–2.64 (m, 20H, OCH₂CH₂-CONHCH₂CH₂O, CH₂CONHCH₂CH₂N, CH₂NHCONH), 2.71 (s, 1H, H alkyne), 2.84 (m, 12H, CH₂CONH PAMAM), 3.13–3.81 (m, 162H, CH₂ alkyne, CONHCH₂CH₂O, CONHCH₂CH₂N(CH₂-CH₃)₂, CH₂O PEG, CH₂N and NCH₂ PAMAM), 7.90 (d, $J = 6.81$ Hz, 4H, Ar-8-H), 8.06 (d, $J = 8.97$ Hz, 4H, Ar-7-H), 8.35 (s, 4H, Ar-5-H), 9.38 (s, 4H, Ar-3-H); ¹³C NMR (75 MHz, MeOD, δ): 176.3, 175.9, 168.3, 159.2, 147.8, 147.0, 146.4, 144.5, 139.8, 133.2, 127.8, 115.9, 80.9, 77.1, 73.2, 73.1, 73.0, 72.5, 70.1, 55.3, 54.4, 53.0, 52.6, 44.8, 42.7, 42.3, 42.2, 40.4, 39.5, 38.6, 36.9, 36.4, 31.0, 30.8, 12.1. MS (MALDI-TOF) m/z calcd for C₁₅₇H₂₅₇N₃₇O₄₂: 3332.91; found, [M + Na]⁺ = 3358.38.

Compound 13. A mixture of azide precursor **9** (0.016 g, 0.016 mmol) and alkyne dendron **12** (0.05 g, 0.015 mol) in THF/H₂O ((4/1), 4 mL) in the presence of 5% mol of Cu(II)SO₄·5H₂O and 10% mol of sodium ascorbate was stirred at RT for 72 h. After evaporation of the solvents under vacuum, the crude was dissolved in water (30 mL), one spatula of Chelex100 (Bio-Rad) was added, and the reaction mixture was stirred at RT for 1 h. Then the resin was filtered and washed with water (3 × 30 mL). The filtrate was evaporated under reduced pressure and the obtained residue was purified by size exclusion chromatography (LH20, MeOH 100%) to yield **13** (0.006 mmol, 40%) as yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, δ): 0.94–1.64 (m, 51H, CH₃, *t*Bu), 2.36–3.77 (m, 248H, CH₂CONH, CH₂CONH PAMAM, CONHCH₂CH₂O, CH₂NHCONH, CONHCH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂, CONHCH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂), CH₂O PEG, CH₂N and NCH₂ PAMAM, CH₂ DOTA, 4.63 (m, 2H, CH₂N next to triazole ring), 7.94 (m, 5H, Ar-8-H, H triazole ring), 8.08 (m, 4H, Ar-7-H), 8.37 (br s, 4H, Ar-5-H), 9.41 (br s, 4H, Ar-3-H); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD, δ): 173.5, 172.6, 165.0, 155.9, 144.5, 143.7, 143.1, 141.2, 136.6, 129.9, 129.1, 124.5, 117.8, 112.5, 72.2, 70.1, 69.8, 69.7, 69.2, 66.8, 61.5, 60.7, 59.8, 51.0, 49.7, 48.6, 39.5, 39.3, 39.0, 38.5, 36.2, 35.2, 33.1, 31.6, 29.3, 29.0, 28.7, 28.3, 27.1, 26.8, 8.7. MS (MALDI-TOF) m/z calcd for C₂₀₁H₃₄₁N₄₅O₅₆, 4281.52; found, [M + Na]⁺ = 4305.78.

Compound 3. TMSBr (0.03 mL, 0.21 mmol) was added to a suspension of **13** (0.03 g, 0.007 mmol) in DCM (5 mL). After 3 h stirring, silylesters were hydrolyzed by addition of an excess of MeOH (15 mL) and the mixture was stirred at RT for 2 h. Then, the solvents were evaporated under vacuum and the obtained residue was purified by size exclusion chromatography (LH20, MeOH 100%) to give carrier **3** (0.0035 mmol, 50%) as yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, δ): 1.34–1.46 (m, 24H, CH₃), 2.5–3.95 (m, 248H, CH₂CONH, CH₂CONH PAMAM, CONHCH₂CH₂O, CH₂NHCONH, CONHCH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂, CONHCH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂), CH₂O PEG, CH₂N and NCH₂ PAMAM, CH₂ DOTA, 4.69 (m, 2H, CH₂ next to triazole ring), 7.93 (m, 5H, Ar-8-H, H triazole ring), 8.08 (m, 4H, Ar-7-H), 8.39 (m, 4H, Ar-5-H),

9.43 (m, 4H, Ar-3-H); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD, δ): 172.3, 171.1, 165.6, 155.9, 144.6, 143.8, 143.7, 143.2, 141.0, 136.6, 136.5, 129.9, 124.5, 112.5, 72.3, 70.9, 70.1, 69.7, 69.2, 69.0, 68.9, 66.8, 66.4, 66.2, 60.8, 51.0, 50.7, 50.2, 41.2, 39.4, 39.0, 36.2, 34.4, 34.3, 31.6, 29.3, 7.75. MS (MALDI-TOF) m/z calcd for C₁₈₉H₃₁₇N₄₅O₅₆: 4113.33; found, [M – quinoxaline]⁺ = 3846.81, [M – 2 quinoxaline]⁺ = 3570.11 (Fig. 4).

Surface plasmon resonance (SPR) assays

SPR analyses were performed on a Biacore 2000 apparatus (Biacore AB, Sweden) using a CM5 sensor chip provided by GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Running buffer HBS-P (0.01 mol L⁻¹ HEPES pH 7.4 with 0.005% surfactant p20) was purchased from GE Healthcare. The amine coupling kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) containing 0.2 mol L⁻¹ EDC, 0.05 mol L⁻¹ NHS in water and ethanolamine-HCl pH 8.5 was used for immobilization. Melanin was provided by Sigma-Aldrich and dissolved at 20 mg mL⁻¹ in a 1 N ammonium hydroxide (NH₄OH) solution.

Immobilization of melanin was performed as previously described.^{25b} The signal corresponding to the immobilized melanin on channel 2 (FC2) of the sensor chip was approximately 350 RU (Resonance Unit). Channel 1 (FC1) was left as reference surface (carboxymethylated dextran in its native form) in order to quantify unspecific interactions by activation with 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide (EDC)/*N*-hydroxysuccinimide (NHS) and deactivation with ethanolamine injection. The resonance signal (FC2-FC1) was obtained after subtracting the non-specific interactions of the analyte with the carboxymethylated dextran. Binding experiments consisted in several cycles. During the first cycle, the analyte (**1**, **3** or **4**) was injected at a given concentration at a flow rate of 20 μ L min⁻¹ for 3 min. The association phase was followed by a 2.5 min dissociation phase under running buffer. Then, the surface was regenerated using a mixing solution (5 mM NaOH and 1 M NaCl in water) for 90 s. In the last step, a 2 min period under running buffer closed the cycle. The four analytes were injected in triplicates at five concentration levels (100, 50, 25, 10 and 1 μ M).

Radiolabeling with indium 111

For quantitative biodistribution studies, dendritic probes (DPs) **1–3** were labeled using indium-111 radionuclide (half-life: 2.80 days). Briefly, 74–185 MBq of high purity ¹¹¹In-chloride in diluted hydrochloric acid (Covidien, Petten, Netherlands) was added to 2 mg of DP. The mixture was incubated for 30 min at room temperature. ¹¹¹In-DPs were separated from free ¹¹¹In-chloride by size exclusion chromatography through a PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) as follows. The PD-10 column was first washed with 15 mL of pure water. The radiolabeling solution was then loaded on the PD-10 column, and fractions of 0.5 mL were eluted with pure water as the mobile phase. ¹¹¹In-DPs were first eluted. The radioactivity of each fraction was counted using an ionization chamber (Capintec Radioisotope Calibrator CRC-15, Capintec Inc.). Radiochemical purity of each fraction was performed to ensure that no radiochemical impurities would be present in the

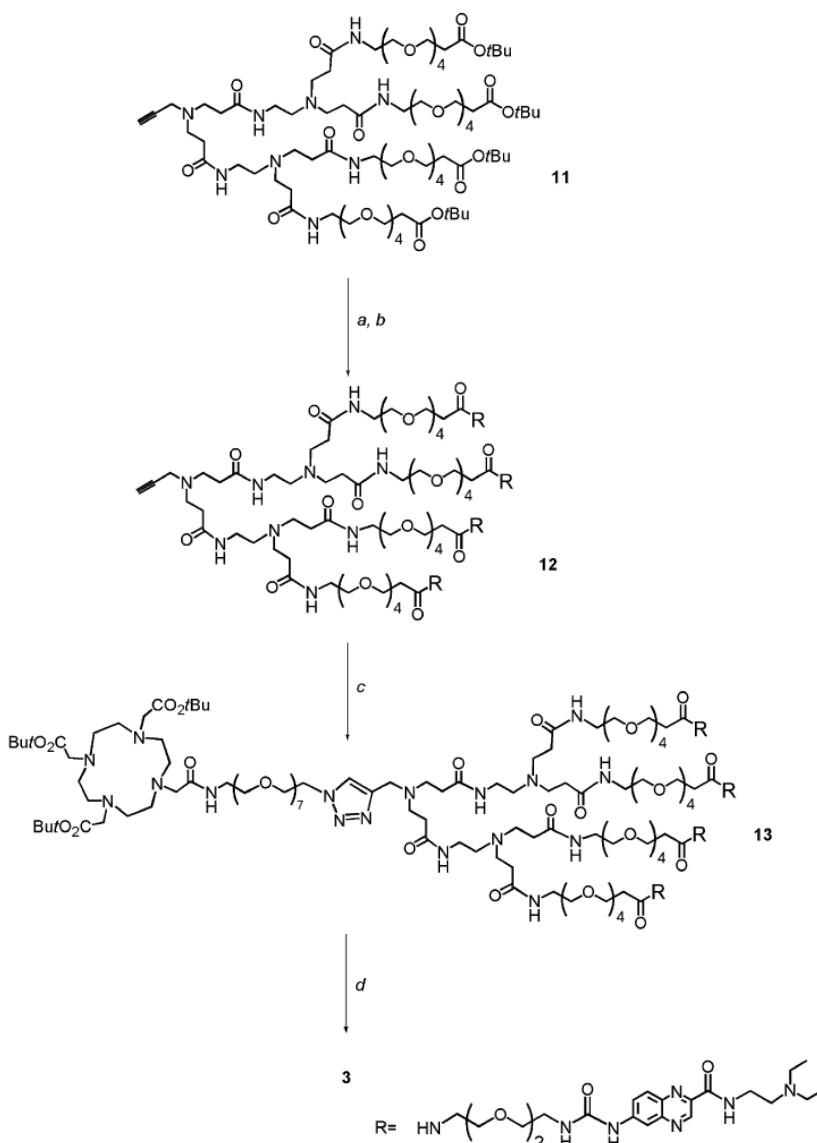


Fig. 4 Synthesis of generation 2 dendritic probe 3. (a) (1) TFA/CH₂Cl₂ (9/1); (b) R (amine form), BOP, DIPEA, DMF, RT (74%); (c) 9, Cu(II)SO₄/Asc. Sodium, THF/H₂O (4/1) (40%); (d) TMSBr, CH₂Cl₂ (50%).

radiolabeled complex solution, which could have different patterns of biodistribution render the investigation meaningless. ITLC of the purified ¹¹¹In-DPs was performed using silica gel plates impregnated glass fiber sheets (Gelman Science Inc., Ann Arbor, MI, USA) in 50 mM citrate buffer (pH = 5) as the solvent, and a TLC scanner (MiniGita, Raytest, Isotopenmessgeräte, GmbH, Straubenhardt, Germany) in order to determine the percentage of free ¹¹¹In-chloride. ¹¹¹In-DP remained at the origin with an R_f value of 0.1, whereas residual ¹¹¹In-chloride migrated with an R_f of 0.8–0.9.

