

ANNEE 2012

N° 013

THESE
pour le
DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par
Delphine Séhédic

Présentée et soutenue publiquement le 07 mars 2012

Importance de la classification moléculaire dans la prise en charge de patients atteints de mélanome métastatique

Président : Pr. Stéphane BEZIEAU, Chef du service de génétique médicale, CHU de Nantes.

Membres du jury: M. François LANG, Professeur de Pharmacologie

Mme Laurence COIFFARD, Professeur de Cosmétologie

Table des matières

Remerciements	Erreur ! Signet non défini.
Table des matières	2
Liste des Figures	5
Liste des Tableaux	5
Liste des abréviations	6
Préambule	8
Partie 1 : Le tissu cutané sain et le mélanome	10
1. La structure de la peau ¹	10
1.1. L'épiderme ¹	10
1.1.1. Les cellules de l'épiderme	11
1.1.2. Les couches de l'épiderme	12
1.2. Le derme ¹	13
1.3. La couleur de la peau ¹	13
2. Le mélanome	13
2.1. Genèse du cancer	14
2.1.1. Notion de gène suppresseur de tumeur et le proto-oncogène	14
2.1.2. Propriétés de la cellule cancéreuse et développement d'une tumeur	15
2.1.3. Les métastases	17
2.2. Etiologie du mélanome	18
2.3. Pronostic	19
2.4. Classification du mélanome	20
2.5. Traitement du mélanome	22
Partie 2 : Principales voies de signalisation impliquées dans le développement du mélanome métastatique	24
1. La voie des <i>mitogen-activated protein kinases</i> (MAPK) et le mélanome : favorise la prolifération	24
1.1. RAS	25
1.2. BRAF	25
1.3. GNAQ et GNA11	26
2. La voie CDKN2a/CDK4 et le mélanome : limite la croissance cellulaire et favorise la sénescence	26
2.1. La protéine Rb (Retinoblastoma)	27
2.2. La protéine p16INK4a et le locus CDKN2a	28
2.3. Le complexe CDK4/Cycline D1	28
3. La voie Bcl-2/p53 et le mélanome : confère une résistance à l'apoptose et à la chimiothérapie	29
3.1. Voie de p53	30
3.2. Les facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2	31
3.3. Les facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2	31

3.4. L'APAF-1	32
4. La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) et le mélanome : favorise la progression du mélanome	32
4.1. PI3K.....	33
4.2. PTEN	33
4.3. AKT	34
5. Les voies impliquées dans le développement des mélanocytes	34
5.1. C-KIT	34
5.2. Le microphthalmia-associated transcription factor (MITF)	35
1. Développement de molécules dirigées contre les éléments de la voie des MAPK	36
1.1. Les stratégies thérapeutiques dirigées contre NRAS	36
1.1.1. Les inhibiteurs de la farnésyl transférase (FTI).....	36
1.2. Les stratégies thérapeutiques dirigées contre BRAF	37
1.2.1. Les inhibiteurs multikinases	37
1.2.1.1. sorafénib seul	37
1.2.1.2. le sorafenib en association	38
1.2.1.2.1. Sorafenib et inhibiteur de la farnésyl transférase (FTI)	38
1.2.1.2.2. Le sorafenib et les inhibiteurs du Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR)	39
1.2.1.2.3. Sorafenib et dacarbazine	39
1.2.1.2.4. Le sorafenib et l'association carboplatine/paclitaxel	40
1.2.1.2.5. Le sorafenib et l'interféron α 2b pégylé	41
1.2.1.2.6. Limites du sorafenib.....	41
1.2.2. Les inhibiteurs spécifiques de BRAF.....	42
1.2.2.1. Le vemurafenib	42
1.2.2.2. La résistance du vemurafenib	43
1.2.2.2.1. La réactivation de la signalisation RAF-MEK.....	44
1.2.2.2.2. Altérations dans les étapes du cycle cellulaire dépendantes de ERK1/2	48
1.2.2.2.3. Activation d'une voie de signalisation alternative	49
1.2.2.2.4. Régulation de la chromatine.....	50
1.3. Les stratégies thérapeutiques dirigées contre NRAS et BRAF	50
1.3.1. Les inhibiteurs de l' Heat Shock Protein 90 (HSP90).....	50
1.4. Les inhibiteurs de MEK.....	51
1.4.1. Le selumetinib (AZD6244)	51
1.4.2. Vers une utilisation optimale des inhibiteurs de MEK ?.....	52
1.4.2.1. Les inhibiteurs de MEK et les mélanomes BRAF ^{V600E}	52
1.4.2.2. Les inhibiteurs de MEK et les mélanomes mutés sur GNAQ et GNA11 ..	53
2. Développement de molécules modulant le cycle cellulaire	53
2.1. Les inhibiteurs de cycline dépendent kinases (CDK).....	54
2.2. La bryostatine	55
3. Développement de molécules dirigées contre des éléments de la voie des PI3K/AKT/mTOR.....	56
3.1. La perifosine	56
3.2. Les inhibiteurs de mTOR	57
3.2.1. Le temsirolimus (CCI-779).....	57
3.2.2. L'everolimus (RAD-001)	58
4. Développement de molécule dirigée contre le récepteur c-KIT : l'imatinib.....	59
Partie 4 : Exemple d'une classification moléculaire dans de mélanome	62
1. Le sous-type 1	63

1.1.	Le sous-type 1.1	63
1.2.	Les sous-types 1.2 et 1.3	64
1.3.	Le sous-type 1.4	64
2.	Le sous-type 2	64
3.	Le sous-type 3	65
4.	Le sous-type 4	65
5.	Le sous-type 5	66
6.	Le sous-type 6	66
7.	Le sous-type 7	67
8.	Le sous-type 8	67
Conclusion.....		69
Bibliographie		71

Liste des Figures

Figure 1 : Structure de la peau	10
Figure 2 : Principales structures de l'épiderme	12
Figure 3 : Evénements biologiques et modifications moléculaire dans le mélanome ¹	16
Figure 4 : Concept de l'immuno-édition du cancer qui se divise en trois phases : une phase d'élimination, une phase d'équilibre puis une phase d'échappement ²	17
Figure 5 : Deux modèles de développement du cancer et de progression ³	18
Figure 6 : Voie de signalisation des mitogen-associated protein kinase (MAPK) ¹⁹	24
Figure 7 : Régulation du cycle cellulaire par des complexes CDK/cycline ¹⁹	27
Figure 8 : Voie de PI3K/AKT/mTOR ¹⁹	33
Figure 9 : Homme de 38 ans atteint de mélanome avec dépôts métastatiques sous-cutanés. (A) Avant l'initiation du traitement au vémurafénib, (B) après 15 semaines de traitement et (C), après rechute, après 23 semaines de traitement ⁹⁷	44
Figure 10 : Modèles d'activation et d'inhibition de RAF ¹⁰⁴	47
Figure 11 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de RAF dans les cellules BRAF ^{WT} et BRAF ^{V600E} ⁹³	48

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification TNM pour le mélanome cutané ¹⁴	21
Tableau 2 : Classification du mélanome cutané ¹⁴	21
Tableau 3 : Marges d'excision recommandées pour le mélanome ¹³	22
Tableau 4 : Principaux sous-types moléculaires dans le mélanome (citation)	62
Tableau 5 : Sous-types secondaires dans le mélanome (citation)	63

Liste des abréviations

6-4PP	6 pyrimidine-4-pyrimidone
AcM	Anticorps monoclonal
ADN	Acide désoxyribo-nucléique
AJCC	<i>American Joint Commitee on cancer</i>
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
b.i.d	« Bis in die » ou deux fois par jour
CDK4	Cycline dépendent kinase 4
CPD	Dimère de pyrimidine cyclobutane
CR	<i>Complete response</i> ou réponse complète
CSD	<i>Chronic sun-damaged</i>
DCR	<i>Disease control rate</i> ou taux de contrôle de la maladie
DTIC	Dacarbazine
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
Flt-3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
GDP	Guanosine diphosphate
GNAQ/GNA11	Guanine nucleotide-binding protein Q polypeptide
GTP	Guanosine tri-phosphate
GST	Gène suppresseur de tumeur
IC50	Concentration inhibitrice 50
IFN α	Interféron alpha
IV	Intra-veineuse
Jr	Jour
LDH	Lactate déshydrogénase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MDM	<i>Molecular disease model</i> ou modèle moléculaire de maladie
MEC	Matrice extra-cellulaire
MEK	MAPK-/ERK kinase
MITF	<i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor κB</i>

NK	<i>Natural Killer</i>
ORR	<i>Overall response rate</i> ou taux de réponse global
OS	<i>Overall survival</i> ou survie globale
P16INK4a	<i>16kb inhibitor of cyclin-dependent kinase inhibitor 2a</i>
PD	<i>Progression disease</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growthfactor receptor</i>
PFS	<i>Progression free survival</i> ou survie sans progression
PI3K	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKC	Protéine kinase C
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PR	<i>Partial response</i> ou réponse partielle
RCPG	Récepteur couplé à une protéine G
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumors</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ou dérivés actifs de l'oxygène (radicaux libres)
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
Sem.	Semaine
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SD	<i>Stable disease</i> ou maladie stable
siRNA	ARN interférent
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TMZ	Temozolomide
TTP	<i>Time to progression</i> ou temps jusqu'à progression
UV	Ultra-violet
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VO	Voie orale
WT	<i>Wild type</i> ou type sauvage

Préambule

Le mélanome est un cancer qui se développe à partir de cellules de la peau, les mélanocytes. Ces cellules sont impliquées dans la production de mélanine qui protège le matériel génétique des cellules de la peau contre les rayons ultra-violet du soleil. Bien que toutes les cellules de l'organisme possèdent des systèmes de réparation qui leur permettent de garantir l'intégrité du génome et le bon fonctionnement de la cellule, il peut arriver que des facteurs chimiques, viraux ou physiques conduisent à des modifications génétiques (modification de l'ADN) ou épigénétiques (modifications dans l'expression d'un gène et de la protéine correspondante). Dans le cas du mélanome, les facteurs étiologiques les plus connus sont les rayons ultra-violet. Une exposition prolongée au soleil peut entraîner des dommages à l'ADN qui peuvent persister dans la cellule s'ils ne sont pas efficacement réparés. Ces modifications génétiques conduisent ensuite à une prolifération anarchique des mélanocytes et à la formation d'une tumeur primaire appelée mélanome.

Le mélanome peut se développer à n'importe quel âge bien qu'il existe un pic entre quarante et cinquante ans. En 2008, l'incidence était en France de 10,4 mélanomes pour 100 000 femmes et 9,9 mélanomes pour 100 000 hommes (Observatoire européen du cancer).

Le mélanome peut toucher n'importe quelle région de la peau, du cuir chevelu, des muqueuses et des ongles. Il s'agit au début d'une tache asymétrique de couleur brune à noire de quelques millimètres. Elle va ensuite évoluer rapidement pour changer de formes, de couleurs, de contours et de taille. D'autres signes peuvent être associés à ces modifications comme le développement d'un nodule, une extension du pigment qui « bave » en bordure, des saignements ou des démangeaisons. On distingue différents types de mélanomes :

- le mélanome superficiel extensif est le plus fréquent (60 à 70%),
- les mélanomes nodulaires (10% à 15% des cas), il forme une excroissance de chair de couleur brune ou noire et d'évolution rapide,
- le mélanome acral lentigineux au niveau palmaire, plantaire et des ongles (2 à 10%),
- le mélanome de Dubreuilh au niveau des zones photo-exposées (5%). C'est la forme la plus rare de mélanome. Il forme des taches brunes, larges et irrégulières au niveau du visage,
- les mélanomes des muqueuses buccales et anogénitales,
- les mélanomes oculaires et choroïdiens,
- les mélanomes achromiques.

Pour reconnaître un mélanome, on utilise souvent l'abécédaire : A : lésions asymétriques, B : Bords irréguliers, C : Couleur inhomogène avec des nuances du brun au noir, D : Diamètre, souvent supérieur à 6 mm et E : Evolutivité soit un changement de taille, de forme, de couleur ou de relief.

Le mélanome est l'un des cancers dont la survie à cinq ans est la plus élevée avec 80% de survie si la prise en charge est adaptée et s'il n'est pas compliqué de métastases. Le traitement actuel du mélanome consiste en une ablation chirurgicale de la tumeur avec une marge d'exérèse variable en fonction de l'étendue de la tumeur.

En cas de mélanome métastatique, le traitement consiste là aussi en une ablation de la tumeur ainsi que des métastases si elles sont accessibles. Si les métastases sont trop nombreuses ou inaccessibles chirurgicalement, les patients peuvent être inclus dans des essais cliniques ou être traités par des traitements de chimiothérapie classique : dacarbazine, fotemustine ou encore cisplatine. Cependant, le pronostic vital reste extrêmement faible et la médiane de survie inférieure à un an.

Ainsi, de nombreux projets de recherche essaient de développer de nouveaux traitements du mélanome métastatique. Certaines équipes s'appuient sur les propriétés immunogènes des cellules de mélanome. Elles s'intéressent aux antigènes spécifiques exprimés à leur surface pour développer des protocoles d'immunisation active ou passive. D'autres étudient les altérations génétiques et les modifications des voies de signalisation au sein des cellules de mélanome pour identifier des cibles thérapeutiques pertinentes et spécifiques du mélanome.

L'objectif de cette thèse est de synthétiser les connaissances actuelles sur les modifications génétiques et moléculaires survenant dans les cellules de mélanome et de présenter les nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur ces anomalies dans le but de développer des protocoles de thérapie ciblée.

Partie 1 : Le tissu cutané sain et le mélanome

1. La structure de la peau¹

La peau a une épaisseur qui varie de 1,5 à 4 mm voire plus pour certaines parties du corps et est composée de deux parties : l'épiderme et le derme (Figure 1). L'épiderme est composé de cellules épithéliales et constitue la principale structure protectrice du corps. Le derme se situe en-dessous de l'épiderme et est constitué de tissu conjonctif dense. Seul le derme est vascularisé.

L'hypoderme se situe juste en dessous de la peau. Il est composé principalement de tissu adipeux et interagit avec la peau pour lui permettre d'assurer ses fonctions de protection. Par sa composition lipidique, il isole le corps et évite les pertes de chaleur. Il confère aussi à la peau sa fluidité et lui permet d'absorber les coups.