Finally, the fractions with the highest radioactivity and the highest radiochemical purity were pooled. For stability testing,

an aliquot of each purified ¹¹¹In-DP solution was incubated in a pH 7.4 phosphate buffered saline (PBS) at 37 °C. Radiochemical purity stability in the presence of DTPA was determined at room temperature as described above.

Cell culture

Murine B16F10 pigmented melanoma cells lines were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Biovalley, Marnes la Vallée). B16F10 cells were maintained as monolayers in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Glutamax, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), supplemented

with 10% foetal calf serum (FCS Dutscher, Brumath, France) and $4 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ gentamycin (Invitrogen). Cells were grown at 37°C in humidified incubator containing 5% CO_2 . To obtain melanin depleted cells, B16F10 were cultivated during four passages with $100 \mu\text{M}$ of *N*-phenylthiourea (PTU, Fluka, Interchim, Montluçon, France) diluted in DMSO (final concentration, 0.1% DMSO) or with DMSO only (controls cells). Following the treatment, the melanin concentration was $94 \mu\text{g}$ and $15 \mu\text{g}$ per 1 M of B16F10 or PTU-treated cells, respectively. PTU and DMSO were systematically added at each stage of the experiment at final concentrations mentioned above.

Cellular uptake

In uptake experiments, B16F10 cells were cultivated in a 6-wells plate in 2 mL of complete medium for 24 h at 37°C . For 4 h incubation time, cells were seeded at a concentration of 200 000 per well, while 100 000 cells per well were used for 24 and 48 h. ^{111}In -DPs (37 kBq per well per 2 mL) were diluted in OPTI-MEM medium (Invitrogen) supplemented with 1 mM CaCl_2 (Sigma-Aldrich) and incubated at 37°C for the indicating times. One plate was placed at 4°C for 4 h. The supernatant and PBS washes were recovered, B16F10 cells were trypsinized, counted and radioactivity content was measured using a γ -counter (Wizard 1480, Perkin-Elmer). The uptake was expressed as a percentage of radioactivity in 1 M of cells towards the total recovered radioactivity (cells + washes).

Statistical analyses

The statistical analyses were performed with XL Stat software (Addinsoft, VA) using unpaired student test for radioactivity binding.

Biodistribution studies

All animal experiments were approved by the local animal ethics committee of University Claude Bernard Lyon 1, according to French guidelines regarding the care and use of animals' experimental procedures (Authorization no. BH2012-20). C57Bl6 mice (20–25 g) were purchased from Charles Rivers Laboratory (L'Arbresle, France). For all experiments (tumor implants, injections and imaging studies) mice were anaesthetized using a gaseous anesthesia protocol (isoflurane/oxygen (2.5/2.5%)). A hydria diet protocol was applied 15 min before to 30 min after iv injections.

Animal model

C57Bl6 mice carrying interspecies transplants of murine melanoma (B16F0) were obtained by subcutaneous injection of 300 000 cells suspended in $100 \mu\text{L}$ of RPMI in the right flank. All experiments were performed 10 days post-transplantation when tumors were tangible (tumors of less than 1 cm^3).

Quantitative biodistribution studies

1 to 10 MBq of ^{111}In -DPs (50 to $100 \mu\text{L}$) were injected intravenously in the caudal vein of melanoma-bearing animals ($n = 3$ or 4 for each groups). Mice were sacrificed at 2 h, 4 h, 24 h and

48 h post injection (p.i) and organs of interest (heart, lungs, spleen, liver, brain, kidneys, bones (one vertebra), muscles, skin, digestive tract and cadaver) as well as a blood sample, urine and feces were collected, weighted and harvested. All samples were counted for 5 min in a gamma scintillation counter (Wizard® gamma counter, Perkin-Elmer, USA). Tissue distribution was expressed as the percentage of the total injected dose per gram of tissue ($\% \text{ID g}^{-1}$) after decay correction. Hepatobiliary and renal elimination were quantified by counting feces and urine activity and expressed as cumulated activity under the total injected dose. Tumor to blood ratio (TBR) was calculated using equation: $(\% \text{ID per g tumor})/(\% \text{ID per g blood})$.

Results and discussion

Together with linear probe **1** derived from bifunctional 1,4,7,10-tetraaza-cyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) (Fig. 5), we synthesized generation 1 (**2**) and generation 2 (**3**) polyethylene glycol (PEG)-modified polyamidoamine (PAMAM) dendrons at every terminal amino group, which maintain the monodispersity of the small dendron platforms (short PEGs). Indeed, PEGylation provides stealth-like characteristics and long-term plasma stability.²⁴ The PEG was further conjugated to a melanin-targeting ligand derived from quinoxaline **ICF01012** (**R'**, Fig. 5)²⁵ through a BOP/DIPEA-mediated peptide coupling to obtain dimer **2** and tetramer **3**. Final deprotection of the three carriers was performed by silanisation.

(Hetero)arylcarboxamides such as **ICF01012** have already shown high, specific and long lasting binding to melanin²⁶ resulting from ionic and hydrophobic interactions.²⁷ In order to study whether the melanin-targeting ligand derived from **ICF01012** remains able to recognise the melanin target once grafted onto the dendritic structures, SPR experiments on immobilized melanin were performed at different concentrations ($1 \mu\text{M}$ to $100 \mu\text{M}$) with functionalized dendritic probes (DPs) **1** and **3** as well as with unfunctionalized control dendritic probe **4**. This technique allows real time quantification of the specific interaction between the DPs and melanin. Results of SPR binding assays are presented in Fig. 6. The affinity of the tetraspecific melanin targeting ligand **3** was more than 2 to 4 times higher than the ligand **ICF01012** itself and more than 54 to 280 higher than unfunctionalized DP **4** which affinity remained very low whatever the concentration. Multivalent targeting probe **3** can provide high avidity improvements at low concentration ($>280 \text{ RU}$) compared to the linear probe **1** (3.4 RU) thanks to the simultaneous binding interactions with melanin. Surprisingly, the melanin affinity of linear probe **1** was very low compared to ligand **ICF01012**. This might be due to the possible ionic interactions between the positively charged melanin targeting ligand and the DOTA carboxylates in the operating conditions thus dramatically decreasing the affinity to melanin. The very low affinity of unfunctionalized dendritic probe **4** confirms that the melanin affinity of all DPs is due to the presence of the targeting ligand moieties.

DPs were labeled with $^{111}\text{InCl}_3$ in citrate buffer at pH 5. After steric exclusion chromatography purification, radiolabeled DPs

were obtained with a high radiochemical purity exceeding 97%. Radiochemical yields of 40–50% were obtained. Negligible radioactivity was lost from ^{111}In -DP after incubation at 37 °C in PBS. Radiochemical purity was still greater than 95% in PBS after 48 h for ^{111}In -1–3. Kinetic stability of radiolabeled DPs in the presence of a competitive chelator (diethylenetriamine pentaacetic acid) (DTPA) was although evaluated. At 48 h post labeling, negligible radiochemical purity decrease was observed for ^{111}In -1–3 indicating that radiolabeled DPs were kinetically stable and suitable to perform *in vitro* and *in vivo* precise quantitative biodistribution.

The capacity of ^{111}In -radiolabeled **1**, **2**, **3** and **4** to bind to pigmented cells was evaluated at different time points in B16F10 cell line (Fig. 7a). After 1 h, 2 h (data not shown) and 4 h incubation, uptake was less than 1% for all tested probes. Uptake of linear ^{111}In -1 was progressive and reached $1.93 \pm 0.02\%$ at 48 h. After 48 h of incubation, increased uptakes were observed for ^{111}In -3 and ^{111}In -2 ($4.00 \pm 0.92\%$ and $2.7 \pm 0.06\%$ of binding respectively) compared to ^{111}In -1 reaching significance for both ($*p < 0.05$, student test). Such a result can be related to the number of melanin-targeting ligands per DP, *i.e.* 4 for tetramer **3** vs. 2 for dimer **2**. Cellular uptake of the unfunctionalized dendritic probe ^{111}In -4 did not exceed 1% at 48 h and was statistically lower than ^{111}In -1, ^{111}In -2 and ^{111}In -3 uptakes (Fig. 7a). The poor internalization of ^{111}In -4 could be attributed to the charge of the radiolabeled DOTA which reduces the diffusion across cell membrane. Moreover, addition of a bifunctional chelator and coordination to the metal led to a DP

with lower ability to enter the cell. Nevertheless, the *in vitro* cellular uptake of ^{111}In -1–3 increased with incubation time and was correlated to the number of melanin-targeting ligands per DP.

The uptake percentages did not change significantly when the cells were incubated at 4 °C (Fig. 7b). These results implied that cell penetration was mainly passive as previously described for **ICF01012** analogues.²⁸

As previously reported²⁹ iodoquinoxaline **ICF01012** has a strong affinity towards melanin. To check if such a specificity remains in the dendritic conjugates, we assessed cellular uptake in both pigmented and non-pigmented melanoma cell lines (Fig. 8) and observed a significant uptake increase in relation to the amount of melanin for ^{111}In -1 (1.93 ± 0.02 vs. $1.33 \pm 0.29\%$; $p = 0.02$; student test) and ^{111}In -3 (4.00 ± 0.92 vs. $1.73 \pm 0.21\%$, $p = 0.01$, student test) whereas it was not significant for ^{111}In -2 ($p = 0.09$, student test). As expected, no uptake differences could be highlighted between the two cell lines for ^{111}In -4. Although for ^{111}In -2 the difference between pigmented and non pigmented B16F10 did not reach statistical significance, differential uptakes assessed specific interaction between ^{111}In -3 probe and melanin. Furthermore, the progressive increase in ^{111}In cellular uptake according to the number of ligands did also support for the specificity of interaction.

In previous studies on technetium-99m arylcarboxamides,^{18b} Auzeloux *et al.* reported a maximal melanoma tumor uptake of 2.63% ID g^{-1} at only 5 min post intravenous (i.v.) injection (p.i.) for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N bisaminothiol derivatives whereas Eisenhut *et al.* reported values of 3.42% ID g^{-1} at 1 h to 4.35% ID g^{-1} at 6 h p.i. for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ complex of 4-(*S*-benzoyl-2-thioacetyl-glycyl-glycylamido)-*N*-(2-diethylaminoethyl)benzamide ligand but with poor tumor/blood ratio.

In order to evaluate the ability of ^{111}In -DPs to target tumors *in vivo*, biodistribution studies were performed in B16F0 melanoma bearing mice at 2 h, 4 h, 24 h and 48 h p.i. ($n = 3$ or 4 for each groups). After i.v. injection of ^{111}In -1–3 (see ESI[†]) high level of radioactivity were observed in kidneys

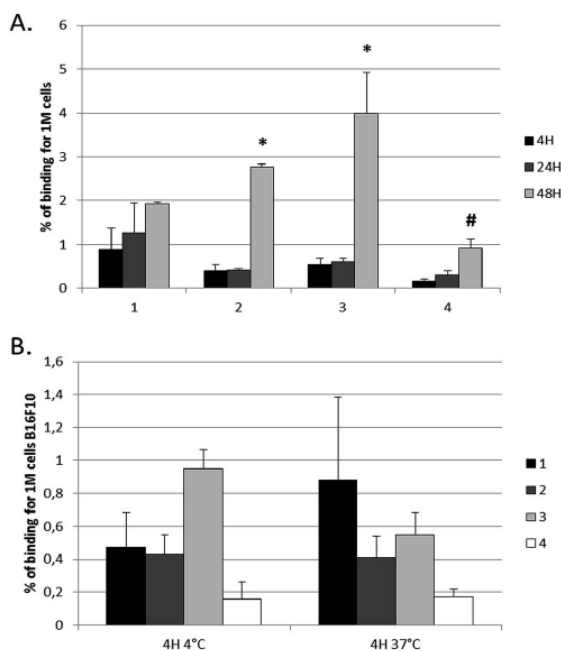


Fig. 7 Comparative uptake studies for probes ^{111}In -1–4 in pigmented B16F10 cell line. (A) Kinetics of % of cellular binding at 4, 24 and 48 h post incubation at 37 °C. $*, \# p < 0.05$, different from controls (B) comparison of cellular uptake for ^{111}In -1–4 at 4 °C and 37 °C.