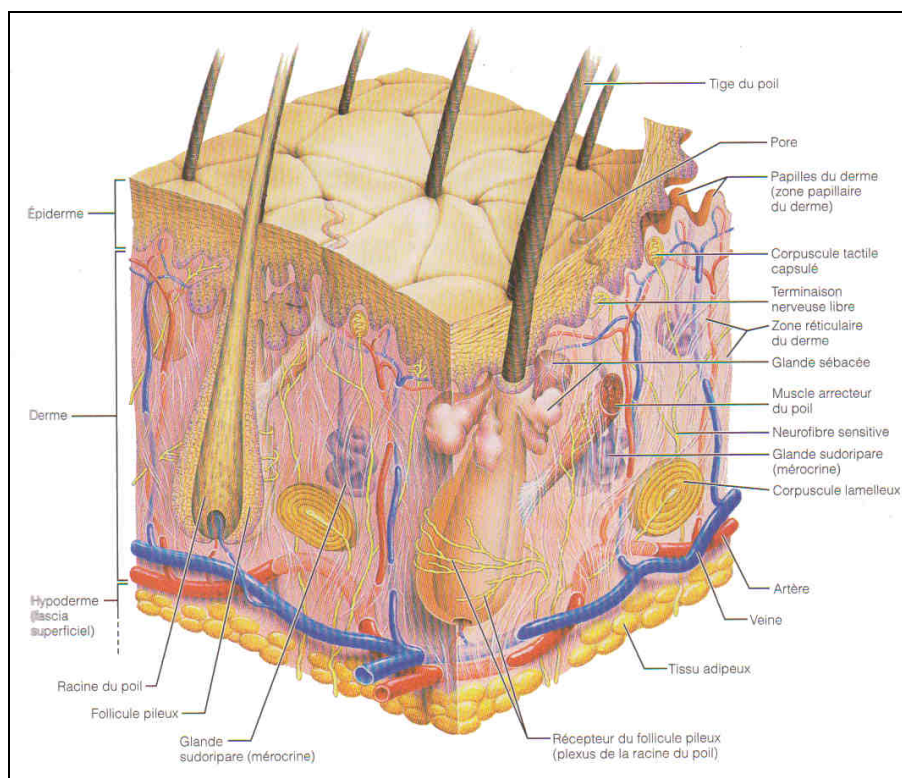


Figure 1 : Structure de la peau¹

1.1. L'épiderme¹

L'épiderme est formé d'un épithélium stratifié squameux kératinisé qui se compose de quatre types de cellules et de quatre ou cinq couches distinctes selon le type de peau.

1.1.1. Les cellules de l'épiderme

Les kératinocytes (Figure 2) sont les cellules les plus nombreuses dans l'épiderme. Leur rôle consiste à produire de la kératine, une protéine fibreuse qui protège les cellules de l'épiderme. Les kératinocytes sont étroitement liés les uns aux autres par des desmosomes. Ils proviennent de cellules qui se divisent de manière quasi continue et qui se situent au niveau de la couche la plus profonde de l'épiderme. A mesure que les kératinocytes sont poussés vers la surface de la peau par les nouvelles cellules, ils se mettent à produire de la kératine molle qui va devenir leur constituant majeur. Les kératinocytes meurent au cours de leur trajet jusqu'à la surface de la peau pour ne laisser plus qu'une membrane plasmique remplie de kératine qui tombent par desquamation.

La peau se renouvelle en moyenne tous les vingt-cinq à quarante-cinq jours (vingt-cinq à trente jours pour la plante des pieds et les paumes des mains).

Les mélanocytes (Figure 2) sont beaucoup moins nombreux que les kératinocytes. Ce sont des cellules épithéliales étoilées qui synthétisent un pigment, la mélanine. On les trouve dans les couches profondes de l'épiderme. La mélanine nouvellement synthétisée s'accumule dans des granules appelés mélanosomes qui sont acheminés par des protéines motrices le long des filaments d'actine pour rejoindre les extrémités des mélanocytes où ils sont absorbés par les kératinocytes avoisinants. Les mélanosomes s'accumulent près du noyau des kératinocytes, vers le milieu extérieur, et forment ainsi un bouclier pigmentaire qui protège le noyau contre les rayons ultraviolets (UVs).

L'épiderme renferme aussi des cellules de l'immunité, les macrophagocytes intraépidermiques ou cellules de Langerhans. Elles contribuent à l'activation d'autres cellules de l'immunité et leur nombre augmente lors d'une infection chronique de la peau.

On peut aussi retrouver des cellules de Merkel ou épithélioïdocytes du tact, à la jonction de l'épiderme et du derme. Elles sont, d'une part, liées à la terminaison nerveuse d'une neurofibre sensitive (disque de Merkel) et d'autre part, associées aux kératinocytes voisins par des microvillosités. Avec les disques de Merkel, elles jouent le rôle de récepteur sensoriel du toucher.

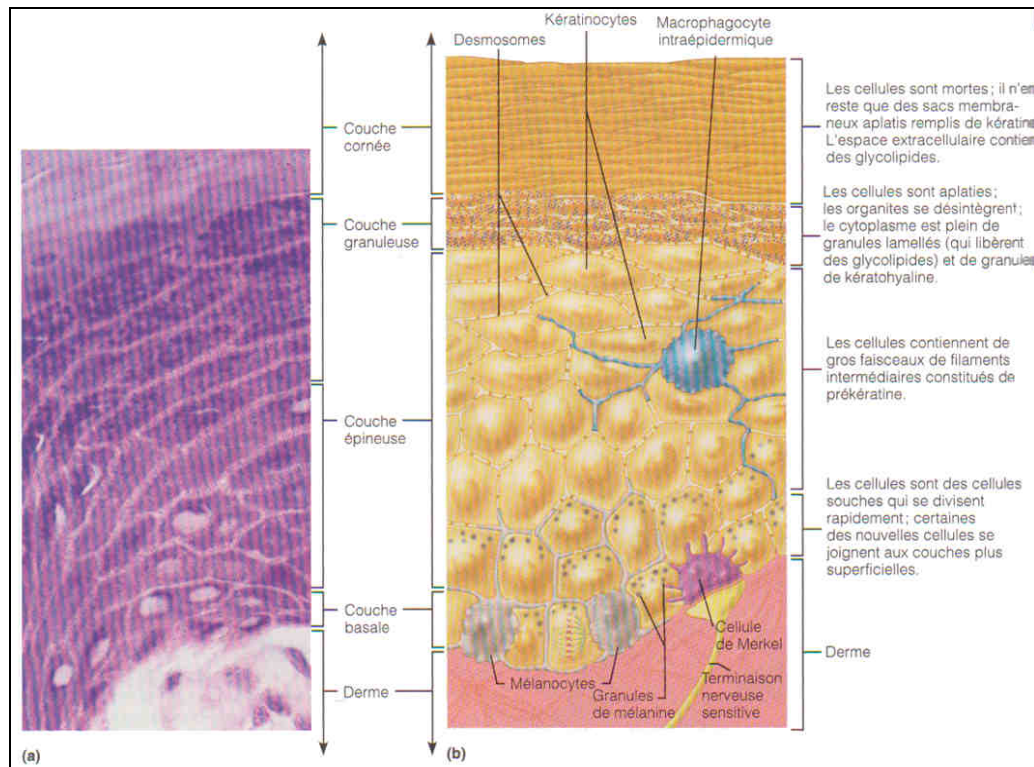


Figure 2 : Principales structures de l'épiderme¹

1.1.2. Les couches de l'épiderme

La couche basale (*stratum basale*) ou couche germinative, est fixée au derme sous-jacent. Elle est généralement constituée d'une seule couche de kératinocytes et de 10% à 25% de mélanocytes.

La couche épineuse (*stratum spinosum*) contient plusieurs couches de cellules de kératinocytes aux formes irrégulières. Cette couche renferme aussi de nombreux macrophagocytes intraépidermiques.

La couche granuleuse (*stratum granulosum*) est constituée de trois à cinq couches de cellules dans lesquelles les kératinocytes changent d'aspect : ils s'aplatissent, leur noyau et organites se désintègrent et ils accumulent des granules de kératohyaline et des granules lamellés. Ces premiers favorisent la formation de kératine dans la couche supérieure et les seconds contribuent à limiter les pertes d'eau dans les couches épidermiques. Ces changements rendent les kératinocytes plus résistants et participent au durcissement de la peau.

La couche claire (*stratum lucidum*) est une fine bande formée de quelques couches de kératinocytes clairs, aplatis, morts et aux contours mal définis.

La couche cornée (*stratum corneum*) est la couche la plus superficielle de la peau. Elle est composée de vingt à trente strates de cellules et peut constituer les trois quarts de l'épaisseur de l'épiderme. La kératine et les membranes plasmiques épaissies protègent la peau du milieu extérieur. Les glycolipides contenus dans les cellules de la couche cornée l'imperméabilisent. Elle constitue ainsi

une « enveloppe » qui protège les cellules sous-jacentes et l'organisme des substances chimiques, des bactéries et des déperditions d'eau.

1.2. Le derme¹

Il est constitué d'un tissu conjonctif à la fois résistant et flexible. Il est composé de fibroblastes, de fibrocytes, de macrophagocytes et parfois de mastocytes et de globules blancs. Sa matrice gélatineuse est imprégnée de collagène, d'élastine et de réticuline.

Le derme est riche en neurofibres, en vaisseaux sanguins et en vaisseaux lymphatiques. La majorité des follicules pileux et des glandes sébacées et sudoripares se situent dans le derme.

Il est formé de deux zones : la zone papillaire et la zone réticulaire. La zone papillaire est une fine couche de tissu conjonctif composée de fibres de collagène et d'élastine entrelacées qui permettent le passage de vaisseaux sanguins et de neurofibres. La zone réticulaire, plus profonde, constitue environ 80% de l'épaisseur du derme. Elle est composée de tissu conjonctif dense irrégulier. Sa matrice extracellulaire possède de nombreuses fibres de collagène enchevêtrées et pour la plupart parallèles à la peau. Ces fibres de collagène confèrent à la peau une résistance et une élasticité. De plus, elles fixent l'eau et contribuent ainsi à l'hydratation de la peau. Les fibres d'élastines permettent à la peau de retrouver sa forme d'origine après un étirement.

1.3. La couleur de la peau¹

Trois pigments sont responsables de la couleur de la peau : la mélanine, le carotène et l'hémoglobine.

La mélanine a une teinte variant du jaune au noir en passant par le roux. Elle est synthétisée dans la peau grâce à une enzyme, la tyrosinase. L'exposition au soleil stimule les mélanocytes et la production de mélanine. Ainsi, l'ADN des cellules de la peau est protégé des rayons ultra-violet par la mélanine qui absorbe la lumière.

Le carotène a une couleur qui varie du jaune à l'orange. Il s'accumule dans la couche cornée et le tissu adipeux de l'hypoderme. Il apparaît donc surtout au niveau des paumes des mains et des plantes de pieds où la couche cornée est plus épaisse.

Le teint rosé des peaux claires est, quant à lui, dû à la couleur rouge de l'hémoglobine.

2. Le mélanome

2.1. Genèse du cancer

2.1.1. Notion de gène suppresseur de tumeur et le proto-oncogène

Le développement d'un cancer peut se faire dans n'importe quelle cellule de l'organisme. Il a pour origine des anomalies génétiques ou épigénétiques sur certains gènes en particulier. Deux catégories de gènes peuvent être impliqués dans le développement de cancer : les gènes suppresseurs de tumeur et les proto-oncogènes.

Les gènes suppresseurs de tumeur (GST) sont des gènes impliqués dans la surveillance de la cellule et qui limitent la prolifération cellulaire en cas d'anomalies. Toute inactivation d'un GST constitue donc une perte de fonction et favorise la prolifération cellulaire et le développement d'une tumeur. L'inactivation d'un GST est récessive et nécessite deux événements sur chacun des deux allèles qui peuvent être une mutation ponctuelle, une délétion, une méthylation du GST ou tout autre mécanisme épigénétique.

L'un des GST les plus connus est la protéine p53. Elle est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'induction de l'apoptose. En réponse à un stress cellulaire, p53 subit des modifications post-traductionnelles (acétylation, phosphorylation) qui ont pour conséquence l'accumulation de cette protéine sous forme active. Elle peut alors :

- activer la protéine p21 qui inhibe le complexe CDK/Cycline et bloque la cellule en phase G1. Ce blocage laisse le temps à la cellule de réparer l'ADN,
- se fixer au niveau des sites promoteurs de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'apoptose telles que Bax, PUMA et NOXA.

Ainsi, en fonction des altérations présentes au niveau de l'ADN, l'induction de p53 va permettre un arrêt du cycle cellulaire et donner à l'ADN le temps d'être réparé avant l'entrée en phase S. Ce mécanisme assure la stabilité génomique.

En cas de dommages trop importants, p53 va induire l'apoptose ce qui a pour conséquence d'éliminer la cellule contenant des chromosomes altérés et d'empêcher la multiplication de cellules portant des altérations génétiques.

Les cellules qui survivent avec un ADN endommagé et dépourvues de p53 fonctionnelle peuvent se multiplier de façon anarchique et aboutir à la formation de tumeur.

Ceci explique que la protéine p53 soit déficiente dans un certains nombres de cancer. Ces déficits sont liés à des mutations de p53, à une surexpression de son inhibiteur MDM2 ou à la production de protéines virales qui ciblent p53.

Les proto-oncogènes sont des gènes rencontrés dans des cellules normales et qui par activation, vont générer des oncogènes. Cette activation peut se faire de différentes manières :

- une délétion ou une mutation ponctuelle dans la séquence codante qui conduit à l'expression d'une protéine hyperactivée en quantité normale,
- une amplification génique qui conduit à l'expression d'une protéine normale en grande quantité,
- un réarrangement génique qui conduit, par translocation, soit à placer le gène près d'un *enhancer* et entraîne la production en grande quantité de la protéine correspondante. Soit à former un gène de fusion qui génère une protéine de fusion produite en grande quantité ou avec des propriétés nouvelles.

L'activation d'un proto-oncogène en oncogène est un événement dominant car il ne nécessite la modification que d'un seul des deux allèles et représente un gain de fonction.

2.1.2. Propriétés de la cellule cancéreuse et développement d'une tumeur

La formation d'une tumeur n'est pas liée à un seul événement isolé mais est la conséquence de l'inactivation de plusieurs GST et/ou de l'activation de plusieurs oncogènes. Pour qu'une cellule devienne tumorale, il faut qu'elle ait acquis les propriétés suivantes:

- une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance,
- un échappement à l'apoptose,
- une instabilité génétique,
- une capacité à induire l'angiogénèse,
- une capacité à se répliquer de manière illimitée,
- une capacité d'invasion des tissus environnants et à métastaser,
- une résistance aux signaux anti-croissance.

La progression tumorale se fait en plusieurs étapes : d'abord la phase d'invasion tissulaire puis la formation de métastases. Dans le mélanome, le point de départ est, le plus souvent, un naevus bénin (ou grain de beauté) mais il peut aussi s'agir d'une tout autre localisation. Une cellule, auparavant normale, va se mettre à proliférer de manière aberrante. Sur un plan clinique, cela se traduit par une lésion asymétrique à bords irréguliers, pouvant comporter plusieurs couleurs et augmenter de diamètre. Puis les cellules se disséminent au travers de l'épiderme, c'est la phase de croissance radiale. Cette phase est suivie d'une phase de croissance verticale pendant laquelle les cellules pénètrent plus profondément dans les tissus et infiltrent le derme. Cela se traduit par la formation d'un nodule. L'étape finale a lieu lorsque les cellules ont franchi la membrane basale et disséminent dans d'autres tissus de la peau ou dans d'autres organes où elles peuvent former des métastases² (Figure 3).

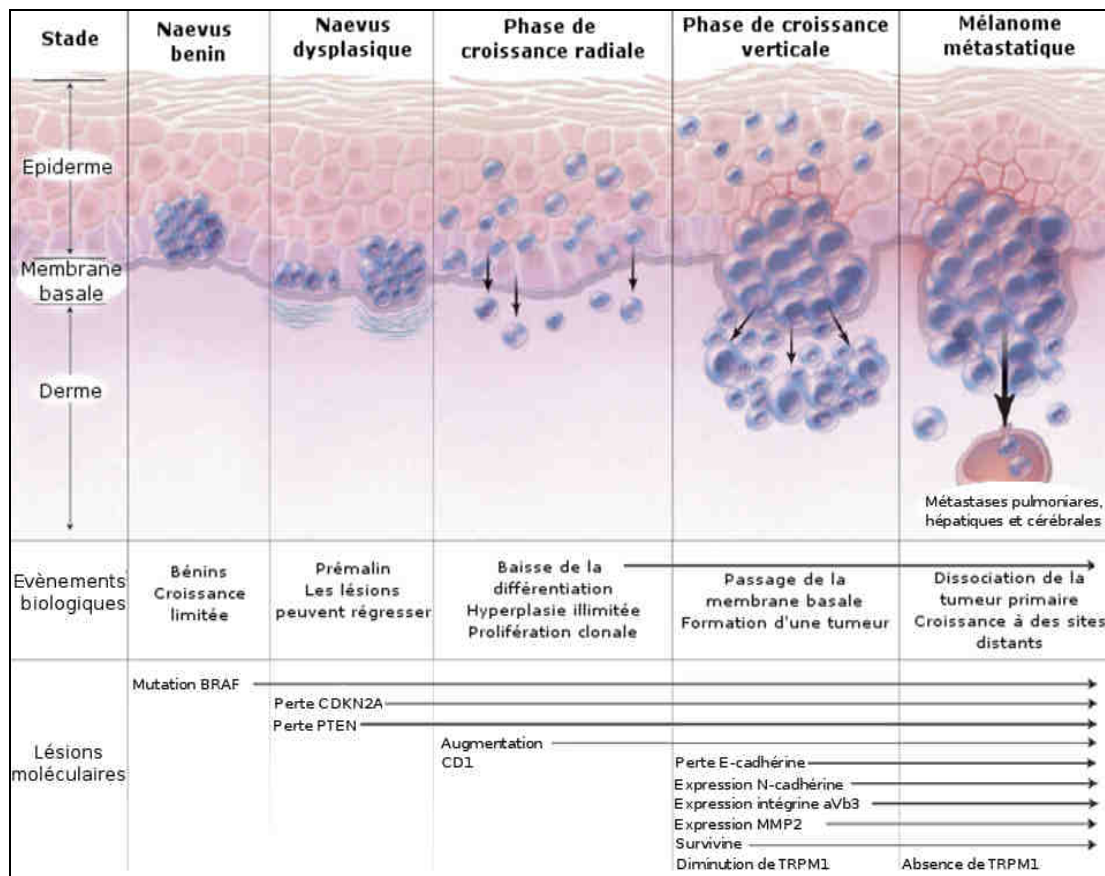


Figure 3 : Evénements biologiques et modifications moléculaire dans le mélanome².

Au cours du développement de la tumeur, il peut arriver qu'elle régresse spontanément. Si ce n'est pas le cas, elle peut entraîner une activation du système immunitaire. Les cellules de l'inflammation et les cellules effectrices du système immunitaire telles que les monocytes/macrophages, les cellules *Natural Killer* (NK) ou les lymphocytes T vont éliminer la tumeur.

Si l'élimination est inefficace, la tumeur va atteindre un état d'équilibre pendant lequel elle ne va ni progresser ni régresser. Elle peut, par exemple, sous-exprimer les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et échapper ainsi aux cellules de l'immunité. Cet état d'équilibre peut durer un certain temps jusqu'à ce que quelques cellules échappent totalement à la surveillance du système immunitaire. La pression de sélection conduit à ne garder que les cellules résistantes ce qui permet la progression du cancer. Il arrive aussi que le micro-environnement tumoral mette la tumeur dans un contexte d'immuno-suppression ce qui favorise, ici aussi, la croissance tumorale³ (Figure 4).

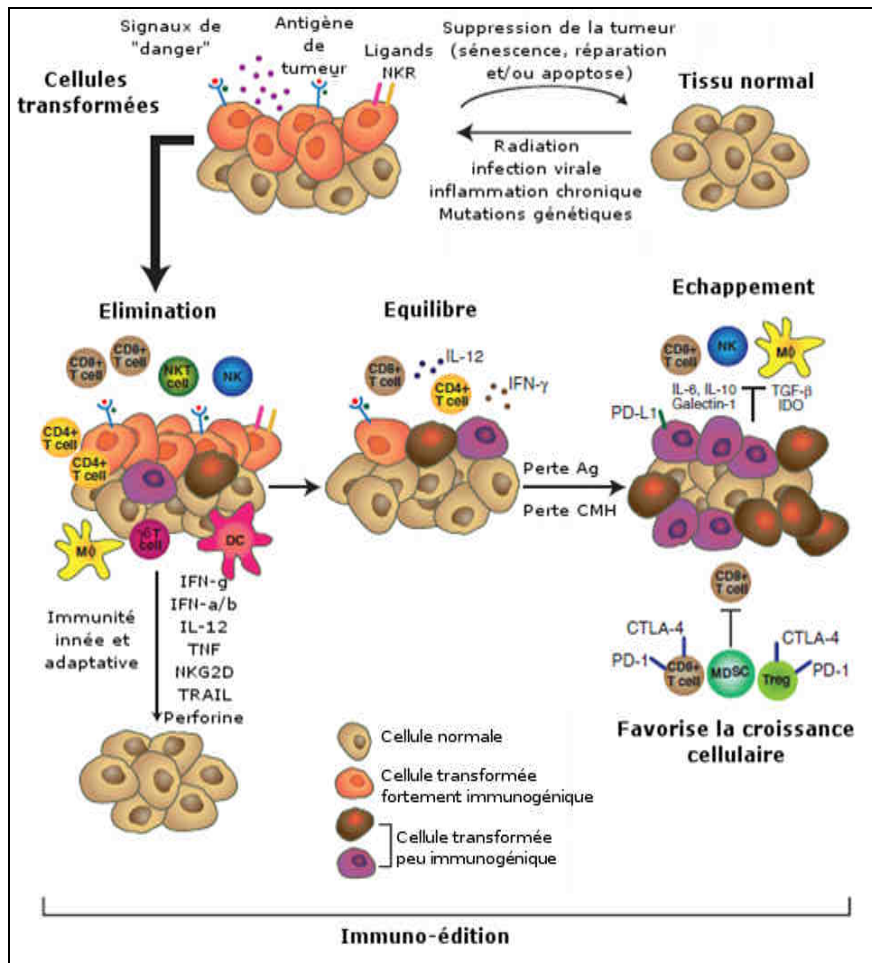


Figure 4 : Concept de l'immuno-édition du cancer qui se divise en trois phases : une phase d'élimination, une phase d'équilibre puis une phase d'échappement³.

2.1.3. Les métastases

Deux modèles sont avancés pour expliquer qu'une tumeur primaire métastase. Le modèle classique suggère que quelques rares cellules cancéreuses activent les facteurs de transcription nécessaires à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), à un stade avancé du cancer. La transition épithélio-mésenchymateuse consiste en un changement de phénotype rapide et réversible de la cellule cancéreuse⁴. Pour cela, la cellule va exprimer certains facteurs comme Slug, Snail, Goosecoid, Twist et ZEB-1 ce qui contribue à une perte du phénotype épithélial incluant l'adhésion cellule-cellule et une polarité baso-apicale. La cellule acquiert alors un phénotype mésenchymateux avec une capacité accrue à migrer et à envahir la matrice extra-cellulaire⁵.

Dans le deuxième modèle, il est décrit que l'expression de facteurs de transcription impliqués dans l'EMT ne se fait pas à un stade tardif du développement de la tumeur mais à n'importe quel stade de la dissémination⁴ (Figure 5).

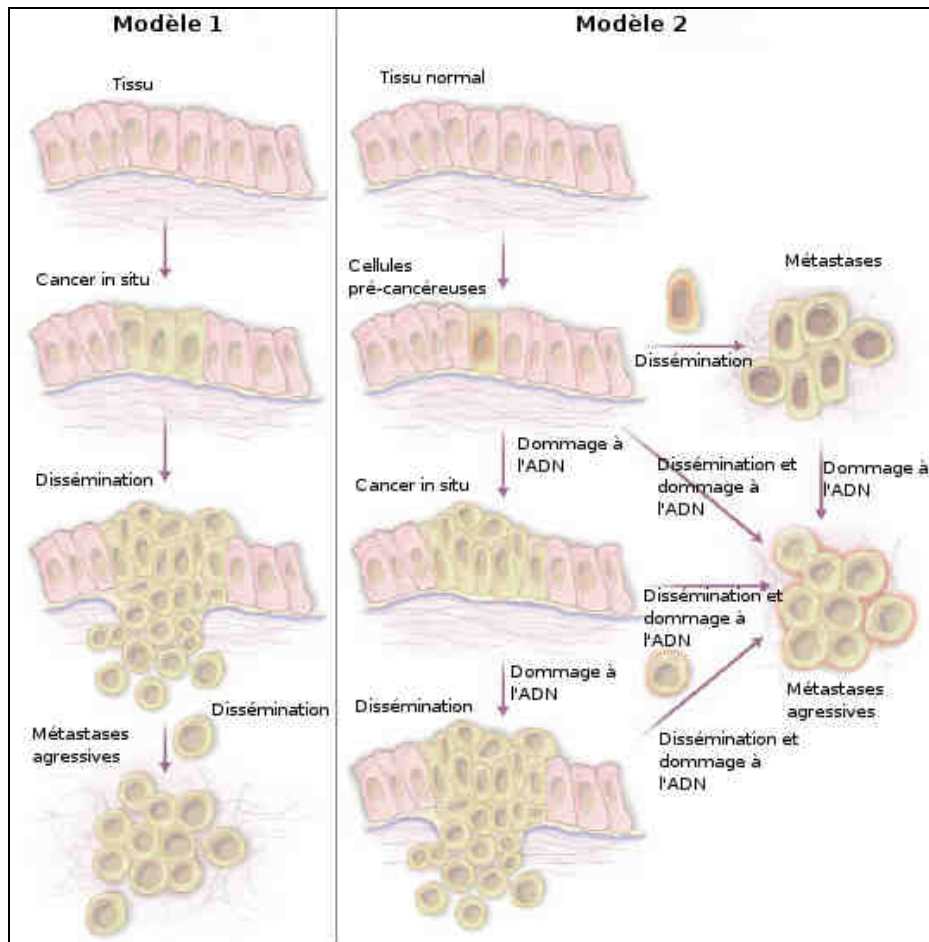


Figure 5 : Deux modèles de développement du cancer et de progression⁴.

On comprend alors qu'une tumeur qui se développe selon ce dernier modèle représente un défi thérapeutique. En effet, un cancer tel que le mélanome, est facilement traitable par chirurgie lorsque la tumeur est peu développée et qu'elle n'a pas métastasé. Ainsi, si la prise en charge thérapeutique se fait à un stade précoce du développement de la maladie, les chances de guérison restent relativement élevées. En revanche, si un cancer se développe selon le deuxième schéma, même une prise en charge précoce ne permettrait pas d'éliminer le cancer si des métastases se sont formées à une étape initiale du développement de la maladie.

Il semble donc intéressant de développer des thérapies qui détruisent à la fois les tumeurs primaires et les métastases.

2.2. Etiologie du mélanome

Les agents étiologiques environnementaux les plus connus pour le mélanome sont les ultraviolets (UVs). Cependant, le mécanisme par lequel la lumière du soleil permet le développement du mélanome et confère aux cellules de mélanome leur capacité à métastaser est mal connu.

On sait qu'une exposition intense et intermittente aux UVs, notamment pendant l'enfance, est un facteur de risque majeur de développement d'un mélanome⁶. De plus, certains facteurs génétiques entrent en jeu comme la mutation du locus CDKN2A codant pour deux gènes suppresseurs de tumeur rencontrée dans les formes familiales de mélanome. De même, les phénotypes à peau claire avec des taches de rousseurs et à cheveux blonds ou roux augmentent significativement les risques de mélanome⁷.

Le spectre UV est divisé en trois parties : UVA (320 – 400 nm), UVB (280 – 320 nm) et les UVC (200 – 280 nm). Les UVC sont considérés comme inoffensifs car absorbés par la couche d'ozone. En revanche, les UVA et les UVB atteignent la surface de la Terre et peuvent créer des dommages au niveau des acides nucléiques et des protéines. Les UVB peuvent générer directement deux types de lésion à l'ADN : des dimères de pyrimidine cyclobutane (CPDs), entre deux résidus thymidine ou cytosine adjacentes, et des photoproduits 6-pyrimidine-4-pyrimidone (6-4PP)⁸. Les CPDs sont les plus fréquents et les plus carcinogènes et sont aussi appelés « signature des UVB ». Les UVA quant à eux, ont une action indirecte en générant des dérivés actifs de l'oxygène (ROS) qui entraînent des dommages à l'ADN⁹. Il semble aussi que les UVs, en générant un stress cellulaire, induisent l'expression de certains gènes et cascades de signalisation impliqués dans la prolifération, l'apoptose, la réparation de l'ADN et la survie cellulaire. Ainsi des signatures des UVB ont pu être retrouvées au niveau du gène suppresseur de tumeur p53, ce qui conduit à l'activation de cette voie et à une réparation de l'ADN, 48 à 72h après l'exposition. Un dysfonctionnement de cette voie pourrait donc constituer un événement précoce dans l'oncogénèse. En revanche, les mutations de CDKN2A, BRAF et NRAS ne portent pas la signature des UVB¹⁰.