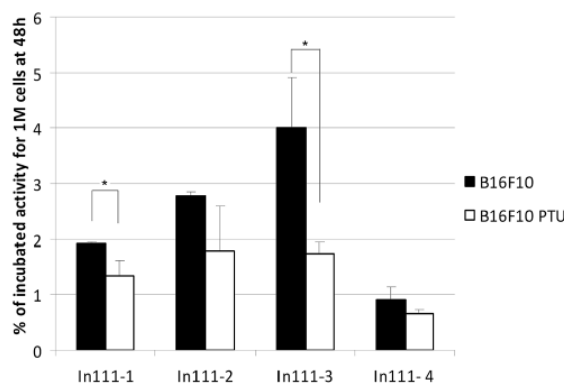


Fig. 8 Comparative studies of probes ^{111}In -1–4 uptakes as a function of melanin content at 48 h post incubation in B16F10 cell line treated with or without PTU ($* p < 0.05$).

(e.g. 24.4% ID g^{-1} and 17.8% ID g^{-1} for $^{111}In-2$ and $^{111}In-3$, respectively) and bladder at 2 h post injection. For $^{111}In-1$, most of the radioactivity was observed in bladder (up to 85% at 2 h p.i.). Renal and hepatobiliary excretions of $^{111}In-DPs$ evaluated by measuring faeces and urine activity are presented in Fig. 9. $^{111}In-DPs$ were predominantly eliminated through renal excretion with $90.3 \pm 3.0\%$ ID, $82.7 \pm 4.9\%$ ID and $66.1 \pm 17.2\%$ ID at 24 h p.i. for $^{111}In-1$, $^{111}In-2$ and $^{111}In-3$ respectively, together with a small biliary excretion. The clearance of $^{111}In-1$ and $^{111}In-2$ were significantly faster than $^{111}In-3$ at all investigation time points. The highest tumor accumulation was observed with $^{111}In-3$ at 4 h p.i. ($12.7 \pm 1.6\%$ ID g^{-1} vs. $5.4 \pm 1.6\%$ ID g^{-1} at 2 h) and over than 11% ID g^{-1} for any tumor weight whatsoever (data not shown). For $^{111}In-2$, no increasing tumor uptake was evidenced between 2 to 4 h p.i. ($8.1 \pm 2.3\%$ ID g^{-1} at 2 h vs. $8.0 \pm 4.4\%$ ID g^{-1} at 4 h). The monovalent dendrimer (1) showed a poor tumor accumulation and retention in agreement with our *ex vivo* results. With $^{111}In-1$, the highest mean values of tumor uptake was $1.5 \pm 0.5\%$ ID g^{-1} and was observed at 24 h p.i.

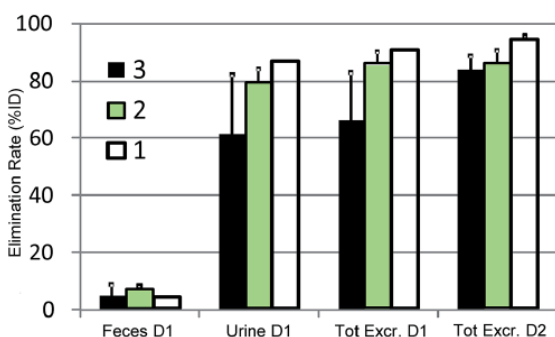


Fig. 9 Comparison of the elimination pathways of ^{111}In -radiolabeled probes 1–3 and standard deviation of the feces and urine excretion rates at one day (D1) post-iv, and the sum of total excretion rate at one day (D1) and two days (D2) post iv.

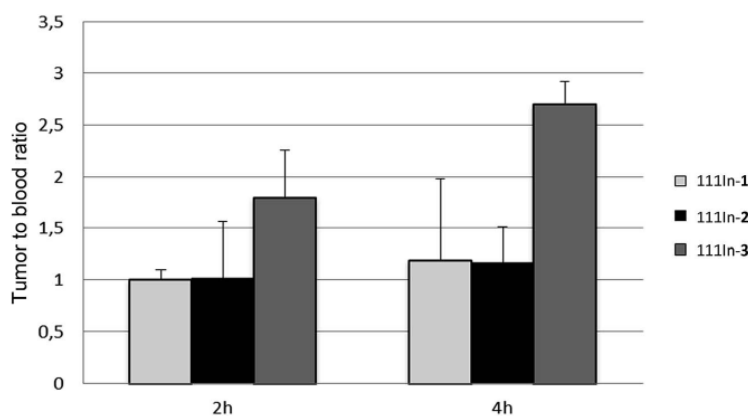


Fig. 10 Quantitative analysis of ^{111}In -radiolabeled probes 1–3 at 2 and 4 h post iv. Injection in mice bearing B16F10 melanoma, expressed as tumor to blood ratio (TBR).

Tumor uptake was significantly (student *t* test, $p < 0.05$) higher for $^{111}In-3$ as compared to $^{111}In-1$ and $^{111}In-2$ at 2 and 4 h p.i. respectively. TBR for $^{111}In-1-3$ are presented in Fig. 10. TBR was significantly higher (student *t* test, $p < 0.05$) for $^{111}In-3$ at 2 h and 4 h post injection with value of 1.8 ± 0.4 (at 2 h post injection) and 2.7 ± 0.2 (at 4 h post injection) as compared to 1.0 ± 0.1 and 1.2 ± 0.8 for $^{111}In-1$ at 2 and 4 h post injection respectively and to 1.0 ± 0.5 and 1.2 ± 0.3 respectively at 2 and 4 h post injection for $^{111}In-2$. The uptake in brain was insignificant at all times points for $^{111}In-1$, $^{111}In-2$ and $^{111}In-3$ which suggest that $^{111}In-DP$ could not cross the blood brain barrier.

The complete biodistribution of $^{111}In-3$ is presented in Fig. 11. Moderate liver activity has been observed with a maximum at 24 h p.i. ($16.0 \pm 6.7\%$ ID g^{-1}) indicating a possible K pfer cell uptake followed by a dramatic decrease at 48 h p.i. ($2.2 \pm 0.9\%$ ID g^{-1}). As demonstrated by the total activity of liver and spleen at 48 h (Fig. 11), the reticuloendothelial system (RES) uptake was also very low. No significant lungs accumulation was observed at any time. Moreover, rapid clearance from non-target organs combined with high tumor to muscle ratio (9.8 ± 2.2) make $^{111}In-3$ a good candidate for tumor imaging.³⁰

Indeed, an optimal radiotracer should be able to have a high tumor uptake with a diagnostically useful target-to-background ratio in a short period of time. To achieve this goal, the radiotracer should have a fast blood clearance to minimize non-target radioactivity. The time for the radiotracer to reach the target should also be short. We showed that dendritic nanoprobe $^{111}In-3$ fully fits into these criteria. Its high *in vivo* targeting efficiency towards an intracellular target makes such nanoprobe a promising candidate for clinical tumor diagnosis. The purpose of this research, namely preclinical proof-of-concept for exploiting small dendrons in melanoma diagnosis has been clearly demonstrated. Furthermore DOTA being a strong chelator for a variety of beta- or alpha-emitting radiometals such as yttrium 90, lutetium 177 or bismuth 213,³¹ it allows envisaging their use in TRT.

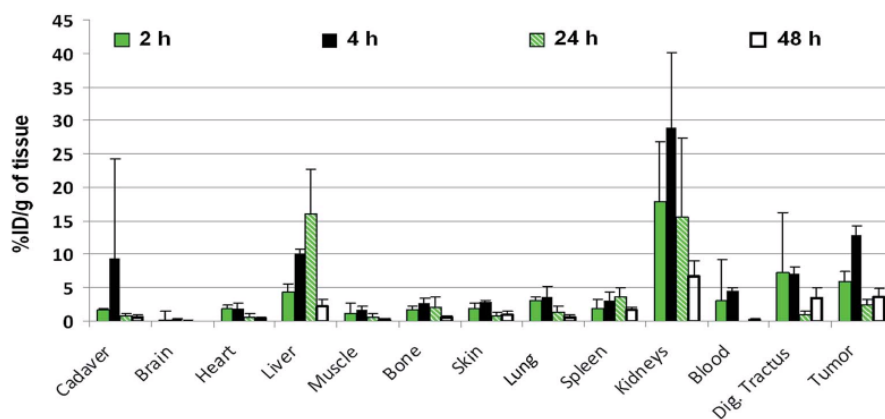


Fig. 11 Quantitative biodistribution pathways of ^{111}In -radiolabeled probe 3 as a function of post i.v. injection delay (2 h, 4 h, 24 h, 48 h) expressed in % ID per gram of tissue, in the normal tissues and tumor.

Conclusions

We reported herein the synthesis and ^{111}In -radiolabeling of three melanin-targeting dendritic probes and characterized both their *in vitro* and *in vivo* targeting efficiencies. SPR experiments (Biacore® test) showed that tetravalent dendritic probe 3 displayed significant increased affinity towards synthetic melanin compared to ligand **ICF01012** but also to divalent dendritic probe 2. Such a result, correlated with *in vitro* cellular uptake studies, accounts for a strong correlation between *in vivo* tumor uptake of ^{111}In -DP and the number of melanin-targeting ligands grafted per DP. In this regard, multivalent but small all-organic nanoprobe may have a bright future not only for imaging sensitivity enhancement but also for TRT applications in order to deliver *in vivo* radiation doses to tumors.

Acknowledgements

This work was financially supported by the CNRS, the University of Strasbourg, the Région Alsace (fellowship to A. Parat), the association "L'Alsace contre le cancer". The «Nano@matrix» project co-financed by the European Union (European Regional Development Fund – ERDF) in the framework of the program INTERREG IV Upper Rhine Valley «Transcending borders with every project» is also acknowledged (fellowship to A. Garofalo). We would like to thank Emilie Voirin and Emilie Couzigné for their assistance and Dr Jean-Marc Strub for Mass Spectrometry measurements.

References

- (a) H. M. Liu, H. Wang, W. J. Yang and Y. Y. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 17680–17687; (b) X. Xu, Y. Jian, Y. Li, X. Zhang, Z. Tu and Z. Gu, *ACS Nano*, 2014, **8**(9), 9255–9264.
- (a) X. Liu, P. Rocchi and L. Peng, *New J. Chem.*, 2012, **36**, 256–263; (b) G. M. Soliman, A. Sharma, D. Maysinger and A. Kakkar, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 9572–9587; (c) Y. Cheng, L. Zhao, Y. Li and T. Xu, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 2673–2703; (d) R. Dong, L. Zhou, J. Wu, C. Tu, Y. Su, B. Zhu, H. Gu, D. Yan and X. Zhu, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 5473–5475; (e) C. Wrängler, S. Maschauer, O. Prante, M. Schäfer, R. Schirmacher, P. Bartenstein, M. Eisenhut and B. Wrängler, *ChemBioChem*, 2010, **11**, 2168–2181; (f) A. Almutairi, R. Rossin, M. Shokeen, A. Hagooley, A. Ananth, B. Capoccia, S. Guillaudeau, D. Abendschein, C. J. Anderson, M. J. Welch and J. M. J. Fréchet, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 685–690; (g) N. Sato, H. Kobayashi, T. Saga, Y. Nakamoto, T. Ishimori, K. Togashi, Y. Fujibayashi, J. Konishi and M. W. Brechbiel, *Clin. Cancer Res.*, 2001, **7**, 3606–3612; (h) H. Kobayashi, Y. Koyama, T. Barrett, Y. Hama, C. A. S. Regino, I. S. Shin, B. S. Jang, N. Le, C. H. Paik, P. L. Choyke and Y. Urano, *ACS Nano*, 2007, **1**, 258–264.
- (a) S. Langereis, A. Dirksen, T. M. Hackeng, M. H. P. van Genderen and E. W. Meijer, *New J. Chem.*, 2007, **31**, 1152–1160; (b) A. J. L. Villaraza, A. Bumb and M. W. Brechbiel, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2921–2959; (c) M. R. Longmire, M. Ogawa, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 993–1000.
- (a) V. S. Talanov, C. A. S. Regino, H. Kobayashi, M. Bernardo, P. L. Choyke and M. W. Brechbiel, *Nano Lett.*, 2006, **6**(7), 1459–1463; (b) Y. Koyama, V. S. Talanov, M. Bernardo, Y. Hama, C. A. S. Regino, M. W. Brechbiel, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *J. Magn. Reson. Imaging*, 2007, **25**(4), 866–871.
- C. Ghobril, G. Lamanna, M. Kueny-Stotz, A. Garofalo, C. Billotey and D. Felder-Flesch, *New J. Chem.*, 2012, **36**, 310–323.
- P. Kesharwani, K. Jain and N. K. Jain, *Prog. Polym. Sci.*, 2014, **39**(2), 268–307.
- R. F. Barth, D. M. Adams, A. H. Soloway, F. Alam and M. V. Darby, *Bioconjugate Chem.*, 1994, **5**, 58–66.
- (a) A. Gruaz-Guyon, E. Janevik-Ivanovska, O. Raguin, C. De Labriolle-Vaylet and J. Barbet, *J. Nucl. Med.*, 2001, **45**, 201–