Il semble ainsi que les mutations de l'ADN induites par les UVs ne suffisent pas à l'oncogénèse. Il a été rapporté que des modifications épigénétiques précoces augmentent la probabilité de survenu de mutation génétique et de développement d'un cancer¹¹. Dans le mélanome, près d'une cinquantaine de gènes sont inhibés par méthylation de l'ADN¹². Parmi eux, les gènes suppresseurs de tumeur CDKN2A, PTEN, APC et APAF1¹³. On peut donc envisager que les radiations UVs conduisent à des modifications épigénétiques, qu'une partie de ces modifications persistent à long terme et participent à l'oncogénèse.

2.3. Pronostic

Chez les patients atteints de mélanome primaire, sans métastase, la survie à dix ans est de 75-85%. Les facteurs pronostics les plus importants pour le mélanome primaire sans métastases sont :

- l'épaisseur de la tumeur ou indice de Breslow,
- des signes d'ulcération
- l'activité mitotique,

- le degré d'invasion (selon la classification de Clark), il n'est important que pour les tumeurs de faible épaisseur (< 1mm).

Le mélanome peut ensuite métastaser par voie lymphatique ou par voie sanguine. Les deux tiers des métastases se trouvent d'abord au niveau des ganglions lymphatiques qui drainent le site de la tumeur. Les métastases régionales peuvent être des :

- micrométastases,
- des métastases satellites (à plus de 2 cm de la tumeur primaire),
- des métastases en transit ou,
- des macrométastases, détectables cliniquement par palpation des ganglions.

La survie à dix ans est de 30% à 70% chez les patients présentant des micrométastases, de 30-50% chez les patients présentant des métastases satellites ou en transit et enfin de 20-40% chez les patients présentant des macrométastases.

La présence de métastase à distance est un facteur de très mauvais pronostic puisque la médiane de survie chez les patients non traités est de six à neuf mois. Celle-ci peut toutefois varier en fonction de l'organe touché¹⁴.

2.4. Classification du mélanome

La classification du mélanome cutané repose sur des critères anatomo-pathologiques et a fait l'objet d'une révision en 2009 par l'AJCC (*American Joint Committee on Cancer*)¹⁵. Elle tient compte de l'épaisseur de la tumeur (T : *Thickness*), du nombre de ganglion envahis (N : *Number of metastatic Nodes*) et de la présence ou non de métastases (M : *Metastasis*) (Tableau 1). Chaque tumeur se voit ainsi attribuer des scores TNM utilisés ensuite pour classer la tumeur en stade I, II, III ou IV (Tableau 2).

T	Epaisseur (mm)	Ulcération/mitoses
Tis	Non applicable (NA)	NA
T1	<= 1,00	a : sans ulcération et mitoses <1/mm2 b : avec ulcération ou mitoses >= 1/mm2
T2	1,01 – 2,00	a : sans ulcération b : avec ulcération
T3	2,01 – 4,00	a : sans ulcération b : avec ulcération
T4	> 4,00	a : sans ulcération b : avec ulcération
N	Nombre de ganglions envahis	Etat des métastases
N0	0	NA
N1	1	a : micrométastases b : macrométastases
N2	2 – 3	a : micrométastases b : macrométastases c : métastases en transit / ganglion satellite sans métastases
N3	+ 4	Ganglion métastatique, ou métastases en transit / ganglion satellite sans métastases
M	Site	Taux LDH dans le sérum
M0	Pas de métastases à distance	NA
M1a	Métastase de la peau, le tissu sous-cutané ou les ganglions	Normal
M1b	Métastase pulmonaire	Normal
M1c	Métastase dans n'importe quel autre organe	Normal
	Toutes métastases à distance	Elevé

Tableau 1 : Classification TNM pour le mélanome cutané¹⁵

Stade clinique				Stade pathologique			
	T	N	M		T	N	M
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a		M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a		M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a		M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	Tout T	N > N0	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
				IIIB	T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
					T1-4a	N2c	M0
				IIIC	T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
					Tout T	N3	M0
IV	Tout T	Tout N	M1	IV	Tout T	Tout N	M1

Tableau 2 : Classification du mélanome cutané¹⁵

Les patients atteints de mélanome métastatique sont des patients classés en stade IV. Le site de développement des métastases ainsi que le taux de LDH permettent de distinguer différents sous-groupes :

- les patients ayant des métastases au niveau de la peau, du tissu conjonctif ou des ganglions lymphatiques et avec un taux de LDH normal sont classés en M1a,
- les patients ayant des métastases pulmonaires associées ou non à des métastases cutanées et un taux normal de LDH sont classés en M1b,
- les patients ayant des métastases sur n'importe quel autre organe ou sur ces mêmes sites mais avec un taux de LDH élevé sont classés en M1c et ont le plus mauvais pronostic.

Il est démontré que le taux de LDH est un facteur prédictif fort et indépendant de la survie des patients en stade IV. En effet, les patients avec un taux de LDH normal ont une survie générale à un et deux ans deux fois plus élevée (65% et 40% respectivement) que les patients avec une LDH élevée (32% et 18%)¹⁵. Cependant, le pronostic vital des patients en stade IV reste faible, même pour les patients en M1a. C'est pour cette raison qu'une classification des patients en stade IV n'est pas obligatoire.

2.5. Traitement du mélanome

→ Chirurgical

A ce jour, la prise en charge thérapeutique des patients atteints de mélanome dépend de cette classification mais aussi de l'indice de Breslow (épaisseur de la tumeur). Le traitement de première intention est la chirurgie par exérèse de la tumeur primaire avec une marge de sécurité variable en fonction de son épaisseur (Tableau 3).

Epaisseur de la tumeur (indice de Breslow)	Marge d'excision (cm)
In situ	0,5
≤ 2,0 mm	1
> 2,0 mm	2

Tableau 3 : Marges d'excision recommandées pour le mélanome¹⁴

L'ablation de la chaîne ganglionnaire n'est pas systématique, elle est préconisée uniquement en cas de macrométastase. En cas de métastases à distance, le retrait chirurgical de la tumeur primaire ainsi que des métastases est réalisé en première intention, si celles-ci sont accessibles. Un traitement complémentaire par radiothérapie ou chimiothérapie peut être envisagé.

→ Radiothérapie

Elle est rarement envisagée en cas de mélanome primaire et réalisée uniquement si la tumeur n'est pas accessible chirurgicalement. En cas de métastases à distance, la radiothérapie peut être envisagée pour traiter les métastases de la peau, des os et surtout du cerveau. En effet, l'espérance de

vie en cas de métastases cérébrales est de trois à cinq mois et la radiothérapie améliore le déficit cérébral de 50% à 75%.

→ Les thérapies adjuvantes

L'injection d'interféron α (IFN α) montre une amélioration significative de la survie sans maladie voire de la survie globale. Cependant cette thérapie doit être réservée aux patients à risque, de stade II ou III et en complément de la chirurgie.

→ Chimiothérapie

Elle est indiquée chez des patients en stade IV pour le traitement de tumeur et métastases régionales inopérables et des métastases à distance. L'objectif principal ici n'est plus de guérir le patient mais d'améliorer son espérance de vie, réduire la taille de la tumeur et diminuer les symptômes. La dacarbazine (DTIC) est le seul agent utilisé en monothérapie. Une rémission objective c'est-à-dire une réduction de plus de 50% de la taille de la tumeur, a pu être observée chez 5,3% à 28,6% des patients. Cependant, même si la dacarbazine est le seul traitement recommandé dans le traitement du mélanome métastatique, il n'est pas démontré qu'elle soit plus efficace qu'une prise en charge globale du patient (ou soin de support) incluant une prise en charge psychologique et un traitement de la douleur. Ainsi, il est recommandé d'inclure les patients en stade IV dans des essais cliniques appropriés pour un traitement de première ou de deuxième ligne.

Partie 2 : Principales voies de signalisation impliquées dans le développement du mélanome métastatique

1. La voie des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) et le mélanome : favorise la prolifération

La voie des MAPK est activée à la surface de la membrane cellulaire soit par la fixation d'un ligand à un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) soit par adhésion des intégrines à la matrice extra-cellulaire (MEC). Cette liaison entraîne l'activation de la GTP-ase RAS qui active ses effecteurs dont les plus connus sont RAF et la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)^{16, 17}.

La famille RAF est une famille de sérine-thréonine kinase comportant trois protéines : A-RAF, B-RAF et C-RAF, transcrites à partir d'un seul gène¹⁸. RAF activée phosphoryle et active la MAPK/ERK kinase (MEK 1/2) qui conduit à la phosphorylation et à l'activation de l'*extra-cellular signal-regulated kinase* (ERK 1/2)¹⁹. ERK transmet des signaux de prolifération et de survie par phosphorylation de différents substrats cytoplasmiques et nucléaires (Figure 6).

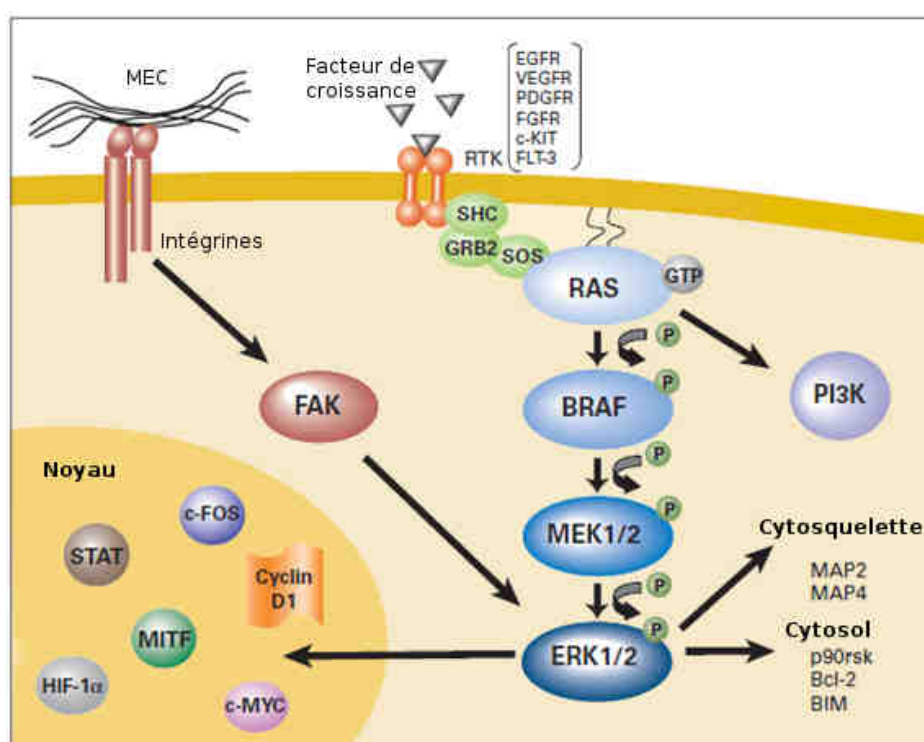


Figure 6 : Voie de signalisation des mitogen-associated protein kinase (MAPK)²⁰.

L'implication de la voie des MAPK dans la croissance cellulaire, la survie et l'invasion explique qu'elle soit fréquemment activée par mutation dans le cancer.

1.1. RAS

Les mutations activatrices de RAS sont fréquentes dans le cancer et conduisent à une activation constitutive de l'enzyme. La mutation de K-RAS est la plus fréquemment rencontrée dans les tumeurs humaines, mais en ce qui concerne le mélanome, c'est la **mutation de N-RAS**^{21, 22} qui est la plus répandue, bien qu'elle ne soit présente que dans **15% des mélanomes**^{21, 23, 24}.

Les mutations de RAS ne sont pas corrélées avec le degré d'exposition au soleil. Même s'il semble que les mutations de N-RAS soient plus fréquentes en cas d'exposition chronique au soleil, elles ne présentent pas de « signature des UVB ». Des naevi de naissance peuvent présenter des mutations de N-RAS ce qui suggèrent que l'exposition aux UVs n'est pas nécessaire pour entraîner des altérations de cette protéine. Il semble donc que la mutation de N-RAS soit un élément important de l'oncogénèse. Sa présence dans les naevi bénins montre qu'elle n'est pas suffisante à elle seule pour permettre la transformation en cellule maligne²⁵.

1.2. BRAF

RAF est l'un des substrats de RAS dans la voie des MAPK. On connaît depuis longtemps le rôle proto-oncogénique des protéines RAF. En effet, comme pour RAS, une mutation activatrice de RAF entraîne une activation constitutive de la voie des MAPK et l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la survie et l'invasion²⁶. Dans le cas du mélanome, c'est la kinase **BRAF** qui est la plus impliquée puisqu'elle est mutée **dans 66% des mélanomes malins**. La mutation se fait au niveau du domaine kinase par la substitution d'une valine par du glutamate en position 600 (**V600E**) dans **80% des cas**²⁷. Cette mutation conduit à une augmentation de l'activité kinase 10,7 fois plus forte que pour la kinase BRAF sauvage²⁷.

Le rôle de proto-oncogène de BRAF est démontré dans diverses expériences. Chez l'animal, les mélanocytes de souris sont transformés après transfection de BRAF muté V600E et l'injection de ces mélanocytes transformés à des souris Nude conduit au développement d'une tumeur²⁸. Chez l'homme, la transfection de petits ARNs interférents (siRNA) dirigés contre BRAF^{V600E} dans des cellules de mélanome inhibe l'activation des MAPK et conduit à un arrêt de la croissance cellulaire, à l'apoptose et une inversion du phénotype malin²⁹. Ici aussi la mutation de BRAF semble importante pour le développement du mélanome mais non suffisante à elle seule.

Tout comme la mutation de N-RAS, aucun lien n'a pu être établi entre le degré d'exposition aux UV et la mutation de BRAF. En 2005, Curtin et *al.* ont étudié la corrélation entre le degré

d'exposition aux UVs et l'apparition de mutations BRAF/N-RAS. Ils ont utilisé différentes techniques pour déterminer s'il y avait des changements dans le nombre de copies de l'ADN ou des mutations BRAF/N-RAS dans des mélanomes primaires. Les mélanomes ont été classés en quatre groupes selon le site d'exposition et le degré d'exposition aux UVs : mélanome de la peau, des muqueuses ou des extrémités (palme, plante) avec ou sans altérations chroniques liées au soleil (CSD = *chronic sun-damaged*). Ils ont constaté que la plupart des mélanomes cutanés avec des mutations de BRAF ou de N-RAS ne présentaient pas de CSD et se développaient après une exposition intermittente au soleil (59% et 22% respectivement)²⁷. On peut aussi ajouter que dans la plupart des cas, les mutations de N-RAS ne sont pas associées à des mutations de B-RAF, suggérant que ces deux types de mutations sont indépendantes mais conduisent aux mêmes modifications fonctionnelles au sein du mélanocyte^{30, 27}.