- 206; (b) M. Hillairet De Boisferon, *Bioconjugate Chem.*, 2002, **13**, 654–662.
- 9 J. Lehtinen, M. Raki, K. A. Bergström, P. Uutela, K. Lehtinen, A. Hiltunen, J. Pikkarainen, H. Liang, S. Pitkänen, A.-M. Määttä, R. A. Ketola, M. Yliperttula, T. Wirth and A. Urtti, *PLoS One*, 2012, **7**(7), e41410.
- 10 D. M. Goldenberg, J. Chatal, J. Barbet, O. Boerman and R. M. Sharkey, *Update Canc. Therapeut.*, 2007, **2**, 19–31.
- 11 (a) Z. Wu, Z. B. Li, K. Chen, W. Cai, L. He, F. T. Chin, F. Li and X. Chen, *J. Nucl. Med.*, 2007, **48**, 1536–1544; (b) J. Yang, J. Lu and Y. Miao, *Mol. Pharmaceutics*, 2012, **9**, 1418–1424; (c) J. Yang, H. Guo, F. Gallazzi, M. Berwick, R. S. Padilla and Y. Miao, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 1634–1642.
- 12 Z. Poon, S. Chen, A. C. Engler, H.-I. Lee, E. Atas, G. Von Maltzahn, S. N. Bhatia and P. T. Hammond, *Angew. Chem.*, 2010, **122**, 7424–7448; *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 7266–7270.
- 13 L. Finn, S. N. Markovic and R. W. Joseph, *BMC Med.*, 2012, **10**, 23.
- 14 (a) S. Thompson, B. Ballard, Z. Jiang, E. Revskaya, N. Sisay, W. H. Miller, C. S. Cutler, E. Dadachova and L. C. Francesconi, *Nucl. Med. Biol.*, 2014, **41**, 276–281; (b) J. L. Joyal, J. A. Barrett, J. C. Marquis, J. Chen, S. M. Hillier, K. P. Maresca, M. Boyd, K. Gage, S. Nimmagadda, J. F. Kronauge, M. Friebe, L. Dinkelborg, J. B. Stubbs, M. G. Stabin, R. Mairs, M. G. Pomper and J. W. Babich, *Cancer Res.*, 2010, **70**, 4045–4053; (c) F. Degoul, M. Borel, N. Jacquemot, S. Besse, Y. Communal, F. Mishellany, J. Papon, F. Penault-Llorca, D. Donnarieix, M. Doly, L. Maigne, E. Miot-Noirault, A. Cayre, J. Cluzel, N. Moins, J. M. Chezal and M. Bonnet, *Int. J. Cancer*, 2013, **133**, 1042–1053.
- 15 W. Mier, C. Kratochwil, J. C. Hassel, F. L. Giesel, B. Beijer, J. W. Babich, M. Friebe, M. Eisenhut, A. Enk and U. Haberkorn, *J. Nucl. Med.*, 2014, **55**, 9–14.
- 16 (a) N. Moins, M. D'Incan, J. Bonafous, F. Bacin, P. Labarre, M. F. Moreau, D. Mestas, E. Noirault, F. Chossat, E. Berthommier, J. Papon, M. Bayle, P. Souteyrand, J. C. Madelmont and A. Veyre, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2002, **29**, 1478–1484; (b) D. Denoyer, I. Greguric, P. Roselt, O. C. Neels, N. Aide, S. R. Taylor, A. Katsifis, D. S. Dorow and R. J. Hicks, *J. Nucl. Med.*, 2010, **51**, 441–447.
- 17 (a) R. Larisch, K. W. Schulte, H. Vosberg, T. Ruzicka and H. W. Müller-Gärtner, *J. Nucl. Med.*, 1998, **39**, 996–1001; (b) M. Eisenhut, W. E. Hull, A. Mohammed, W. Mier, D. Lay, W. Just, K. Gorgas, W. D. Lehmann and U. Haberkorn, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3913–3922; (c) F. Cachin, E. Miot-Noirault, B. Gillet, V. Isnardi, B. Labeille, P. Payoux, N. Meyer, S. Cammilleri, C. Gaudy, M. Razzouk-Cadet, J. P. Lacour, F. Granel-Brocard, C. Tychyj, F. Benbouzid, J. D. Grange, F. Baulieu, A. Kelly, C. Merlin, D. Mestas, F. Gachon, J. M. Chezal, F. Degoul and M. D'Incan, *J. Nucl. Med.*, 2014, **55**, 15–22; (d) L. Rbah-Vidal, A. Vidal, S. Besse, F. Cachin, M. Bonnet, L. Audin, S. Askienasy, F. Dollé, F. Degoul, E. Miot-Noirault, N. Moins, P. Auzeloux and J. M. Chezal, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2012, **39**, 1449–1461.
- 18 (a) M. Eisenhut, A. Mohammed, W. Mier, F. Schönsiegel, M. Friebe, A. Mahmood, A. G. Jones and U. Haberkorn, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 5802–5805; (b) P. Auzeloux, J. Papon, E. M. Azim, M. Borel, R. Pasqualini, A. Veyre and J. C. Madelmont, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 190–198.
- 19 A. M. Caminade, C. O. Turrin and J. P. Majoral, *New J. Chem.*, 2010, **34**, 1512–1524.
- 20 (a) X. Liu, P. Rocchi and L. Peng, *New J. Chem.*, 2012, **36**, 256; (b) M. Guillot-Nieckowski, S. Eisler and F. Diederich, *New J. Chem.*, 2007, **31**, 1111–1127.
- 21 J. W. Lee, B. K. Kim, H. J. Kim, S. C. Han, W. S. Shin and S.-H. Jin, *Macromolecules*, 2006, **39**, 2418–2422.
- 22 (a) C. Ghobril, G. Popa, A. Parat, C. Billotey, J. Taleb, P. Bonazza, S. Begin-Colin and D. Felder-Flesch, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 9158–9160; (b) A. Garofalo, A. Parat, C. Bordeianu, C. Ghobril, M. Kueny-Stotz, A. Walter, J. Joughannaud, S. Begin-Colin and D. Felder-Flesch, *New J. Chem.*, 2014, **38**, 5226–5239.
- 23 I. Dijkgraaf, A. Y. Rijnders, A. Soede, A. C. Dechesne, G. Wilma van Esse, A. J. Brouwer, F. H. M. Corstens, O. C. Boerman, D. T. S. Rijkers and R. M. J. Liskamp, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 935–944.
- 24 J. Liu, M. Yu, X. Ning, C. Zhou, S. Yang and J. Zheng, *Angew. Chem.*, 2013, **125**, 12804–12808; *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 12572.
- 25 (a) J. M. Chezal, J. Papon, P. Labarre, C. Lartigue, M. J. Galmier, C. Decombat, O. Chavignon, J. Maublant, J. C. Teulade, J. C. Madelmont and N. Moins, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 3133–3144; (b) J. Molieras, J. M. Chezal, E. Miot-Noirault, A. Roux, L. Heinrich-Balard, R. Cohen, S. Tarrit, C. Truillet, A. Mignot, R. Hachani, D. Kryza, R. Antoine, P. Dugourd, P. Perriat, M. Janier, L. Sancey, F. Lux and O. Tillement, *Nanoscale*, 2013, **5**, 1603–1615.
- 26 J. C. Madelmont, J. M. Chezal, O. Chavignon, J. C. Teulade and N. Moins, WO2008012782, 2008.
- 27 P. Labarre, J. Papon, M. F. Moreau, N. Moins, M. Bayle, A. Veyre and J. C. Madelmont, *Melanoma Res.*, 2002, **12**, 115–121.
- 28 (a) L. Rbah-Vidal, A. Vidal, S. Besse, F. Cachin, M. Bonnet, L. Audin, S. Askienasy, F. Dollé, F. Degoul, E. Miot-Noirault, N. Moins, P. Auzeloux and J. M. Chezal, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2012, **39**, 1449–1461; (b) M. Gardette, J. Papon, M. Bonnet, N. Desbois, P. Labarre, T. D. Wu, E. Miot-Noirault, J. C. Madelmont, J. L. Guerquin-Kern, J. M. Chezal and N. Moins, *Invest. New Drugs*, 2011, **29**, 1253–1263.
- 29 M. Bonnet-Duquennoy, J. Papon, F. Mishellany, P. Labarre, J. L. Guerquin-Kern, T. D. Wu, M. Gardette, J. Maublant, F. Penault-Llorca, E. Miot-Noirault, A. Cayre, J. C. Madelmont, J. M. Chezal and N. Moins, *Int. J. Cancer*, 2009, **125**, 708–716.
- 30 J. Q. Chen. Bloms I Lund (Sweden), 1996, 30.
- 31 (a) W. A. Breeman, M. De Jong, T. J. Visser, J. L. Erion and E. P. Krenning, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2003, **30**, 917–920; (b) M. D. Hylarides, D. B. Axworthy and A. R. Fritzberg, *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 2001, **44**, S726–S728.

Références

bibliographiques

- Abbasi, N.R., Shaw, H.M., Rigel, D.S., Friedman, R.J., McCarthy, W.H., Osman, I., Kopf, A.W., and Polsky, D. (2004). Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA* 292, 2771–2776.
- Agrawal, V., Maharjan, S., Kim, K., Kim, N.-J., Son, J., Lee, K., Choi, H.-J., Rho, S.-S., Ahn, S., Won, M.-H., et al. (2014). Direct endothelial junction restoration results in significant tumor vascular normalization and metastasis inhibition in mice. *Oncotarget* 5, 2761–2777.
- Akbani, R., Akdemir, K.C., Aksoy, B.A., Albert, M., Ally, A., Amin, S.B., Arachchi, H., Arora, A., Auman, J.T., Ayala, B., et al. (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 161, 1681–1696.
- Albert, J.M., Cao, C., Kim, K.W., Willey, C.D., Geng, L., Xiao, D., Wang, H., Sandler, A., Johnson, D.H., Colevas, A.D., et al. (2007). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase enhances cell death and improves tumor growth delay in irradiated lung cancer models. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 3033–3042.
- Aleem, E., and Arceci, R.J. (2015). Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Front. Cell Dev. Biol.* 3.
- Allen, B.J., Singla, A.A., Rizvi, S.M.A., Graham, P., Bruchertseifer, F., Apostolidis, C., and Morgenstern, A. (2011). Analysis of patient survival in a Phase I trial of systemic targeted α -therapy for metastatic melanoma. *Immunotherapy* 3, 1041–1050.
- Amé, J.-C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 26, 882–893.
- Amundson, S.A., Do, K.T., Vinikoor, L.C., Lee, R.A., Koch-Paiz, C.A., Ahn, J., Reimers, M., Chen, Y., Scudiero, D.A., Weinstein, J.N., et al. (2008). Integrating global gene expression and radiation survival parameters across the 60 cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *Cancer Res.* 68, 415–424.
- Ando, H., Niki, Y., Yoshida, M., Ito, M., Akiyama, K., Kim, J.-H., Yoon, T.-J., Matsui, M.S., Yarosh, D.B., and Ichihashi, M. (2011). Involvement of pigment globules containing multiple melanosomes in the transfer of melanosomes from melanocytes to keratinocytes. *Cell. Logist.* 1, 12–20.
- Ando, H., Niki, Y., Ito, M., Akiyama, K., Matsui, M.S., Yarosh, D.B., and Ichihashi, M. (2012). Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1222–1229.
- Apel, A., Zentgraf, H., Büchler, M.W., and Herr, I. (2009). Autophagy—A double-edged sword in oncology. *Int. J. Cancer* 125, 991–995.
- Arienti, C., Tesei, A., Carloni, S., Ulivi, P., Romeo, A., Ghigi, G., Menghi, E., Sarnelli, A., Parisi, E., Silvestrini, R., et al. (2013). SLUG silencing increases radiosensitivity of melanoma cells in vitro. *Cell. Oncol. Dordr.* 36, 131–139.

-
- Ascierto, P.A., Marincola, F.M., and Atkins, M.B. (2015). What's new in melanoma? Combination! *J. Transl. Med.* *13*, 213.
- Atkinson, J.M., Rank, K.B., Zeng, Y., Capen, A., Yadav, V., Manro, J.R., Engler, T.A., and Chedid, M. (2015). Activating the Wnt/ β -Catenin Pathway for the Treatment of Melanoma – Application of LY2090314, a Novel Selective Inhibitor of Glycogen Synthase Kinase-3. *PLoS ONE* *10*, e0125028.
- Baish, J.W., Stylianopoulos, T., Lanning, R.M., Kamoun, W.S., Fukumura, D., Munn, L.L., and Jain, R.K. (2011). Scaling rules for diffusive drug delivery in tumor and normal tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 1799–1803.
- Balu, M., Kelly, K.M., Zachary, C.B., Harris, R.M., Krasieva, T.B., König, K., Durkin, A.J., and Tromberg, B.J. (2014). Distinguishing between Benign and Malignant Melanocytic Nevi by In Vivo Multiphoton Microscopy. *Cancer Res.* *74*, 2688–2697.
- Bandarchi, B., Ma, L., Navab, R., Seth, A., and Rasty, G. (2010). From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol. Res. Pract.* *2010*.
- Bertolotto, C. (2013). Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica* *2013*, 635203.
- Biau, J., Devun, F., Jdey, W., Kotula, E., Quanz, M., Chautard, E., Sayarath, M., Sun, J.-S., Verrelle, P., and Dutreix, M. (2014). A preclinical study combining the DNA repair inhibitor dbait with radiotherapy for the treatment of melanoma. *Neoplasia* *16*, 835–844.
- Biechele, T.L., Camp, N.D., Fass, D.M., Kulikauskas, R.M., Robin, N.C., White, B.D., Taraska, C.M., Moore, E.C., Muster, J., Karmacharya, R., et al. (2010). Chemical-genetic screen identifies riluzole as an enhancer of Wnt/ β -catenin signaling in melanoma. *Chem. Biol.* *17*, 1177–1182.
- Bixel, K., and Hays, J.L. (2015). Olaparib in the management of ovarian cancer. *Pharmacogenomics Pers. Med.* *8*, 127–135.
- Blackburn, J.S., Rhodes, C.H., Coon, C.I., and Brinckerhoff, C.E. (2007). RNA interference inhibition of matrix metalloproteinase-1 prevents melanoma metastasis by reducing tumor collagenase activity and angiogenesis. *Cancer Res.* *67*, 10849–10858.
- Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S., and Kuliopulos, A. (2005). PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* *120*, 303–313.
- Bolch, W.E., Eckerman, K.F., Sgouros, G., and Thomas, S.R. (2009). MIRD pamphlet No. 21: a generalized schema for radiopharmaceutical dosimetry--standardization of nomenclature. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* *50*, 477–484.
- Bonnet, M., Mishellany, F., Papon, J., Cayre, A., Penault-Llorca, F., Madelmont, J.C., Miot-Noirault, E., Chezal, J.M., and Moins, N. (2010). Anti-melanoma efficacy of internal radionuclide therapy in relation to melanin target distribution. *Pigment Cell Melanoma Res.* *23*, e1–e11.
- Bonnet-Duquennoy, M., Papon, J., Mishellany, F., Labarre, P., Guerquin-Kern, J.-L., Wu, T.-D., Gardette, M., Maublant, J., Penault-Llorca, F., Miot-Noirault, E., et al. (2009). Targeted radionuclide therapy of melanoma: anti-tumoural efficacy studies of a new ¹³¹I labelled potential agent. *Int J Cancer* *125*, 708–716.
- Boudousq, V., Ricaud, S., Garambois, V., Bascoul-Mollevis, C., Boutaleb, S., Busson, M., Quenet, F., Colombo, P.-E., Bardiès, M., Kotzki, P.-O., et al. (2010). Brief intraperitoneal radioimmunotherapy of small peritoneal carcinomatosis using high activities of noninternalizing ¹²⁵I-labeled monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* *51*, 1748–1755.
- Boudousq, V., Bobyk, L., Busson, M., Garambois, V., Jarlier, M., Charalambatou, P., Pèlegri, A., Paillas, S., Chouin, N., Quenet, F., et al. (2013). Comparison between internalizing anti-HER2 mAbs and non-internalizing anti-CEA mAbs in alpha-radioimmunotherapy of small volume peritoneal carcinomatosis using ²¹²Pb. *PloS One* *8*, e69613.
-

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bridges, K.A., Hirai, H., Buser, C.A., Brooks, C., Liu, H., Buchholz, T.A., Molkentine, J.M., Mason, K.A., and Meyn, R.E. (2011). MK-1775, a novel Wee1 kinase inhibitor, radiosensitizes p53-defective human tumor cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 5638–5648.
- Brożyna, A.A., Józwicki, W., Carlson, J.A., and Slominski, A.T. (2013). Melanogenesis affects overall and disease-free survival in patients with stage III and IV melanoma. *Hum. Pathol.* 44, 2071–2074.
- Cachin, F., Chezal, J.-M., Miot-Noirault, E., Moins, N., Auzeloux, P., Vidal, A., Bonnet-Duquennoy, M., Boisgard, S., Filaire, M., Mestas, D., et al. (2009). Nouveaux traceurs TEMP : exemple des traceurs des protéoglycanes et de la mélanine. *Médecine Nucl.* 33, 161–167.
- Cachin, F., Miot-Noirault, E., Gillet, B., Isnardi, V., Labeille, B., Payoux, P., Meyer, N., Cammilleri, S., Gaudy, C., Razzouk-Cadet, M., et al. (2014). (123)I-BZA2 as a melanin-targeted radiotracer for the identification of melanoma metastases: results and perspectives of a multicenter phase III clinical trial. *J Nucl Med* 55, 15–22.
- Calugaru, V., Magné, N., Hérault, J., Bonvalot, S., Le Tourneau, C., and Thariat, J. (2015). [Nanoparticles and radiation therapy]. *Bull. Cancer (Paris)* 102, 83–91.
- Cannan, W.J., and Pederson, D.S. (2015). Mechanisms and Consequences of Double-strand DNA Break Formation in Chromatin. *J. Cell. Physiol.*
- Cao, Z., Shang, B., Zhang, G., Miele, L., Sarkar, F.H., Wang, Z., and Zhou, Q. (2013). Tumor cell-mediated neovascularization and lymphangiogenesis contrive tumor progression and cancer metastasis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1836, 273–286.
- Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G.J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., Osborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., et al. (2013). A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* 24, 466–480.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011a). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011b). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 417–427.
- Chang, C.-C., Chang, C.-H., Shen, C.-C., Chen, C.-L., Liu, R.-S., Lin, M.-H., and Wang, H.-E. (2015). Synthesis and evaluation of $^{123}/^{131}\text{I}$ -Iochlonicotinamide as a novel SPECT probe for malignant melanoma. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 2261–2269.
- Cheli, Y., Giuliano, S., Guiliano, S., Botton, T., Rocchi, S., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2011). Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene* 30, 2307–2318.
- Cheli, Y., Giuliano, S., Fenouille, N., Allegra, M., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Lacour, J.-P., Tartare-Deckert, S., Bertolotto, C., et al. (2012). Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. *Oncogene* 31, 2461–2470.
- Cheli, Y., Bonnazi, V.F., Jacquél, A., Allegra, M., De Donatis, G.M., Bahadoran, P., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2014). CD271 is an imperfect marker for melanoma initiating cells. *Oncotarget* 5, 5272–5283.
- Cheng, Y., Zhang, G., and Li, G. (2013). Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 32, 567–584.
- Chezal, J.-M., Papon, J., Labarre, P., Lartigue, C., Galmier, M.-J., Decombat, C., Chavignon, O., Maublant, J., Teulade, J.-C., Madelmont, J.-C., et al. (2008). Evaluation of radiolabeled (hetero)aromatic analogues of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide for imaging and targeted radionuclide therapy of melanoma. *J. Med. Chem.* 51, 3133–3144.
- Chien, A.J., Moore, E.C., Lonsdorf, A.S., Kulikauskas, R.M., Rothberg, B.G., Berger, A.J., Major, M.B., Hwang, S.T., Rimm, D.L., and Moon, R.T. (2009). Activated Wnt/beta-catenin signaling in

-
- melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 1193–1198.
- Christofori, G. (2006). New signals from the invasive front. *Nature* *441*, 444–450.
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., and Tymińska, A. (2013). Skin melanocytes: biology and development. *Postępy Dermatol. Alergol.* *30*, 30–41.
- Civenni, G., Walter, A., Kobert, N., Mihic-Probst, D., Zipser, M., Belloni, B., Seifert, B., Moch, H., Dummer, R., van den Broek, M., et al. (2011). Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer Res.* *71*, 3098–3109.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* *66*, 9339–9344.
- Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell* *149*, 1192–1205.
- Colak, S., and Medema, J.P. (2014). Cancer stem cells - important players in tumor therapy resistance. *FEBS J.* *281*, 4779–4791.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol.* *5*, 99–118.
- Coquery, N., Pannetier, N., Farion, R., Herbette, A., Azurmendi, L., Clarencon, D., Bauge, S., Josserand, V., Rome, C., Coll, J.-L., et al. (2012). Distribution and radiosensitizing effect of cholesterol-coupled Dbait molecule in rat model of glioblastoma. *PloS One* *7*, e40567.
- Croset, A., Cordelières, F.P., Berthault, N., Buhler, C., Sun, J.-S., Quanz, M., and Dutreix, M. (2013). Inhibition of DNA damage repair by artificial activation of PARP with siDNA. *Nucleic Acids Res.* *41*, 7344–7355.
- Curti, B.D., and Urba, W.J. (2012). Integrating New Therapies in the Treatment of Advanced Melanoma - Springer. *Curr. Treat. Options Oncol.* *13*, 327–339.
- Dadachova, E., Nosanchuk, J.D., Shi, L., Schweitzer, A.D., Frenkel, A., Nosanchuk, J.S., and Casadevall, A. (2004). Dead cells in melanoma tumors provide abundant antigen for targeted delivery of ionizing radiation by a mAb to melanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 14865–14870.
- Dahl, C., and Guldberg, P. (2007). The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *115*, 1161–1176.
- Dantzer, F., Noel, G., and Schreiber, V. (2011). [PARP inhibitors: significant progress in cancer therapy]. *Bull. Cancer (Paris)* *98*, 277–290.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* *417*, 949–954.
- Davis, A.J., and Chen, D.J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl. Cancer Res.* *2*, 130–143.
- Degoul, F., Borel, M., Jacquemot, N., Besse, S., Communal, Y., Mishellany, F., Papon, J., Penault-Llorca, F., Donnarieix, D., Doly, M., et al. (2013). In vivo efficacy of melanoma internal radionuclide therapy with a ¹³¹I-labelled melanin-targeting heteroarylcarboxamide molecule. *Int J Cancer* *133*, 1042–1053.
- Delevoye, C., Giordano, F., van Niel, G., and Raposo, G. (2011). [Biogenesis of melanosomes - the chessboard of pigmentation]. *Médecine Sci. MS* *27*, 153–162.
- Devun, F., Bousquet, G., Biau, J., Herbette, A., Roulin, C., Berger, F., Sun, J.-S., Robine, S., and Dutreix, M. (2012). Preclinical study of the DNA repair inhibitor Dbait in combination with chemotherapy in colorectal cancer. *J. Gastroenterol.* *47*, 266–275.
- Dodson, H., Wheatley, S.P., and Morrison, C.G. (2007). Involvement of Centrosome Amplification in Radiation-Induced Mitotic Catastrophe. *Cell Cycle* *6*, 364–370.
-