1.3. GNAQ et GNA11

A la différence des mélanomes cutanés, les mélanomes de l'uvée ne présentent pas de mutations de BRAF et de RAS. L'activation de la voie des MAPK se ferait par le biais d'une protéine G. Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques (sous-unités α , β et γ) couplées à un récepteur transmembranaire (RCPG). Après activation de ce récepteur, il y a échange du GDP en GTP, libération des sous-unités β/γ et activation de la phospholipase C β (PLC β) et de la protéine kinase C (PKC). Puis la sous-unité α hydrolyse le GTP, ce qui entraîne la réassociation de toutes les sous-unités de la protéine G.

Le gène correspondant à la *guanine nucléotide-binding protein Q polypeptide* (GNAQ) est fréquemment muté sur le codon 209 (substitution d'une glutamine par une leucine). Les patients qui sont GNAQ^{WT} présentent, dans 50% des cas, une mutation de GNA11 qui, comme GNAQ, code pour une sous-unité α de classe q/11 de la protéine G. Cette mutation au niveau du codon 209 inactive le domaine catalytique de la sous-unité α , ce qui empêche l'hydrolyse du GTP et bloque GNAQ sous une forme active, liée au GTP. Bastian et al.³¹ ont montré que le gène **GNAQ est muté dans 46% des mélanomes de l'uvée et que 25% des mélanomes primaires de l'uvée portent une mutation de GNA11**. GNAQ^{Q209L} conduit à la prolifération des mélanocytes et peut coopérer avec d'autre oncogène pour transformer des cellules 3T3 et des mélanocytes^{31, 32}.

La transfection de cellules Melan-A/MART-1 + avec un gène GNAQ ou GNA11 mutant conduit à la phosphorylation de ERK ce qui laisse supposer que ces types de mélanome pourraient être sensibles aux inhibiteurs de MEK.

2. La voie CDKN2a/CDK4 et le mélanome : limite la croissance cellulaire et favorise la sénescence

Le cycle cellulaire se décompose en plusieurs phases : G1 – S – G2 – M. Le passage d'une phase à une autre se fait dans un ordre précis et grâce à l'activation de complexe CDK/cycline. Les cyclines sont des protéines synthétisées à des moments précis du cycle puis dégradées à chaque fin de cycle. Les CDK sont des protéines kinases dont l'activité dépend d'une cycline.

2.1. La protéine Rb (Retinoblastoma)

Les complexes CDK2/cycline E et CDK4/cycline D permettent la transition de la phase G1 à la phase S par phosphorylation de la protéine Rb. Cette phosphorylation conduit à l'inactivation de pRb et la dissociation du complexe pRb/E2F. La protéine E2F ainsi libérée peut activer la transcription de gènes de la phase S (Figure 7). L'inactivation de la protéine Rb permet donc l'entrée en phase S et la synthèse de l'ADN. C'est un paramètre important dans la progression du cycle et des dysfonctionnements dans la régulation de cette protéine sont souvent impliqués dans la cancérogénèse.

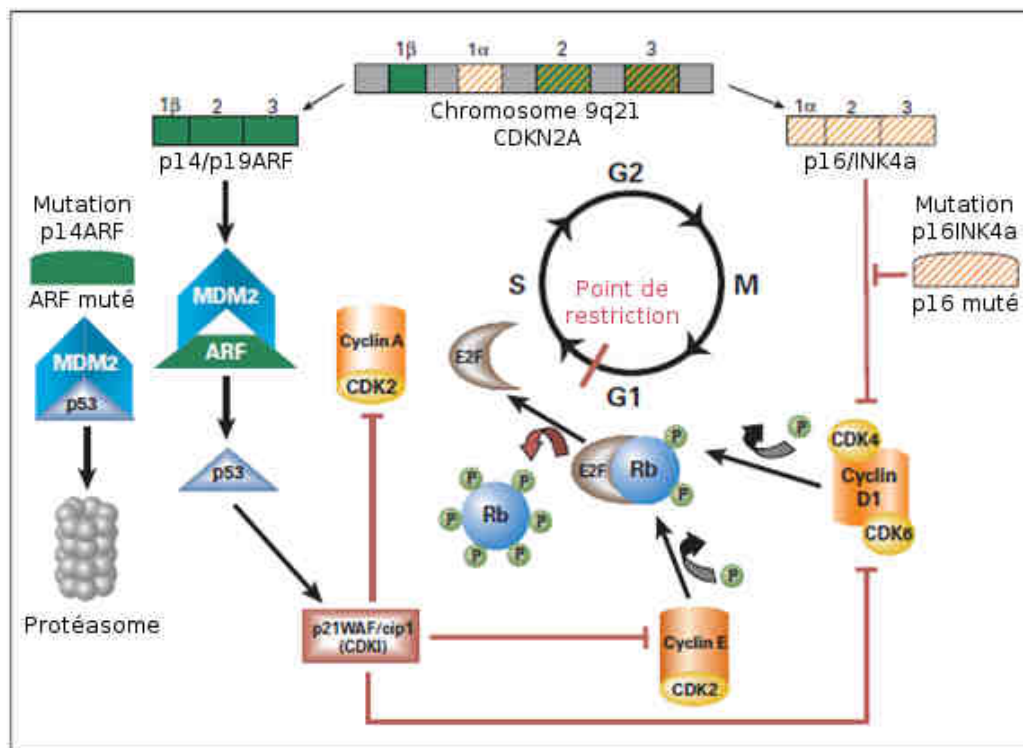


Figure 7 : Régulation du cycle cellulaire par des complexes CDK/cycline²⁰.

Rb est régulée positivement par le *16kb inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a* (p16INK4a). p16INK4a est un gène suppresseur de tumeur car il bloque le cycle cellulaire en inhibant le complexe CDK4/cycline D ce qui empêche la phosphorylation de Rb et l'entrée en phase S. p16INK4a est codé par le locus *cyclin-dependent kinase inhibitor 2a* (CDKN2A) situé au niveau du chromosome 9. Il est important de noter que ce locus code pour un autre gène suppresseur de tumeur, le p14ARF qui

intervient dans la régulation de p53. **Le rôle réel de Rb dans la mélanogénèse reste encore à démontrer.**

2.2. La protéine p16INK4a et le locus CDKN2a

Les modifications interviennent surtout au niveau des régulateurs de cette voie : p16INK4a et CDKN2A. Le taux de **mutation de p16INK4a** dans les formes familiales de mélanome est estimé entre **10% et 40%**³³.

En ce qui concerne le locus **CDKN2A**, Cowan et *al.* ont montré que les mélanomes et les naevi dysplasiques présentent soit la **perte d'une des copies du chromosome 9 soit la perte de son brin court, 9p**³⁴. D'autres ont montré que les cellules de mélanome présentent fréquemment la **perte des deux copies du chromosome 9** et que celles qui en conservent une copie portent souvent des mutations non-sens ou anti-sens sur l'allèle restant³⁵. De plus, les mutations germinales de **CDKN2a** sont observées dans **25% à 50% des formes familiales** de mélanome et des mutations somatiques de ce même locus sont observées dans **30% à 70% des formes sporadiques** de mélanome^{36, 37}. Aucune de ces mutations ne porte la signature des UVB. Par ailleurs, d'autres études ont montré une hyperméthylation dans la région promotrice de CDKN2a ce qui conduit à une **perte d'expression de p16INK4a dans 19% des mélanomes primaires et 33% des mélanomes métastatiques**³⁸.

Ainsi, CDKN2a est considéré comme gène suppresseur de tumeur majeur dans le mélanome car il code pour deux GST : p16INK4a et p14ARF. Toute perte, délétion ou mutation de ce gène conduisent à une dérégulation des voies de Rb et de p53.

2.3. Le complexe CDK4/Cycline D1

La protéine p16INK4a interagit avec le complexe CDK4/Cycline D1 pour inhiber son activité kinase et empêcher la phosphorylation de Rb. Des mutations somatiques et germinales de CDK4 ont ainsi été mises en évidence dans le mélanome^{39, 40}. Elles se situent au niveau du site de liaison de CDK4 avec p16INK4A. Ceci empêche l'interaction entre ces deux éléments et conduit à une résistance de CDK4A vis-à-vis de l'action inhibitrice de p16INK4A. Il n'y a alors plus de régulation possible du cycle cellulaire par p16INK4A.

La cycline D1 est le second élément important dans le complexe CDK4/cyclineD1. Elle a un rôle oncogénique dans de nombreux cancers et notamment les cancers du colon, du poumon ou de la vessie. Par ailleurs, l'oncogène RAS régule positivement la cycline D1 via la voie des MAPK²⁵, fréquemment mutée dans le mélanome. Cependant, des mutations de la cycline D1 elle-même sont peu fréquentes dans le mélanome. Sauter et al. ont démontré une amplification du gène CCND1 (cycline D) et une surexpression de la protéine correspondante dans les mélanomes acraux lentigineux (44,4%)

mais les niveaux d'amplification sont beaucoup plus faibles dans les autres types de mélanome (6% pour le mélanome superficiel extensif)⁴¹.

On peut noter que les amplifications du gène CCND1 ou CDK4 se font de manière réciproque aux mutations activatrices de NRAS ou BRAF. De plus, les amplifications de CCND1 sont plus fréquentes quand la peau a été exposée de manière chronique au soleil³⁰.

3. La voie Bcl-2/p53 et le mélanome : confère une résistance à l'apoptose et à la chimiothérapie

L'apoptose est le premier mécanisme par lequel les agents cytotoxiques détruisent les cellules cancéreuses. Ainsi, tout défaut de signalisation qui conduit à l'apoptose entraîne une chimiorésistance de la tumeur vis-à-vis des agents cytotoxiques.

L'apoptose est déclenchée par deux voies : la voie intrinsèque (récepteur de la mort) et la voie extrinsèque (dépendante de la mitochondrie). Les deux voies conduisent à une activation des caspases (caspases 3, 6 et 7) et des médiateurs finaux de la mort. La voie extrinsèque est activée par les récepteurs de la mort (TNF-R, Fas-R et TRAIL-R) après interaction avec leur ligand. Ils vont recruter les caspases initiatrices (caspases 8 et 10) qui activent les caspases effectrices et entraînent la mort de la cellule²⁵. Dans le mélanome, plusieurs études suggèrent que des dysfonctionnements de la voie extrinsèque sont à l'origine de chimiorésistance^{42, 43, 44}.

La voie intrinsèque est activée en réponse à des stimuli apoptotiques le manque de facteurs de croissance, l'hypoxie, le détachement cellulaire ou les dommages à l'ADN. Ces stimuli activent les facteurs pro-apoptotiques de la superfamille Bcl-2 (Bax, PUMA, NOXA) qui conduisent à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération de cytochrome C. Celui-ci va ensuite agir avec l'Apaf-1 pour activer les caspases effectrices et entraîner l'apoptose de la cellule. Les voies de signalisation MAPK et PI3K jouent un rôle dans la modulation de la voie intrinsèque²⁵ (Figure 8).

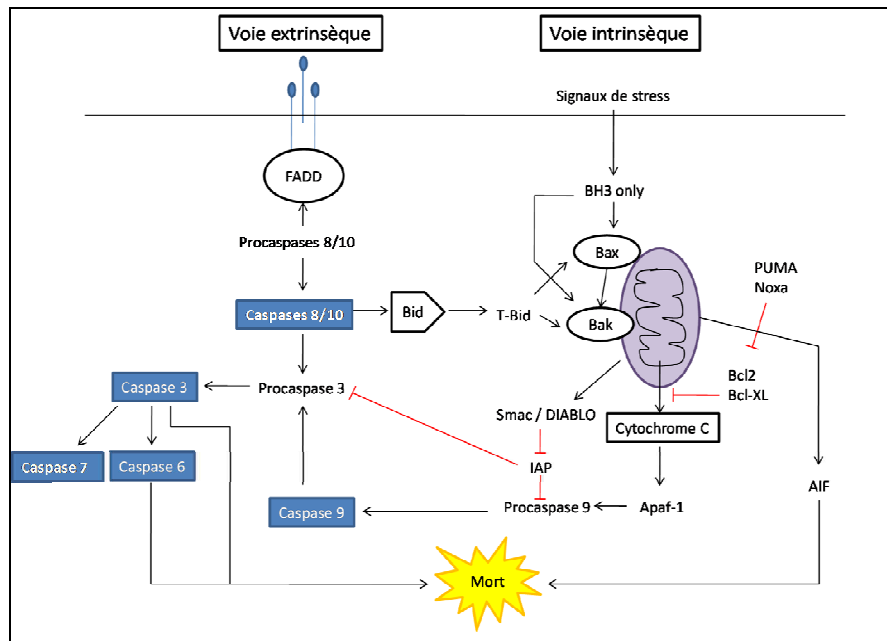


Figure 8 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose

3.1. Voie de p53

En présence d'un stress, la protéine p53 active la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'induction de l'apoptose ou de la sénescence⁴⁵. Ces stress peuvent être de nature oncogénique ce qui explique que la voie de p53 soit fréquemment mutée dans le cancer. Dans le cas du mélanome, le stress peut être causé par les rayonnements UV qui créent des dommages à l'ADN.

La régulation de p53 est complexe. Dans les conditions normales, la durée de vie de cette protéine est très brève et elle est très rapidement dégradée. En effet, elle est liée à la protéine MDM2 dans sa partie N-terminale ce qui conduit à l'ubiquitination de p53 et à sa dégradation par le protéasome. Après irradiation UV, les modifications post-traductionnelles de p53 déstabilisent son interaction avec MDM2 et renforcent son activité transcriptionnelle. Un autre acteur de la régulation de p53 est p14ARF, codé à partir du locus 9p21 CDKN2A. Il se lie à MDM2, inhibant ainsi son activité d'ubiquitine-ligase ce qui stabilise p53 (Figure 7).

Bien que **p53** soit l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans le cancer, il est rarement muté dans le mélanome (**0% à 25%**)^{46, 47}. De même, les mutations de p14ARF sont rares pour ce cancer⁴⁸. Comme il a été mentionné précédemment, CDKN2a est muté ou déficitaire dans près de 50% des mélanomes, on peut donc penser que si les taux de mutation de p53 et p14ARF sont faibles dans le mélanome c'est parce que la perte du locus CDKN2a, et donc la sous-expression de la protéine p14ARF, sont fréquentes.

D'autre part, on sait que p53 joue un rôle dans l'apoptose, notamment en induisant la transcription des facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que BAX, PUMA et NOXA. Ainsi, Li et al. ont démontré que les cellules de mélanome qui ont un phénotype p53 normal répondent deux à trois fois plus fortement au traitement anticancéreux que les cellules qui possèdent une protéine p53 mutante⁴⁹.

3.2. Les facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

La famille Bcl-2 se divise en deux catégories : les facteurs pro-apoptotiques (BAX, BAK, BAD, BID, Bim, NOXA et PUMA) et les facteurs anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, BCL-w et A1).

Bcl-2 a un rôle physiologique pour la peau : lors d'une exposition aux UVs, les kératinocytes sécrètent du NGF (*Nerve growth factor*) qui se lie aux récepteurs des mélanocytes ce qui augmente l'expression de Bcl-2 et la résistance à l'apoptose⁵⁰. Certaines variations dans les voies de signalisations peuvent accroître la concentration de Bcl-2 dans le mélanome. Ainsi NRAS permet la surexpression de Bcl-2 *in vitro* et chez la souris SCID et le MITF favorise la survie par l'activation de Bcl-2^{51, 52}.

D'autres facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Mcl-1, jouent un rôle important dans la survie. Mcl-1 se distingue des autres facteurs anti-apoptotiques de Bcl-2 car, si les facteurs anti-apoptotiques de Bcl-2 sont capables d'inhiber de manière plus moins spécifique les facteurs pro-apoptotiques BAX et BAK, Mcl-1 inhibe de manière très spécifique BAK mais pas BAX⁵³. Ainsi, dans une cellule saine, Mcl-1 séquestre BAK et le maintient sous forme inactive. A la suite d'un signal apoptotique approprié, Mcl-1 est éliminé ce qui libère BAK et entraîne l'apoptose de la cellule. De plus, Mcl-1 a une demi-vie courte dans la cellule et en conditions normales, il est rapidement éliminé par le protéasome. Ainsi, les agents thérapeutiques qui inhibent le protéasome vont avoir tendance à accroître la concentration en Mcl-1 dans la cellule ce qui diminue la sensibilité à l'apoptose⁵⁴. Dans le cas du mélanome, certaines études montrent que Mcl-1 est fortement exprimé dans le mélanome primaire mais aussi dans les formes avancées de mélanome⁵⁵. D'autres études montrent que la résistance aux agents cytotoxiques est largement liée à une surexpression de Mcl-1^{54, 56}.

3.3. Les facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2

Les facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont classés en deux catégories : les « multidomaines » qui possèdent des domaines BH1, BH2 et BH3 (BAX et BAK) et les « BH3 seul » (BAD, BID, Bim, NOXA et PUMA).

Parmi les membres « BH3 seul », NOXA apparaît comme un élément clé. En effet, tout comme BAK, il possède un domaine BH3 qui a une forte spécificité de liaison avec Mcl-1. Ainsi, lorsqu'elle est

activée par différents stimuli, NOXA peut se lier à Mcl-1 ce qui libère BAK et favorise l'apoptose⁵⁷. Il semble donc intéressant de développer des inducteurs de NOXA.

3.4. L'APAF-1

L'APAF-1 est un gène suppresseur de tumeur et c'est un élément important dans l'apoptose induite par p53. En 2001, Soengas et *al.* montraient qu'une méthylation anormale de la région promotrice de l'APAF-1 entraînait une perte d'expression de cette protéine. Ainsi l'activation de p53 ne peut pas entraîner une réponse apoptotique normale. Ils ont ensuite montré que le traitement par un agent déméthylant (5-aza-2-deoxycytidine) permet d'augmenter l'expression d'APAF-1 et restaure ainsi la sensibilité à l'apoptose⁵⁸.

Par ailleurs, il a été rapporté qu'une diminution de la concentration en APAF-1 est liée à l'avancement de la maladie et à une chimiorésistance⁵⁹.

4. La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) et le mélanome : favorise la progression du mélanome

La phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) est un hétérodimère constitué d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p100. L'activation de PI3K par un RTK entraîne la phosphorylation de la phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) (Figure 9). PIP3 peut alors activer AKT. AKT favorise la prolifération, la survie et l'invasion cellulaire. L'un des régulateurs de cette voie est la phosphatase *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) qui régule négativement la voie de PI3K en déphosphorylant PIP3.

Comme pour la voie des MAPK, NRAS peut activer la voie PI3K et de la même façon, favoriser la prolifération, l'apoptose, le réarrangement du cytosquelette et la chimiorésistance des cellules tumorales.

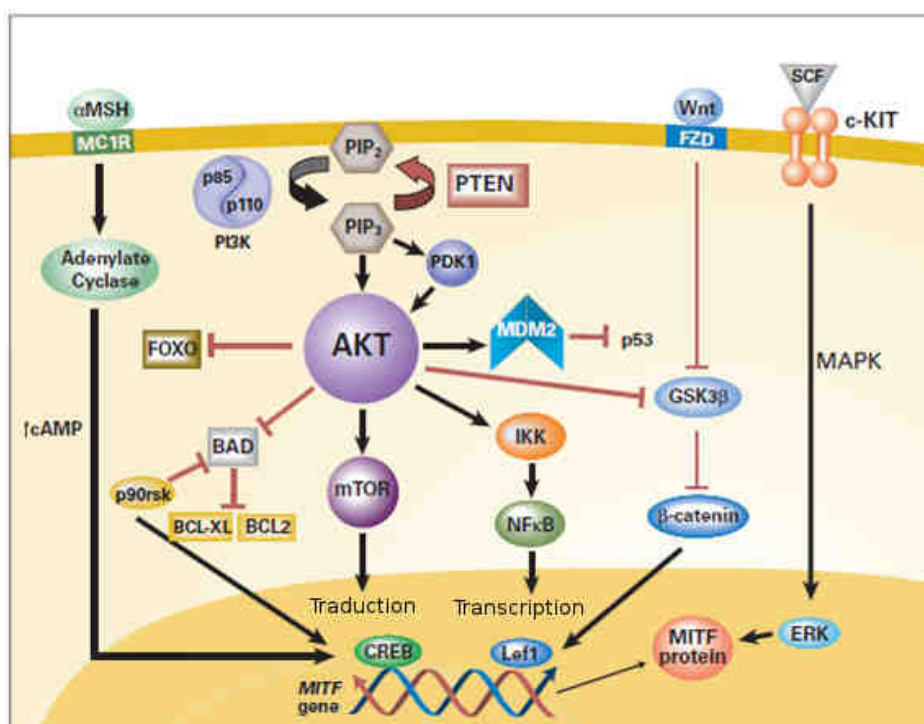


Figure 9 : Voie de PI3K/AKT/mTOR²⁰.

4.1. PI3K

Aziz et al. ont montré que l'expression de PI3K est plus importante dans les mélanomes que dans les naevi et est significativement plus élevée dans les mélanomes métastatiques. Un niveau d'expression élevé est corrélé avec un indice de Breslow > 2 mm, une absence de lymphocytes T infiltrant la tumeur et une diminution de la survie²⁵.

Les mutations PI3K sont rares dans le mélanome. Elles concernent moins de **1% des mélanomes primaires et 3% des mélanomes métastatiques**^{60, 61}. Cependant son niveau d'expression élevé en fait une cible intéressante.

4.2. PTEN

PTEN est un gène suppresseur de tumeur qui inhibe la voie de PI3K. **La perte du locus 10q sur le chromosome 10 est rencontrée dans environ 15% des mélanomes**⁶². Des mutations somatiques de PTEN ont pu être constatées⁶³, elles sont généralement associées à des mutations activatrices de BRAF mais pas de NRAS⁶⁴. Les mutations inactivatrices de PTEN et les mutations activatrices de NRAS sont observées de manière réciproque⁶⁵. Ainsi, s'il y a une mutation activatrice de NRAS, il n'y a pas de mutations de PTEN. De la même manière, s'il a une mutation activatrice de PTEN, le plus souvent, elle est associée à une mutation de BRAF mais pas de NRAS. Il semble donc que la double activation des voies des MAPK et de PI3K soit un événement important dans le

développement du mélanome³⁰. L'activation de la voie PI3K peut se faire soit par activation de NRAS soit par perte de fonction de PTEN.

4.3. AKT

AKT est un élément important de la voie de signalisation PI3K, il est responsable de la phosphorylation et de la régulation de nombreux effecteurs. PI3K activé va générer un second messenger, PIP3, qui permet la translocation d'AKT vers la membrane cellulaire où il est phosphorylé et activé. Une fois activé, AKT phosphoryle un grand nombre de substrat comme MDM2, la pro-caspase 9, le *nuclear factor-κB* (NF-κB), *mammalian target of rapamycin* (mTOR), *bcl-associated death promoter*, la télomérase transcriptase inverse humaine (hTERT) et p27 qui favorise la survie, la prolifération et l'invasion cellulaire. AKT3 est l'isoforme d'AKT la plus dérégulée dans le mélanome⁶⁶.

L'implication d'AKT dans l'oncogénèse a été démontrée dans plusieurs études :

- AKT est phosphorylé et sous forme active dans 71,3% des mélanomes primaires et 71% des mélanomes métastatiques,
- l'activité d'AKT3 est accrue dans les lignées de mélanome^{67, 68}, et
- l'apoptose est restaurée à l'ajout de siRNA dirigés contre AKT3⁶⁶.

Il est important de noter qu'aucune mutation activatrice d'AKT n'est connue à ce jour.

En ce qui concerne la résistance à l'apoptose, AKT phosphoryle CREB, augmente la concentration en Bcl-2 et inhibe Bad⁶⁹.

5. Les voies impliquées dans le développement des mélanocytes

5.1. C-KIT

C-KIT (CD117) est un récepteur à activité tyrosine kinase dont le ligand est le *stem cell factor* (SCF). C-KIT active les éléments de la voie des MAPK et de la voie de PI3K, la phosphatase C, Src et MITF. Ce dernier est essentiel pour le développement des mélanocytes, leur différenciation, leur prolifération, leur survie et leur migration⁷⁰. De plus, le SCF accroît la production de mélanine dans les mélanocytes⁷¹.

L'étude de Curtin et *al.* (2006) montre qu'une **mutation de c-KIT ou une augmentation du nombre de copies du gène correspondant sont présentes dans 39% des mélanomes des**

muqueuses, 36% des mélanomes acraux, 28% des mélanomes CSD et 0% des mélanomes non CSD⁷². Ainsi, les mutations de c-kit semblent se produire dans les formes rares de mélanome, muqueux et acraux majoritairement, ce qui explique le faible taux de mutation observé dans les études globales. Ce récepteur pourrait jouer un rôle d'oncogène et être une cible thérapeutique potentielle dans les formes rares de mélanome.

5.2. Le microphthalmia-associated transcription factor (MITF)

Le MITF est un régulateur important dans le développement des mélanocytes. Ce facteur de transcription détermine le phénotype pigmentaire de la peau en régulant l'expression de certaines protéines spécifiques des mélanocytes comme Melan-A/MART-1 et en régulant et favorisant la survie des mélanoblastes^{73, 74}. Le MITF favorise aussi la survie des mélanocytes en induisant l'expression du protooncogène Bcl-2⁵². Il est aussi connu pour favoriser l'expression du TBX2 qui est un suppresseur de sénescence⁷⁵.

Par ailleurs, Garraway et *al.* ont mis en évidence le rôle majeur du MITF dans la mélanogénèse en montrant une **surexpression de cette protéine dans 10% des mélanomes primaires et 20% des mélanomes métastatiques⁷⁶**. De plus, une expression ectopique de MITF associée à une mutation de BRAF entraîne la transformation des mélanocytes. Le MITF peut donc être considéré comme un proto-oncogène dans le mélanome.

Cependant, il a été démontré que la voie des MAPK régulait négativement l'expression du MITF (Figure 9)⁷⁷. Ainsi, les mélanomes qui présentent une mutation activatrice de BRAF ou NRAS doivent activer des voies alternatives qui permettent de maintenir l'expression du MITF et ainsi garantir la survie cellulaire et la tumorigénèse. L'expression du MITF est stimulée par la β -caténine, un régulateur important de la croissance cellulaire des mélanomes⁷⁸. L'un des mécanismes alternatifs avancés serait qu'il existe des mutations qui stabilisent la β -caténine et induisent l'expression du MITF. Rubinfeld et *al.* ont démontré que six mélanomes sur vingt-six présentent un épissage anormal de l'ARN correspondant au gène de la β -caténine (CTNNB1) ce qui entraîne une stabilisation de la protéine⁷⁹. D'autres études ont montré une accumulation de β -caténine au niveau nucléaire dans un tiers des échantillons de mélanome primaire bien que le taux de mutation de CTNNB1 soit moins fréquent que celui observé initialement^{80, 81}.

Ceci semble indiquer le rôle important que joue le MITF dans la survie tumorale. Il semble donc intéressant d'étudier les facteurs génétiques qui régulent ou qui sont régulés par le MITF.

On peut noter aussi que la β -caténine peut immortaliser les mélanocytes en réprimant l'expression de p16INK4A ce qui permet d'outrepasser le besoin d'une délétion de CDKN2A⁸².

Partie III : Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques

1. Développement de molécules dirigées contre les éléments de la voie des MAPK

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la voie des MAPK est impliquée dans la survie, l'invasion et la prolifération. Ceci laisse penser qu'elle joue un rôle important dans la formation des tumeurs. En effet, deux effecteurs de la voie des MAPK, NRAS et BRAF, sont fréquemment mutés dans le mélanome et de manière indépendante. NRAS est muté dans 15% des cas et BRAF dans 40 à 70% des mélanomes avec une substitution V600E dans 80% des cas. Ces mutations entraînent une activation constitutive des enzymes et une activation des MAPK indépendamment de la fixation d'un ligand sur son RTK ce qui favorise la survie, la prolifération et l'invasion.

Cibler des effecteurs de la voie des MAPK ou des RTK semble donc être une stratégie thérapeutique intéressante afin d'inhiber la prolifération et favoriser l'apoptose des cellules mélanome.