- Le Duc, G., Miladi, I., Alric, C., Mowat, P., Bräuer-Krisch, E., Bouchet, A., Khalil, E., Billotey, C., Janier, M., Lux, F., et al. (2011). Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles. *ACS Nano* 5, 9566–9574.
- Dupin, E., and Sommer, L. (2012). Neural crest progenitors and stem cells: From early development to adulthood. *Dev. Biol.* 366, 83–95.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Eriksson, D., and Stigbrand, T. (2010). Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 31, 363–372.
- Ernfors, P. (2010). Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Exp. Cell Res.* 316, 1397–1407.
- Fecher, L.A., Cummings, S.D., Keefe, M.J., and Alani, R.M. (2007). Toward a molecular classification of melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 1606–1620.
- Feoktistova, M., and Leverkus, M. (2015). Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS J.* 282, 19–31.
- Ferlay, J., Soerjomataram I, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman D, D., and Bray, F. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.*
- Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 789–791.
- Fidler, I.J. (2002). Critical determinants of metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 12, 89–96.
- Firsanov, D.V., Solovjeva, L.V., and Svetlova, M.P. (2011). H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues. *Clin. Epigenetics* 2, 283–297.
- 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. *N. Engl. J. Med.* 363, 809–819.
- Forbes, S., Clements, J., Dawson, E., Bamford, S., Webb, T., Dogan, A., Flanagan, A., Teague, J., Wooster, R., Futreal, P.A., et al. (2006). COSMIC 2005. *Br. J. Cancer* 94, 318–322.
- Frank, N.Y., Margaryan, A., Huang, Y., Schatton, T., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Sayegh, M.H., Sadee, W., and Frank, M.H. (2005). ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 65, 4320–4333.
- Friedman, R.J., Rigel, D.S., and Kopf, A.W. (1985). Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA. Cancer J. Clin.* 35, 130–151.
- Gallagher, S.J., Rambow, F., Kumasaka, M., Champeval, D., Bellacosa, A., Delmas, V., and Larue, L. (2013). Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis. *Oncogene* 32, 2230–2238.
- Garbe, C., Eigentler, T.K., Keilholz, U., Hauschild, A., and Kirkwood, J.M. (2011). Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist* 16, 5–24.
- Gatalica, Z., Snyder, C., Maney, T., Ghazalpour, A., Holterman, D.A., Xiao, N., Overberg, P., Rose, I., Basu, G.D., Vranic, S., et al. (2014). Programmed Cell Death 1 (PD-1) and Its Ligand (PD-L1) in Common Cancers and Their Correlation with Molecular Cancer Type. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23, 2965–2970.
- Gembarska, A., Luciani, F., Fedele, C., Russell, E.A., Dewaele, M., Villar, S., Zwolinska, A., Haupt, S., de Lange, J., Yip, D., et al. (2012). MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat. Med.* 18, 1239–1247.
- Genescà, A., Martín, M., Latre, L., Soler, D., Pampalona, J., and Tusell, L. (2006). Telomere dysfunction: a new player in radiation sensitivity. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 28, 1172–1180.
- Glitza, I.C., and Davies, M.A. (2014). Genotyping of cutaneous melanoma. *Chin. Clin. Oncol.* 3, 27.
- Goel, S., Duda, D.G., Xu, L., Munn, L.L., Boucher, Y., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol. Rev.* 91, 1071–1121.

-
- Goel, V.K., Lazar, A.J.F., Warneke, C.L., Redston, M.S., and Haluska, F.G. (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 154–160.
- Goldstein, A.M., Chan, M., Harland, M., Hayward, N.K., Demenais, F., Bishop, D.T., Azizi, E., Bergman, W., Bianchi-Scarra, G., Bruno, W., et al. (2007). Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J. Med. Genet.* *44*, 99–106.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.-V.F., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditulio, R.A., Kastrinakis, N.G., Levy, B., et al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* *434*, 907–913.
- Gould-Rothberg, B.E.G., Bracken, M.B., and Rimm, D.L. (2009). Tissue Biomarkers for Prognosis in Cutaneous Melanoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *101*, 452–474.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., and Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* *445*, 851–857.
- Greguric, I., Taylor, S.R., Denoyer, D., Ballantyne, P., Berghofer, P., Roselt, P., Pham, T.Q., Mattner, F., Bourdier, T., Neels, O.C., et al. (2009). Discovery of [18F]N-(2-(diethylamino)ethyl)-6-fluoronicotinamide: a melanoma positron emission tomography imaging radiotracer with high tumor to body contrast ratio and rapid renal clearance. *J. Med. Chem.* *52*, 5299–5302.
- Haass, N.K., and Herlyn, M. (2005). Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* *10*, 153–163.
- Halaban, R., Zhang, W., Bacchicocchi, A., Cheng, E., Parisi, F., Ariyan, S., Krauthammer, M., McCusker, J.P., Kluger, Y., and Sznol, M. (2010). PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* *23*, 190–200.
- Harris, T.J.C., and Tepass, U. (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 502–514.
- Hashimoto, O., Shinkawa, M., Torimura, T., Nakamura, T., Selvendiran, K., Sakamoto, M., Koga, H., Ueno, T., and Sata, M. (2006). Cell cycle regulation by the Wee1 inhibitor PD0166285, pyrido [2,3-d] pyrimidine, in the B16 mouse melanoma cell line. *BMC Cancer* *6*, 292.
- Hennequin, C., Quero, L., and Favaudon, V. (2011). [DNA repair and tumour radiosensitivity: focus on ATM gene]. *Bull. Cancer (Paris)* *98*, 239–246.
- Hoek, K., Rimm, D.L., Williams, K.R., Zhao, H., Ariyan, S., Lin, A., Kluger, H.M., Berger, A.J., Cheng, E., Trombetta, E.S., et al. (2004). Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res.* *64*, 5270–5282.
- Houtgraaf, J.H., Versmissen, J., and van der Giessen, W.J. (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc. Revascularization Med. Mol. Interv.* *7*, 165–172.
- Hsiao, J.J., and Fisher, D.E. (2014). The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma. *Arch. Biochem. Biophys.* *563*, 28–34.
- Hu, D.-N., Simon, J.D., and Sarna, T. (2008). Role of Ocular Melanin in Ophthalmic Physiology and Pathology†. *Photochem. Photobiol.* *84*, 639–644.
- Huang, F.W., Hodis, E., Xu, M.J., Kryukov, G.V., Chin, L., and Garraway, L.A. (2013). Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* *339*, 957–959.
- Inamdar, G.S., Madhunapantula, S.V., and Robertson, G.P. (2010). Targeting the MAPK pathway in melanoma: why some approaches succeed and other fail. *Biochem. Pharmacol.* *80*, 624–637.
- Isoldi, M.C., Pereira, E.A., Visconti, M.A., and Castrucci, A.M.L. (2004). The role of calcium, calcium-activated K⁺ channels, and tyrosine/kinase in psoralen-evoked responses in human
-

- melanoma cells. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica A1* 37, 559–568.
- Ito, S., and Wakamatsu, K. (2008). Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. *Photochem. Photobiol.* 84, 582–592.
- Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58–62.
- Jandl, T., Revskaya, E., Jiang, Z., Harris, M., Dorokhova, O., Tsukrov, D., Casadevall, A., and Dadachova, E. (2013). Melanoma stem cells in experimental melanoma are killed by radioimmunotherapy. *Nucl. Med. Biol.* 40, 177–181.
- Jazirehi, A.R., Wenn, P.B., and Damavand, M. (2012). Therapeutic implications of targeting the PI3Kinase/AKT/mTOR signaling module in melanoma therapy. *Am. J. Cancer Res.* 2, 178–191.
- Jeggo, P.A., and Löbrich, M. (2006). Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair* 5, 1192–1198.
- Jennings, L., and Murphy, G. m. (2009). Predicting outcome in melanoma: where are we now? *Br. J. Dermatol.* 161, 496–503.
- Jiao, Y., Feng, X., Zhan, Y., Wang, R., Zheng, S., Liu, W., and Zeng, X. (2012). Matrix metalloproteinase-2 promotes $\alpha\beta 3$ integrin-mediated adhesion and migration of human melanoma cells by cleaving fibronectin. *PLoS One* 7, e41591.
- Joyal, J.L., Barrett, J.A., Marquis, J.C., Chen, J., Hillier, S.M., Maresca, K.P., Boyd, M., Gage, K., Nimmagadda, S., Kronauge, J.F., et al. (2010). Preclinical evaluation of an ^{131}I -labeled benzamide for targeted radiotherapy of metastatic melanoma. *Cancer Res.* 70, 4045–4053.
- Kassis, A.I. (2008). Therapeutic radionuclides: biophysical and radiobiologic principles. *Semin. Nucl. Med.* 38, 358–366.
- Kassis, A.I. (2011). Molecular and cellular radiobiological effects of Auger emitting radionuclides. *Radiat. Prot. Dosimetry* 143, 241–247.
- Kassis, A.I., and Adelstein, S.J. (2005). Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 46 *Suppl* 1, 4S – 12S.
- Khan, M.K., Khan, N., Almasan, A., and Macklis, R. (2011). Future of radiation therapy for malignant melanoma in an era of newer, more effective biological agents. *OncoTargets Ther.* 4, 137–148.
- Klein, M., Lotem, M., Peretz, T., Zwas, S.T., Mizrahi, S., Liberman, Y., Chisin, R., Schachter, J., Ron, I.G., Iosilevsky, G., et al. (2013). Safety and efficacy of $^{188}\text{rhenium}$ -labeled antibody to melanin in patients with metastatic melanoma. *J. Skin Cancer* 2013, 828329.
- Klein, W.M., Wu, B.P., Zhao, S., Wu, H., Klein-Szanto, A.J.P., and Tahan, S.R. (2006). Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* 20, 102–107.
- Koefinger, P., Wels, C., Joshi, S., Damm, S., Steinbauer, E., Beham-Schmid, C., Frank, S., Bergler, H., and Schaidt, H. (2011). The cadherin switch in melanoma instigated by HGF is mediated through epithelial-mesenchymal transition regulators. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 382–385.
- Kreiseder, B., Orel, L., Bujnow, C., Buschek, S., Pflueger, M., Schuett, W., Hundsberger, H., de Martin, R., and Wiesner, C. (2013). α -Catulin downregulates E-cadherin and promotes melanoma progression and invasion. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 132, 521–530.
- Kunwar, A., Adhikary, B., Jayakumar, S., Barik, A., Chattopadhyay, S., Raghukumar, S., and Priyadarsini, K.I. (2012). Melanin, a promising radioprotector: mechanisms of actions in a mice model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264, 202–211.
- Kuphal, S., and Bosserhoff, A.K. (2012). E-cadherin cell-cell communication in melanogenesis and during development of malignant melanoma. *Arch. Biochem. Biophys.* 524, 43–47.
- Labarre, P., Papon, J., Moreau, M.-F., Moins, N., Bayle, M., Veyre, A., and Madelmont, J.-C. (2002). Melanin affinity of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide, an effective melanoma imaging agent. *Melanoma Res.* 12, 115–121.
- Lampugnani, M.G. (2012). Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Adhesion and Signaling in Physiology and Pathology. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006528.