1.1. Les stratégies thérapeutiques dirigées contre NRAS

1.1.1. Les inhibiteurs de la farnésyl transférase (FTI)

Les inhibiteurs de la farnésyl transférase, tels que le tipifarnib ou le lonafarnib, bloquent l'activation de NRAS en inhibant sa farnésylation post-traductionnelle ce qui empêchent RAS de migrer vers la membrane plasmique et de transmettre le signal après fixation du ligand sur le RTK correspondant.

Une première étude *in vitro* menée en 2003 montre que le lonafarnib induit des changements morphologiques des cellules de mélanome. Elles adoptent notamment un phénotype dendritique par un réarrangement de l'actine en fibres de stress. Ceci témoigne de l'altération des GTPases Rho, des cibles de RAS, impliquées dans le contrôle de la morphologie cellulaire et de la mobilité. Ainsi, le lonafarnib bloque les capacités d'invasion des cellules de mélanome. Cette étude montre aussi qu'à des concentrations de 100nM-10µM, le lonafarnib inhibe la croissance des cellules de mélanome et à forte concentration (20µM), il entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 après activation de la protéine p21 par p53⁸³. L'arrêt en phase G1 est lié à une hypo-phosphorylation de pRb. Or, comme

nous avons vu précédemment, la phosphorylation de pRb et l'activation de p21 sont sous la dépendance du gène CDKN2A, muté dans 25% à 50% des formes familiales de mélanome et 30% à 70% des formes somatiques. En cas de mutation de CDKN2A, il n'y a plus de contrôle négatif sur les complexes CDK/cycline. La protéine pRb est constamment phosphorylée et il n'y a plus de contrôle du cycle cellulaire. Il est donc possible que le lonafarnib ne soit pas efficace en cas de mutation de CDKN2a.

Le mélanome métastatique est associé à un pronostic vital très faible lié notamment, au développement d'une chimiorésistance. Celle-ci peut avoir différentes origines parmi lesquelles l'augmentation de l'activité de voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire. La deuxième partie de cette étude a donc recherché si les FTI sont capables d'accroître la sensibilité au cisplatine, un produit de chimiothérapie. Smalley et *al.* montrent ainsi que la combinaison du cisplatine avec le lonafarnib accroît la réponse apoptotique dans toutes les lignées de mélanome testées⁸³.

Cette étude présente des résultats encourageants pour l'utilisation d'inhibiteurs de la farnésyl-transférase dans le traitement du mélanome et notamment en association avec d'autres médicaments de chimiothérapie.

1.2. Les stratégies thérapeutiques dirigées contre BRAF

Les mutations activatrices de BRAF sont retrouvées dans 66% des mélanomes primaires, des tissus métastatiques et des lignées cellulaires de mélanome. La mutation BRAF^{V600E} représente plus de 90% de ces mutations et conduit à l'activation de la voie des MAPK. L'inactivation de cette voie par des ARN interférents dirigés contre BRAF^{V600E} conduit à l'apoptose des lignées qui portent cette mutation et à une régression des xénogreffes de mélanome BRAF^{V600E}. Ces résultats suggèrent que BRAF est une cible thérapeutique intéressante.

1.2.1. Les inhibiteurs multikinases

1.2.1.1. sorafénib seul

Le sorafenib est un inhibiteur multikinase qui bloque les kinases BRAF et CRAF aussi bien que d'autres cibles cellulaires telles que le *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR, particulièrement le VEGFR2), le *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR), le *FMS-like tyrosine kinase 3* (Flt-3), la protéine c-KIT et le récepteur à activité tyrosine kinase RET⁸⁴.

Dans une étude préclinique, Karasarides et *al.* montrent que le sorafenib est capable de bloquer l'activation de ERK, constituant de la voie des MAPK, dans les lignées de mélanome testées.

L'activation de ERK est sous la dépendance de BRAF mais pas de ARAF ou CRAF. Ils en concluent alors que le sorafenib est capable de bloquer l'activité de BRAF dans le mélanome. Ils montrent aussi que cet inhibiteur multikinase bloque la synthèse de l'ADN ce qui induit la mort cellulaire des lignées de mélanome. *In vivo*, le sorafenib retarde la croissance de xénogreffes de mélanome chez la souris Nude sans pour autant entraîner de guérison totale de l'animal⁸⁵.

Le sorafenib apparaît alors comme une molécule intéressante dans le traitement du mélanome métastatique.

Une première étude de phase II randomisée a étudié l'efficacité et la sécurité d'emploi du sorafenib en monothérapie chez des patients présentant un mélanome à un stade avancé. Eisen et *al.* montrent alors qu'à une dose de 400mg deux fois par jour, **le sorafenib a peu ou pas d'activité en monothérapie**. Sept patients présentent une survie sans progression (PFS) comprise entre 16 et 24 semaines, mais il n'est pas certain que cet effet soit lié au sorafenib. Une stabilisation de la maladie est observée chez un patient qui a d'abord reçu un placebo pendant 12 semaines puis du sorafenib pendant 73 semaines (Cf Annexe).

Dans cette étude, il n'y a pas de corrélation entre la présence d'une mutation BRAF^{V600E} et la modeste activité anti-tumorale du sorafénib en monothérapie⁸⁶.

Plus récemment, en 2010, une seconde étude de phase II a été menée chez des patients atteints cette fois-ci de mélanome métastatique⁸⁷. Elle visait, ici aussi à étudier l'efficacité et la sécurité d'emploi du sorafenib en monothérapie et à mettre en évidence une corrélation entre l'existence d'une mutation de BRAF et la réponse au traitement par le sorafenib. Ott et *al.* montrent, ici aussi, que le sorafenib n'a pas une activité significative en monothérapie pour le traitement du mélanome métastatique puisque le taux de contrôle de la maladie est de 11,1% soit quatre patients sur trente-six traités. De plus, aucune réponse partielle n'a pu être observée sur l'ensemble des patients traités. Comme pour l'étude précédente, aucune corrélation n'a pu être établie entre le statut BRAF^{V600E} et l'activité du sorafenib ce qui suggère que cet inhibiteur multikinase n'est pas efficace en tant qu'inhibiteur de BRAF (Cf Annexe).

1.2.1.2. le sorafenib en association

1.2.1.2.1. Sorafenib et inhibiteur de la farnésyl transférase (FTI)

Comme nous l'avons vu précédemment, la farnésylation de RAS est une étape limitante dans les modifications post-transcriptionnelles de cette kinase et est nécessaire à son activité oncogénique. Ainsi un inhibiteur de la farnésyl transférase tel que le lonafarnib et le sorafenib pourrait avoir un effet synergique ou additif.

Une étude montre notamment que le lonafarnib potentialise l'effet pro-apoptotique du sorafenib⁸⁸. En effet, en plus d'inhiber la farnésylation de Ras, le lonafarnib inhibe aussi la farnésylation de RHEB. RHEB est une petite GTPase et active mTOR en antagonisant son inhibiteur endogène, le NFκBP38. RHEB est fortement exprimé dans un certain nombre de cancer et notamment le mélanome. Ainsi, les FTI inhibent la farnésylation et l'activation de RHEB, la signalisation de mTOR et l'action anti-apoptotique de RHEB.

Ainsi, les analyses *in vitro* montrent que l'utilisation du lonafarnib avec le sorafenib inhibent la croissance cellulaire de toutes les lignées de mélanome testées par rapport au lonafarnib ou au sorafenib seul. Cet effet ne semble pas dépendre du statut mutationnel de BRAF et NRAS. Les auteurs montrent aussi que cette association réduit significativement le taux de protéine de la famille des Bcl-2 anti-apoptotique telle que Bcl-2 et Bcl-xL et abolit complètement le taux de Mcl-1 dans les lignées testées. En revanche, elle augmente le taux de facteurs de transcription p8 et CHOP, suggérant que la combinaison sorafenib plus lonafarnib induit l'apoptose des cellules de mélanome via l'activation du stress du réticulum endoplasmique.

Les auteurs mettent toutefois l'accent sur le fait que ce n'est pas la simple inhibition de mTOR qui génère cet effet mais bien l'inhibition de la farnésylation de plusieurs protéines nécessaires à la progression du mélanome. En effet, les résultats obtenus avec le lonafarnib sont plus pertinents que ce obtenus avec la rapamycine (inhibiteur spécifique de mTOR). Le lonafarnib inhibe la farnésylation de RHEB, ce qui inhibe l'activation de mTOR mais aussi de NOTCH, et la farnésylation de PRL-3, connu pour favoriser les métastases de nombreux cancers.

Il semblerait donc intéressant de rechercher l'efficacité clinique de l'association sorafenib plus lonafarnib chez les patients atteints de mélanome métastatique.

1.2.1.2.2. Le sorafenib et les inhibiteurs du *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR)

L'expression du *Fibroblast growth factor 2* (FGF2) est caractéristique des cellules de mélanome à la différence des mélanocytes normaux. Après fixation du FGF sur son récepteur, le FGFR, il y a activation de voies de signalisation impliquées dans la survie et la croissance cellulaire telles que la voie des MAPK et de PI3K. En plus de cette activité autocrine du FGF sur les cellules de mélanome, ce facteur de croissance joue aussi un rôle dans la néoangiogénèse.

Metzner et *al.* montrent, dans une étude parue en 2011, que des inhibiteurs du FGFR et le sorafenib ont un effet synergique sur l'inhibition de la croissance des cellules de mélanome, le blocage des signaux de survie et l'induction de l'apoptose⁸⁹.

1.2.1.2.3. Sorafenib et dacarbazine

La dacarbazine est le traitement standard du mélanome de stade IV mais cette molécule présente une réponse objective faible, inférieure à 20% avec une survie sans progression (PFS) inférieure à deux mois. L'efficacité clinique de la dacarbazine reste relativement faible et plusieurs équipes ont cherché à optimiser son effet en l'associant à d'autres molécules.

Une première étude a été menée en 2008 sur 101 patients. Dans cette étude, la PFS moyenne dans le bras « dacarbazine plus placebo » est de 11,7 semaines alors qu'elle est de 21,1% dans le bras « dacarbazine plus sorafenib » soit une amélioration de près de 50%. De plus, elle montre une augmentation significative du temps jusqu'à progression (TTP) de 62% et une amélioration du taux de réponse (ensemble des réponses complètes et partielles : CR + PR). Cependant, cette étude ne montre pas d'amélioration de la survie globale (OS) ⁹⁰ (Cf Annexe).

Ces résultats, pourtant encourageants, n'ont à ce jour pas pu être reproduits. En effet, une seconde étude publiée en 2011 donnent des résultats proches de ceux obtenus dans le bras « placebo plus dacarbazine » chez des patients pourtant traités par l'association dacarbazine plus sorafenib (Cf Annexe)⁹¹. Les arguments avancés par les auteurs pour expliquer ces différences sont que le pourcentage de patients en stade IV M1c est plus élevé dans l'étude de 2011 (80%) que dans celle de 2008 (55%). De plus, le pourcentage de patient avec un taux de LDH élevé est plus faible dans la première étude que dans la seconde. Les deux études sont donc difficilement comparables, et il semble que les auteurs de 2008 aient sélectionné une population moins « à risque » et plus sensible au sorafenib.

1.2.1.2.4. Le sorafenib et l'association carboplatine/paclitaxel

Le paclitaxel et le carboplatine sont deux cytostatiques qui n'ont qu'une efficacité modeste en monothérapie, dans le traitement des formes avancées du mélanome. La combinaison carboplatine plus paclitaxel (CP) a été évaluée dans deux études de phase II dans le mélanome. Sur quinze patients inclus, trois ont présenté une PR.

Une étude de phase I avec sorafenib plus CP a été réalisée chez des patients atteints de tumeur solide⁹². Sur 158 patients inclus, 105 avaient un mélanome résistant aux traitements habituels. Chez ces patients, le taux de PR est de 26% avec une réponse complète et la PFS moyenne est de 8,8 mois.

Ces résultats encourageants ont permis de concevoir des études de phase II et III avec cette combinaison. Les résultats d'une première étude de phase I/II ont été présentés au congrès de *l'American society of clinical oncology* (ASCO)⁹³. Ils concluent à la pertinence clinique de l'association sorafenib plus CP avec notamment 31% de PR, un TTP moyen de trois mois et 54% ont un état stable (SD) (Cf Annexe).

Cependant, une étude plus récente a elle aussi étudié cette association et montre qu'elle présente peu d'intérêt clinique. En effet, en comparant l'association « sorafenib plus CP » avec l'association

« placebo plus CP », les auteurs montrent qu'il n'y a pas d'amélioration de la PFS (respectivement de 17,4 semaines et 17,9 semaines) ni de l'OS (42 semaines pour les deux bras). Ils concluent donc que la combinaison « sorafenib plus CP » n'est pas recommandée comme traitement de deuxième ligne chez des patients atteints de mélanome métastatique.

Une autre étude de phase III est actuellement en cours pour déterminer si cette association est pertinente pour un traitement de première ligne chez des patients n'ayant jamais reçu de traitement de chimiothérapie⁹⁴.

1.2.1.2.5. Le sorafenib et l'interféron $\alpha 2b$ pégylé

L'interféron est utilisé en traitement adjuvant du mélanome avec un bénéfice sur la survie sans rechute et, dans une moindre mesure, sur la survie globale.

Une étude a recherché l'intérêt clinique de la combinaison IFN $\alpha 2b$ pégylé, c'est-à-dire couplé à une chaîne de polyéthylène glycol qui prolonge le temps de demi-vie de l'IFN dans l'organisme, avec le sorafenib. Elle a notamment cherché s'il existe une synergie entre les effets anti-prolifératif et anti-angiogénique du sorafenib et les effets anti-prolifératif, immuno-modulateur et anti-angiogénique de l'IFN- $\alpha 2b$.

Les auteurs montrent alors que l'association IFN- $\alpha 2b$ plus sorafenib présente un bénéfice clinique très limité puisqu'elle ne donne aucune réponse complète sur l'ensemble des patients traités (N=55). De plus, le niveau de contrôle de la maladie (DCR) est de 29%, la PFS moyenne est de 2,47 mois et l'OS moyenne est de 9,47 mois (Cf Annexe). Les auteurs expliquent cette faible efficacité par le fait que 78% des patients inclus sont en stade IV M1c et que 40% d'entre eux ont un taux de LDH élevé en début de traitement⁹⁵.

1.2.1.2.6. Limites du sorafenib

L'une des explications avancées pour expliquer la faible efficacité du sorafenib dans le traitement du mélanome est son manque de spécificité. En effet, des inhibiteurs de kinase spécifiques de BRAF ont été développés et entraînent des réponses, voire des réponses complètes, chez la plupart des patients qui présentent une mutation BRAF^{V600E}. De plus, l'activité anti-tumorale du sorafenib pourrait s'expliquer, non pas par une inhibition de BRAF, mais par son action sur d'autres cibles cellulaires telles que le VEGFR2 ou c-KIT.