-
- Lang, D., Mascarenhas, J.B., and Shea, C.R. (2013). Melanocytes, melanocyte stem cells, and melanoma stem cells. *Clin. Dermatol.* *31*, 166–178.
- Lang, J., Lan, X., Liu, Y., Jin, X., Wu, T., Sun, X., Wen, Q., and An, R. (2015). Targeting cancer stem cells with an ¹³¹I-labeled anti-AC133 monoclonal antibody in human colorectal cancer xenografts. *Nucl. Med. Biol.* *42*, 505–512.
- Larue, L., De Vuyst, F., and Delmas, V. (2013). Modeling melanoblast development. *Cell Mol Life Sci* *70*, 1067–1079.
- Lau, K.S., and Haigis, K.M. (2009). Non-redundancy within the RAS oncogene family: insights into mutational disparities in cancer. *Mol. Cells* *28*, 315–320.
- Lauber, K., Ernst, A., Orth, M., Herrmann, M., and Belka, C. (2012). Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Front. Oncol.* *2*, 116.
- Leblanc, V., and May, P. (2002). Activation et modifications post-traductionnelles de p53 après dommage de l'ADN. *Médecine/sciences* *18*, 577–584.
- Lederle, W., Hartenstein, B., Meides, A., Kunzelmann, H., Werb, Z., Angel, P., and Mueller, M.M. (2010). MMP13 as a stromal mediator in controlling persistent angiogenesis in skin carcinoma. *Carcinogenesis* *31*, 1175–1184.
- Lees-Miller, S.P., and Meek, K. (2003). Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* *85*, 1161–1173.
- De Leeuw, S.M., Smit, N.P., Van Veldhoven, M., Pennings, E.M., Pavel, S., Simons, J.W., and Schothorst, A.A. (2001). Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. *J. Photochem. Photobiol. B* *61*, 106–113.
- Letourneau, C., Dreno, B., Kirova, Y., Grob, J.J., Jouary, T., Dutriaux, C., Thomas, L., Lebbe, C., Mortier, L., Saiag, P., et al. (2015). First-in-human phase I study of the DNA repair inhibitor DT01 in combination with radiotherapy in patients with in transit melanoma. *J. Clin. Oncol.*
- Liu, X., Pham, T.Q., Berghofer, P., Chapman, J., Greguric, I., Mitchell, P., Mattner, F., Loc'h, C., and Katsifis, A. (2008). Synthesis and evaluation of novel radioiodinated nicotinamides for malignant melanoma. *Nucl. Med. Biol.* *35*, 769–781.
- Lord, C.J., and Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* *481*, 287–294.
- Lorenzo, H.K., and Susin, S.A. (2007). Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. *Drug Resist. Updat.* *10*, 235–255.
- Lu, M., Miller, P., and Lu, X. (2014). Restoring the tumour suppressive function of p53 as a parallel strategy in melanoma therapy. *FEBS Lett.* *588*, 2616–2621.
- Lux, F., Mignot, A., Mowat, P., Louis, C., Dufort, S., Bernhard, C., Denat, F., Boschetti, F., Brunet, C., Antoine, R., et al. (2011). Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *50*, 12299–12303.
- Ma, J., Lin, J.Y., Alloo, A., Wilson, B.J., Schatton, T., Zhan, Q., Murphy, G.F., Waaga-Gasser, A.-M., Gasser, M., Hodi, F.S., et al. (2010). Isolation of tumorigenic circulating melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *402*, 711–717.
- Mamalis, A., Garcha, M., and Jagdeo, J. (2014). Targeting the PD-1 pathway: a promising future for the treatment of melanoma. *Arch. Dermatol. Res.*
- Massoumi, R., Kuphal, S., Hellerbrand, C., Haas, B., Wild, P., Spruss, T., Pfeifer, A., Fässler, R., and Bosserhoff, A.K. (2009). Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. *J. Exp. Med.* *206*, 221–232.
- Matthews, T.E., Piletic, I.R., Selim, M.A., Simpson, M.J., and Warren, W.S. (2011). Pump-probe imaging differentiates melanoma from melanocytic nevi. *Sci. Transl. Med.* *3*, 71ra15.
- McArthur, G.A., Puzanov, I., Amaravadi, R., Ribas, A., Chapman, P., Kim, K.B., Sosman, J.A., Lee, R.J., Nolop, K., Flaherty, K.T., et al. (2012). Marked, homogeneous, and early [¹⁸F]fluorodeoxyglucose-positron emission tomography responses to vemurafenib in BRAF-mutant advanced melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 1628–1634.
-

- McLafferty, E., Hendry, C., and Alistair, F. (2012). The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nurs. Stand. R. Coll. Nurs. G. B.* 1987 27, 35–42.
- Mehta, A., and Haber, J.E. (2014). Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016428.
- Mesbahi, A. (2010). A review on gold nanoparticles radiosensitization effect in radiation therapy of cancer. *Rep. Pract. Oncol. Radiother. J. Gt. Cancer Cent. Pozn. Pol. Soc. Radiat. Oncol.* 15, 176–180.
- Miao, Y., and Quinn, T.P. (2008). Peptide-targeted radionuclide therapy for melanoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 67, 213–228.
- Miao, Y., Whitener, D., Feng, W., Owen, N.K., Chen, J., and Quinn, T.P. (2003). Evaluation of the human melanoma targeting properties of radiolabeled alpha-melanocyte stimulating hormone peptide analogues. *Bioconjug. Chem.* 14, 1177–1184.
- Middleton, M.R., Grob, J.J., Aaronson, N., Fierlbeck, G., Tilgen, W., Seiter, S., Gore, M., Aamdal, S., Cebon, J., Coates, A., et al. (2000). Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 18, 158–166.
- Mier, W., Kratochwil, C., Hassel, J.C., Giesel, F.L., Beijer, B., Babich, J.W., Friebe, M., Eisenhut, M., Enk, A., and Haberkorn, U. (2014). Radiopharmaceutical therapy of patients with metastasized melanoma with the melanin-binding benzamide 131I-BA52. *J Nucl Med* 55, 9–14.
- Miladi, I., Duc, G.L., Kryza, D., Berniard, A., Mowat, P., Roux, S., Taleb, J., Bonazza, P., Perriat, P., Lux, F., et al. (2013). Biodistribution of ultra small gadolinium-based nanoparticles as theranostic agent: application to brain tumors. *J. Biomater. Appl.* 28, 385–394.
- Miladi, I., Aloy, M.-T., Armandy, E., Mowat, P., Kryza, D., Magné, N., Tillement, O., Lux, F., Billotey, C., Janier, M., et al. (2014). Combining ultrasmall gadolinium-based nanoparticles with photon irradiation overcomes radioresistance of head and neck squamous cell carcinoma. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*
- Milenic, D.E., Brady, E.D., and Brechbiel, M.W. (2004). Antibody-targeted radiation cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 488–499.
- Miller, A.J., and Mihm, M.C. (2006). Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 355, 51–65.
- Mo, J., Sun, B., Zhao, X., Gu, Q., Dong, X., Liu, Z., Ma, Y., Zhao, N., Liu, Y., Chi, J., et al. (2013). The in-vitro spheroid culture induces a more highly differentiated but tumorigenic population from melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 23, 254–263.
- Moins, N., D'Incan, M., Bonafous, J., Bacin, F., Labarre, P., Moreau, M.-F., Mestas, D., Noirault, E., Chossat, F., Berthommier, E., et al. (2002). 123I-N-(2-diethylaminoethyl)-2-iodobenzamide: a potential imaging agent for cutaneous melanoma staging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 29, 1478–1484.
- Monzani, E., Facchetti, F., Galmozzi, E., Corsini, E., Benetti, A., Cavazzin, C., Gritti, A., Piccinini, A., Porro, D., Santinami, M., et al. (2007). Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur. J. Cancer* 43, 935–946.
- Moro, N., Mauch, C., and Zigrino, P. (2014). Metalloproteinases in melanoma. *Eur. J. Cell Biol.* 93, 23–29.
- Morrison, R., Schleicher, S.M., Sun, Y., Niermann, K.J., Kim, S., Spratt, D.E., Chung, C.H., and Lu, B. (2011). Targeting the Mechanisms of Resistance to Chemotherapy and Radiotherapy with the Cancer Stem Cell Hypothesis. *J. Oncol.* 2011.
- Mowat, P., Mignot, A., Rima, W., Lux, F., Tillement, O., Roulin, C., Dutreix, M., Bechet, D., Huger, S., Humbert, L., et al. (2011). In vitro radiosensitizing effects of ultrasmall gadolinium based particles on tumour cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11, 7833–7839.
- Murphy, G.F., Wilson, B.J., Girouard, S.D., Frank, N.Y., and Frank, M.H. (2014). Stem cells and targeted approaches to melanoma cure. *Mol. Aspects Med.* 39, 33–49.

-
- Muthusamy, V., Hobbs, C., Nogueira, C., Cordon-Cardo, C., McKee, P.H., Chin, L., and Bosenberg, M.W. (2006). Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes. Chromosomes Cancer* 45, 447–454.
- Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K.S., Wang, M., and Zhang, R. (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *J. Biomed. Res.* 27, 254–271.
- Nasti, T.H., and Timares, L. (2015). MC1R, eumelanin and pheomelanin: their role in determining the susceptibility to skin cancer. *Photochem. Photobiol.* 91, 188–200.
- Navarro-Teulon, I., Lozza, C., Pèlegri, A., Vivès, E., and Pouget, J.-P. (2013). General overview of radioimmunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy* 5, 467–487.
- Nelson, A.A., and Tsao, H. (2009). Melanoma and genetics. *Clin. Dermatol.* 27, 46–52.
- Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A., and Hara, E. (2004). The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J. Med. Investig. JMI* 51, 146–153.
- Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001008.
- Orth, M., Lauber, K., Niyazi, M., Friedl, A.A., Li, M., Maihöfer, C., Schüttrumpf, L., Ernst, A., Niemöller, O.M., and Belka, C. (2014). Current concepts in clinical radiation oncology. *Radiat. Environ. Biophys.* 53, 1–29.
- Otto, H., Reche, P.A., Bazan, F., Dittmar, K., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2005). In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribose)transferases (pARTs). *BMC Genomics* 6, 139.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.-T., Zhou, T.-T., Liu, B., and Bao, J.-K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 45, 487–498.
- Oza, A.M., Cibula, D., Benzaquen, A.O., Poole, C., Mathijssen, R.H.J., Sonke, G.S., Colombo, N., Špaček, J., Vuylsteke, P., Hirte, H., et al. (2015). Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 16, 87–97.
- Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 221–233.
- Panzella, L., Leone, L., Greco, G., Vitiello, G., D’Errico, G., Napolitano, A., and d’Ischia, M. (2014). Red human hair pheomelanin is a potent pro-oxidant mediating UV-independent contributory mechanisms of melanomagenesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27, 244–252.
- Park, H.Y., Kosmadaki, M., Yaar, M., and Gilchrist, B.A. (2009). Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1493–1506.
- Pawlik, T.M., and Keyomarsi, K. (2004). Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59, 928–942.
- Perrot, Y., Degoul, F., Auzeloux, P., Bonnet, M., Cachin, F., Chezal, J.M., Donnarieix, D., Labarre, P., Moins, N., Papon, J., et al. (2014). Internal dosimetry through GATE simulations of preclinical radiotherapy using a melanin-targeting ligand. *Phys. Med. Biol.* 59, 2183–2198.
- Pinc, A., Somasundaram, R., Wagner, C., Hörmann, M., Karanikas, G., Jalili, A., Bauer, W., Brunner, P., Grabmeier-Pfistershammer, K., Gschaidner, M., et al. (2012). Targeting CD20 in Melanoma Patients at High Risk of Disease Recurrence. *Mol. Ther.* 20, 1056–1062.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., and Greenwood, M.T. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1813, 238–259.
- Poste, G., Doll, J., Hart, I.R., and Fidler, I.J. (1980). In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. *Cancer Res.* 40, 1636–1644.
- Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146, 873–887.
- Pouget, J.-P., and Mather, S.J. (2014). General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur. J. Nucl. Med.* 28, 541–561.
-

- Pouget, J.-P., Lozza, C., Deshayes, E., Boudousq, V., and Navarro-Teulon, I. (2015). Introduction to radiobiology of targeted radionuclide therapy. *Front. Med.* 2, 12.
- Price, M.A., Colvin Wanshura, L.E., Yang, J., Carlson, J., Xiang, B., Li, G., Ferrone, S., Dudek, A.Z., Turley, E.A., and McCarthy, J.B. (2011). CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 1148–1157.
- Quanz, M., Berthault, N., Roulin, C., Roy, M., Herbette, A., Agrario, C., Alberti, C., Josserand, V., Coll, J.-L., Sastre-Garau, X., et al. (2009a). Small-molecule drugs mimicking DNA damage: a new strategy for sensitizing tumors to radiotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 1308–1316.
- Quanz, M., Chassoux, D., Berthault, N., Agrario, C., Sun, J.-S., and Dutreix, M. (2009b). Hyperactivation of DNA-PK by double-strand break mimicking molecules disorganizes DNA damage response. *PLoS One* 4, e6298.
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M., and Morrison, S.J. (2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456, 593–598.
- Raja, C., Graham, P., Abbas Rizvi, S.M., Song, E., Goldsmith, H., Thompson, J., Bosserhoff, A., Morgenstern, A., Apostolidis, C., Kearsley, J., et al. (2007). Interim analysis of toxicity and response in phase 1 trial of systemic targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol. Ther.* 6, 846–852.
- Raposo, G., and Marks, M.S. (2007). Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 786–797.
- Rappa, G., Fodstad, O., and Lorico, A. (2008). The Stem Cell-Associated Antigen CD133 (Prominin-1) Is a Molecular Therapeutic Target for Metastatic Melanoma. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 3008–3017.
- Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P., and Lopez, B.-S. (2012). [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiothérapie J. Société Fr. Radiothérapie Oncol.* 16, 1–10.
- Redmer, T., Welte, Y., Behrens, D., Fichtner, I., Przybilla, D., Wruck, W., Yaspo, M.-L., Lehrach, H., Schäfer, R., and Regenbrecht, C.R.A. (2014). The nerve growth factor receptor CD271 is crucial to maintain tumorigenicity and stem-like properties of melanoma cells. *PLoS One* 9, e92596.
- Rizvi, S.M.A., Qu, C.F., Song, Y.J., Raja, C., and Allen, B.J. (2005). In vivo studies of pharmacokinetics and efficacy of Bismuth-213 labeled antimelanoma monoclonal antibody 9.2.27. *Cancer Biol. Ther.* 4, 763–768.
- Rondepierre, F., Bouchon, B., Papon, J., Bonnet-Duquennoy, M., Kintossou, R., Moins, N., Maublant, J., Madelmont, J.C., D'Incan, M., and Degoul, F. (2009). Proteomic studies of B16 lines: involvement of annexin A1 in melanoma dissemination. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 61–69.
- Roninson, I.B., Broude, E.V., and Chang, B.-D. (2001). If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist. Updat.* 4, 303–313.
- Roos, W.P., Quiros, S., Krumm, A., Merz, S., Switzeny, O.J., Christmann, M., Loquai, C., and Kaina, B. (2014). B-Raf inhibitor vemurafenib in combination with temozolomide and fotemustine in the killing response of malignant melanoma cells. *Oncotarget* 5, 12607–12620.
- Rooseboom, M., Commandeur, J.N.M., and Vermeulen, N.P.E. (2004). Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol. Rev.* 56, 53–102.
- Rother, J., and Jones, D. (2009). Molecular markers of tumor progression in melanoma. *Curr. Genomics* 10, 231–239.
- Rotte, A., Martinka, M., and Li, G. (2012). MMP2 expression is a prognostic marker for primary melanoma patients. *Cell. Oncol. Dordr.* 35, 207–216.
- Sala, E., Mologni, L., Truffa, S., Gaetano, C., Bollag, G.E., and Gambacorti-Passerini, C. (2008). BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 6, 751–759.

-
- Sambade, M.J., Peters, E.C., Thomas, N.E., Kaufmann, W.K., Kimple, R.J., and Shields, J.M. (2011). Melanoma cells show a heterogeneous range of sensitivity to ionizing radiation and are radiosensitized by inhibition of B-RAF with PLX-4032. *Radiother Oncol* 98, 394–399.
- Samulitis, B.K., Dorr, R.T., and Chow, H.-H.S. (2011). Interaction of dacarbazine and imexon, in vitro and in vivo, in human A375 melanoma cells. *Anticancer Res.* 31, 2781–2785.
- Sarna, M., Zadlo, A., Hermanowicz, P., Madeja, Z., Burda, K., and Sarna, T. (2014). Cell elasticity is an important indicator of the metastatic phenotype of melanoma cells. *Exp. Dermatol.* 23, 813–818.
- Satyamoorthy, K., Chehab, N.H., Waterman, M.J., Lien, M.C., El-Deiry, W.S., Herlyn, M., and Halazonetis, T.D. (2000). Aberrant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 467–474.
- Schadendorf, D., Algarra, S.M., Bastholt, L., Cinat, G., Dreno, B., Eggermont, A.M.M., Espinosa, E., Guo, J., Hauschild, A., Petrella, T., et al. (2009). Immunotherapy of distant metastatic disease. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO 20 Suppl 6*, vi41–vi50.
- 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.
- Schlegel, A., Buhler, C., Devun, F., Agrario, C., Urien, S., Lokiec, F., Sun, J.-S., and Dutreix, M. (2012). Pharmacokinetics and Toxicity in Rats and Monkeys of coDbait: A Therapeutic Double-stranded DNA Oligonucleotide Conjugated to Cholesterol. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 1, e33.
- Schmidt, P., Kopecky, C., Hombach, A., Zigrino, P., Mauch, C., and Abken, H. (2011). Eradication of melanomas by targeted elimination of a minor subset of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 2474–2479.
- Selinheimo, E., NiEidhin, D., Steffensen, C., Nielsen, J., Lomascolo, A., Halaouli, S., Record, E., O’Beirne, D., Buchert, J., and Kruus, K. (2007). Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *J. Biotechnol.* 130, 471–480.
- Semenza, G.L. (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29, 625–634.
- Shakhova, O., and Sommer, L. (2013). Testing the cancer stem cell hypothesis in melanoma: the clinics will tell. *Cancer Lett.* 338, 74–81.
- Simon, J.D., Peles, D., Wakamatsu, K., and Ito, S. (2009). Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22, 563–579.
- Stahl, J.M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J.Q., Bosenberg, M.W., Kester, M., Sandirasegarane, L., and Robertson, G.P. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* 64, 7002–7010.
- Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Kempf, R.C., Long, J., Laidler, P., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Stivala, F., Mazarino, M.C., et al. (2011). Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging* 3, 192–222.
- Sturm, R.A. (2006). A golden age of human pigmentation genetics. *Trends Genet. TIG* 22, 464–468.
- Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K., et al. (2003). Integration of interferon- α/β signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* 424, 516–523.
- Tarhini, A.A., and Agarwala, S.S. (2006). Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. *Dermatol. Ther.* 19, 19–25.
- Testori, A., Rutkowski, P., Marsden, J., Bastholt, L., Chiarion-Sileni, V., Hauschild, A., and Eggermont, A.M.M. (2009). Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO 20 Suppl 6*, vi22–vi29.
-

- Thompson, L.H. (2012). Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: the molecular choreography. *Mutat. Res.* 751, 158–246.
- Thompson, J.F., Scolyer, R.A., and Kefford, R.F. (2005). Cutaneous melanoma. *Lancet* 365, 687–701.
- Tobin, D.J. (2008). Human hair pigmentation--biological aspects. *Int. J. Cosmet. Sci.* 30, 233–257.
- Toshimitsu, H., Yoshimoto, Y., Augustine, C.K., Padussis, J.C., Yoo, J.S., Angelica Selim, M., Pruitt, S.K., Friedman, H.S., Ali-Osman, F., and Tyler, D.S. (2010). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase enhances the effect of chemotherapy in an animal model of regional therapy for the treatment of advanced extremity malignant melanoma. *Ann. Surg. Oncol.* 17, 2247–2254.
- Tsao, H., Olazagasti, J.M., Cordero, K.M., Brewer, J.D., Taylor, S.C., Bordeaux, J.S., Chren, M.-M., Sober, A.J., Tegeler, C., Bhushan, R., et al. (2015). Early detection of melanoma: Reviewing the ABCDEs. *J. Am. Acad. Dermatol.* 72, 717–723.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 700–714.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., et al. (2004). In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science* 303, 844–848.
- Vera, J., Raatz, Y., Wolkenhauer, O., Kotteck, T., Bhattacharya, A., Simon, J.C., and Kunz, M. (2015). Chk1 and Wee1 control genotoxic-stress induced G2–M arrest in melanoma cells. *Cell. Signal.* 27, 951–960.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36, 131–149.
- Viallard, C., Perrot, Y., Boudhraa, Z., Jouberton, E., Miot-Noirault, E., Bonnet, M., Besse, S., Mishellany, F., Cayre, A., Maigne, L., et al. (2015). [¹²³I]ICF01012 melanoma imaging and [¹³¹I]ICF01012 dosimetry allow adapted internal targeted radiotherapy in preclinical melanoma models. *Eur. J. Dermatol. EJD* 25, 29–35.
- Viallard, J.F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J.L., and Reiffers, J. (2001). [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. *Cancer Radiothérapie J. Société Fr. Radiothérapie Oncol.* 5, 109–129.
- Videira, I.F. dos S., Moura, D.F.L., and Magina, S. (2013). Mechanisms regulating melanogenesis. *An. Bras. Dermatol.* 88, 76–83.
- Vinay, D.S., Ryan, E.P., Pawelec, G., Talib, W.H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W.K., Whelan, R.L., Kumara, H.M.C.S., et al. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin. Cancer Biol.* doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.004.
- Wakamatsu, K., and Ito, S. (2002). Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* 15, 174–183.
- Wan, P.T.C., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D., et al. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116, 855–867.
- Wang, A.-X., and Qi, X.-Y. (2013). Targeting RAS/RAF/MEK/ERK signaling in metastatic melanoma. *IUBMB Life* 65, 748–758.
- Wang, C., and Lees-Miller, S.P. (2013). Detection and repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks: new developments in nonhomologous end joining. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 86, 440–449.
- Ward, K.A., Lazovich, D., and Hordinsky, M.K. (2012). Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: a review of the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* 67, 1055–1067.
- Wellbrock, C. (2014). MAPK pathway inhibition in melanoma: resistance three ways. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 727–732.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 875–885.

-
- Wels, C., Joshi, S., Koefinger, P., Bergler, H., and Schaidler, H. (2011). Transcriptional activation of ZEB1 by Slug leads to cooperative regulation of the epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* *131*, 1877–1885.
- Van der Weyden, L., Patton, E.E., Wood, G.A., Foote, A., Brenn, T., Arends, M.J., and Adams, D.J. (2015). Cross-species models of human melanoma. *J. Pathol.*
- Yabluchanskiy, A., Ma, Y., Iyer, R.P., Hall, M.E., and Lindsey, M.L. (2013). Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. *Physiology* *28*, 391–403.
- Yancovitz, M., Litterman, A., Yoon, J., Ng, E., Shapiro, R.L., Berman, R.S., Pavlick, A.C., Darvishian, F., Christos, P., Mazumdar, M., et al. (2012). Intra- and Inter-Tumor Heterogeneity of BRAFV600EMutations in Primary and Metastatic Melanoma. *PLoS ONE* *7*, e29336.
- Yap, T.A., Sandhu, S.K., Carden, C.P., and de Bono, J.S. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors: Exploiting a synthetic lethal strategy in the clinic. *CA. Cancer J. Clin.* *61*, 31–49.
- Zamarron, B.F., and Chen, W. (2011). Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *Int. J. Biol. Sci.* *7*, 651–658.
- Zigrino, P., Kuhn, I., Bäuerle, T., Zamek, J., Fox, J.W., Neumann, S., Licht, A., Schorpp-Kistner, M., Angel, P., and Mauch, C. (2009). Stromal expression of MMP-13 is required for melanoma invasion and metastasis. *J. Invest. Dermatol.* *129*, 2686–2693.
- Zimmer, L., Vaubel, J., Livingstone, E., and Schadendorf, D. (2012). Side effects of systemic oncological therapies in dermatology. *J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG* *10*, 475–486.
- Zygianni, A., Kyrgias, G., Kouvaris, J., Mystakidou, K., Gogas, H., and Kouloulis, V. (2011). Melanoma: the radiotherapeutic point of view; review of the current literature. *Rev. Recent Clin. Trials* *6*, 127–133.