De manière plus intéressante encore, une étude montre que CRAF inhibe l'activité kinase de BRAF^{V600E}⁹⁶. En effet, l'expression concomitante de BRAF^{V600E} et CRAF dans une cellule entraîne une diminution de la phosphorylation de ERK comparé aux cellules qui n'expriment que BRAF^{V600E}. Les auteurs montrent que cette activité inhibitrice n'est pas liée à l'activité kinase de CRAF mais à la liaison de CRAF avec BRAF^{V600E}. Ainsi les hétérodimères CRAF/ BRAF^{V600E} ont une activité kinase

plus faible que les homodimères BRAF^{V600E}/ BRAF^{V600E} ou BRAF^{V600E}/ BRAF^{WT}. Les cellules de mélanome mutées BRAF^{V600E} réagissent à cette inhibition en réduisant le ratio CRAF/BRAF.

Le sorafenib inhibe plus efficacement CRAF que BRAF ou BRAF^{V600E} ⁸⁴. De plus, à faibles doses (0,003 à 0,3μM), le sorafenib favorise la phosphorylation de ERK mais dans les cellules mutées BRAF^{V600E} uniquement. En revanche, à forte dose (3μM), la phosphorylation est inhibée. Pour expliquer ces résultats, Karreth et *al.* ont démontré que le sorafénib stabilise le complexe BRAF^{V600E}/CRAF à des doses comprises entre 0,3 et 3μM. Ceci a pour conséquence de favoriser l'inhibition de BRAF^{V600E} et ainsi d'inhiber la phosphorylation de ERK. En revanche, une stabilisation du complexe BRAF^{V600E}/ BRAF^{V600E} est favorisée par une faible concentration en sorafenib ce qui favorise la signalisation BRAF^{V600E} et la résistance au sorafénib ⁹⁶.

1.2.2. Les inhibiteurs spécifiques de BRAF

1.2.2.1. Le vemurafenib

Comme nous l'avons vu précédemment, près de 40 à 70% des mélanomes cutanés ont une mutation de BRAF qui conduit à une activation constitutive de la voie des MAPK. Environ 80% de ces mutations est une mutation BRAF^{V600E}.

Etant donné l'efficacité clinique modeste voire nulle des inhibiteurs non spécifiques de kinase, des inhibiteurs spécifiques de BRAF ont été développés. Le vémurafenib (PLX4032) est un puissant inhibiteur de BRAF muté. Il a un effet antitumoral sur les lignées de mélanome qui portent une mutation BRAF^{V600E} mais pas contre celles qui sont BRAF^{WT}.

Une étude de phase I a d'abord établi que la dose maximale tolérée est de 960mg deux fois par jour. Cette étude a aussi montré une certaine efficacité clinique puisque sur trente-deux patients traités à cette dose (tous avait une mutation BRAF^{V600E}), vingt-six ont répondu favorablement au traitement avec deux réponses complètes et vingt-quatre réponses partielles⁹⁷ (Cf Annexe).

Puis une étude de phase II a évalué la pertinence clinique du vémurafenib en traitement de deuxième ligne chez 132 patients. Les auteurs ont obtenu un taux de réponse de 52,3% avec 2,3% de réponses complètes et 50% de réponses partielles. La durée moyenne de la réponse était de 6,8 mois et la PFS de 6,2 mois. L'OS n'a pas pu être déterminée dans cette étude⁹⁸ (Cf Annexe).

Ces résultats encourageants ont permis de réaliser une étude de phase III. Celle-ci a inclus 2107 patients et évalué l'efficacité du vémurafenib par rapport au traitement de référence, la dacarbazine. Les résultats de l'étude montrent une survie globale à six mois de 84% dans le groupe « vémurafenib » contre 64% dans le groupe « dacarbazine ». De même, le PFS moyenne est de 5,3 mois dans le bras « vémurafénib » contre 1,6 mois dans le bras contrôle (Cf Annexe). Les auteurs précisent que la supériorité de vémurafénib par rapport à la dacarbazine est observée quelque soit le sous-groupe de population étudié. En effet, même dans les groupes de mauvais pronostic, c'est-à-dire les patients avec

un taux de LDH élevé ou au stade M1c, le bénéfice clinique du vémurafénib par rapport au traitement de référence est incontestable⁹⁹.

Ces études prouvent l'intérêt de l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de BRAF muté. Le vémurafénib améliore considérablement le taux de réponse au traitement, par rapport au traitement par la dacarbazine, chez les patients atteints de mélanome métastatique. Les résultats obtenus avec cette molécule n'ont, jusqu'à présent, jamais été atteints par n'importe quel autre traitement ou protocole de polychimiothérapie. Elle constitue donc une avancée majeure dans la prise en charge des patients atteints de mélanome métastatique. Actuellement, le vémurafénib n'est pas encore commercialisé et des dossiers d'autorisation de mise sur le marché (AMM) sont en cours d'évaluation par différentes agences sanitaires mondiales. En France, il peut toutefois être utilisé dans le cadre d'autorisation temporaire d'utilisation (ATU).

Cependant, en dépit de ces résultats cliniques encourageants et de l'espoir qu'a suscité le vémurafénib, on peut émettre quelques réserves.

Premièrement, le vémurafénib n'a pas d'efficacité chez les patients qui n'ont pas de mutation de BRAF. Il est donc nécessaire d'étudier et de développer d'autres molécules dirigées contre des cibles présentes chez les patients BRAF^{WT}.

Deuxièmement, de nombreux cas de résistance au traitement par vémurafénib et de rechute de patients traités par cette molécule ont été relevés.

1.2.2.2. La résistance du vémurafénib

En effet, malgré un taux de réponse important, le bénéfice clinique du vémurafénib n'est que temporaire comme en témoigne l'étude de Wagle et al.¹⁰⁰. Les auteurs ont suivi un patient atteint de mélanome métastatique avec une mutation BRAF^{V600E}. Avant le traitement par vémurafénib, le patient présente plusieurs nodules sous-cutanés métastatiques (Figure 10). Après quinze semaines de traitement par vémurafénib, le patient est presque en rémission complète et la plupart des nodules ont disparu (Figure 10). Mais après seize semaines traitement, le patient rechute et au bout de vingt-trois semaines, la plupart des sites viscéraux et sous-cutanés sont à nouveau envahis (Figure 10).



Figure 10 : Homme de 38 ans atteint de mélanome avec dépôts métastatiques sous-cutanés. (A) Avant l'initiation du traitement au vémurafénib, (B) après 15 semaines de traitement et (C), après rechute, après 23 semaines de traitement¹⁰⁰.

Plusieurs équipes se sont alors intéressées aux mécanismes d'échappement et de résistance au vémurafénib. Les mécanismes de résistance à un agent anticancéreux sont généralement les pompes à efflux, les modifications de la protéine cible ou l'activation d'une autre voie de signalisation. En ce qui concerne le mélanome, quatre mécanismes peuvent être décrits. Tout d'abord, la réactivation de la signalisation RAF-MEK, l'activation d'une voie de signalisation alternative, l'altération dans la régulation du cycle cellulaire par ERK1/2 et des régulations de la chromatine.

1.2.2.2.1. La réactivation de la signalisation RAF-MEK

Il a d'abord été montré que, dans des biopsies de patients BRAF^{V600E} résistants au vémurafénib et dans des cultures de mélanome obtenues à partir de patients résistants, il n'y avait **pas de mutation secondaire de BRAF^{V600E}**¹⁰¹. Ainsi l'amplification d'un autre élément de la voie des MAPK semble être responsable de la résistance au vémurafénib. En 2008, Montagut et *al.* ont montré que l'élévation du taux de protéine CRAF est corrélée à la résistance à l'AZ628, un inhibiteur sélectif de kinase RAF¹⁰². Ainsi une déplétion en CRAF dans des cellules de mélanome résistantes à l'AZ628 augmente la sensibilité de ces cellules à une inhibition de RAF. De même, la surexpression de CRAF dans des cellules parentales augmente la résistance à l'AZ628. Plus récemment, Villanueva et *al.* ont constaté qu'un traitement au SB-590885, un inhibiteur spécifique de BRAF, réduit le taux de CRAF dans les lignées parentales mais, dans les lignées résistantes, le taux de CRAF reste stable voire légèrement augmenté. Ils ont aussi constaté que le *knockdown* de BRAF par un ARN interférent (siRNA) entraîne

une inhibition de la phosphorylation de ERK dans les cellules parentales mais pas dans les cellules résistantes. Ils ont ensuite réalisé un *knockdown* de CRAF avec un siRNA dirigé contre cette kinase et sont arrivés aux mêmes conclusions. Ainsi, dans les cellules résistantes au SB-590885, l'activation des MAPK peut être indépendante de CRAF et de BRAF. Les auteurs font alors l'hypothèse que l'activation des MAPK dans les cellules résistantes ne nécessite l'activation que d'une seule des trois isoformes RAF. Ainsi, en traitant ces cellules par du SB-590885 tout en réalisant un *knockdown* de CRAF et ARAF, les auteurs obtiennent une inhibition de la phosphorylation de ERK. Ils en concluent donc que **l'inhibition de l'activité de ERK dans des cellules résistantes à l'inhibition de BRAF nécessite l'abrogation concomitante des trois isoformes de RAF**¹⁰³.

D'autre part, l'équipe de Garraway a recherché quelles pouvaient être les kinases responsables de la résistance au vémurafénib. Pour cela, ils ont évalué l'impact de l'expression de chaque kinase sur la viabilité d'une lignée cellulaire initialement sensible au vémurafénib¹⁰⁴. Ils ont alors montré que neuf kinases confèrent une résistance et que trois d'entre elles sont des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Parmi ces trois RTK, la MAP3K MAP3K8 (COT/Tpl2) et ARF1 (CRAF) sont les kinases qui réduisent le plus la sensibilité au vémurafénib en réactivant la voie des MAPK. En analysant l'expression de COT, les auteurs se sont aperçus que COT est exprimé dans les mélanocytes BRAF^{WT}, mais pas dans les mélanomes BRAF^{V600E}. Il semble donc que BRAF muté antagonise l'expression de COT et que l'inhibition de BRAF par le vémurafénib restaure l'expression de COT. De plus, les auteurs montrent que **l'expression de COT est suffisante pour entraîner une activation de la voie des MAPK indépendamment de RAF**. La déplétion de COT par un siRNA spécifique diminue la phosphorylation de ERK. On peut donc penser que cibler l'activité kinase de COT dans les cellules de mélanome qui surexpriment ou amplifie cette kinase est un moyen de restaurer la sensibilité au vémurafénib¹⁰⁴.

Plus récemment, cette même équipe a recherché s'il existe d'autres effecteurs de BRAF responsables de la résistance¹⁰⁰. A partir d'un patient en rechute après un traitement au vémurafénib, Wagle et *al.* ont séquencé tous les exons correspondants à 138 gènes impliqués dans le cancer. Quatorze substitutions ont été identifiées et 79% d'entre elles portent la « signature des ultraviolets ». Parmi elles, deux mutations ne sont pas détectables dans la tumeur sensible au vémurafénib de départ. L'une d'entre elles est la mutation MEK1^{C121S} avec la substitution d'une cystéine et sérine en position 121. Cette mutation a une fréquence de 16% dans le mélanome. L'autre mutation est la mutation RET^{K710N} mais elle a une fréquence beaucoup plus faible et la mutation ne concerne pas un site fonctionnel. Après analyse, les auteurs montrent que **l'introduction d'une mutation MEK1^{C121S} dans une cellule BRAF^{V600E} initialement sensible au vémurafénib, induit une forte résistance à cette molécule. Les cellules qui expriment MEK1^{C121S} ont un fort taux de ERK1/2 phosphorylé et développent une forte résistance pour un inhibiteur de MEK, l'AZD6244**. Il en est de même pour la mutation MEK^{P124L}

¹⁰⁵.

Mais la régulation positive des MAP3Ks telles que COT1, ne représente qu'un mécanisme possible de résistance au vémurafénib. Ainsi, certaines équipes se sont intéressées, non pas aux éléments de la voie des MAPK situés après BRAF, mais aux éléments qui conduisent à l'activation de BRAF. Ces éléments sont des RAS guanosine triphosphatases, telles que NRAS, attachées à la membrane plasmique et activées après activation de récepteurs aux facteurs de croissance, aux hormones ou aux cytokines. RAS actif recrute RAF à la membrane et favorise la dimérisation de CRAF et BRAF en hétérodimères CRAF/BRAF ou en homodimères CRAF/CRAF qui conduisent à l'activation de la voie MEK/ERK1/2. Comme nous l'avons vu précédemment NRAS est muté dans environ 15% des mélanomes. Le rôle de RAS dans la résistance aux inhibiteurs de RAF a été décrit dans de nombreux papiers. Les auteurs partent du constat que **les inhibiteurs de RAF entraînent à une activation paradoxale de la voie MEK/ERK1/2 dans les cellules de mélanome NRAS/KRAS muté ou à un niveau de RAS activé élevé**^{106, 107}. Plusieurs explications sont données pour expliquer ce phénomène.

Dans un premier modèle, RAS-GTP activé (RAS*-GTP) par un récepteur ou par mutation, induit l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation de BRAF^{WT} avec CRAF. A faible concentration, un inhibiteur de RAF n'inhibe qu'une seule des deux kinases du dimère. Cette liaison, au niveau d'un site actif, induit un changement de conformation qui favorise l'activation de l'autre kinase. Il en résulte une activation paradoxale de la voie MEK/ERK1/2 par la kinase non inhibée¹⁰⁶. A forte dose, les deux kinases RAF sont inhibées et la voie de signalisation MEK/ERK1/2 est complètement abolie (Figure 11a).

Le deuxième modèle concerne les cellules mutées pour RAS. Dans ces cellules, BRAF est majoritairement présent dans le cytosol et CRAF au niveau de la membrane plasmique. Un traitement par un inhibiteur spécifique de BRAF entraîne le recrutement de BRAF à la membrane et une forte dimérisation de CRAF avec BRAF. La même observation est faite dans les cellules RAS^{WT} après activation de RAS par l'EGF^{107, 108}. La dimérisation entraîne l'activation de CRAF par RAS-GTP* et l'activation paradoxale de la voie des MAPK/MEK/ERK. En revanche, le traitement par un inhibiteur multikinase tel que le sorafenib entraîne aussi une forte dimérisation de BRAF avec CRAF. Mais ces inhibiteurs inhibent à la fois BRAF et CRAF, il n'y a donc pas d'activation de la voie des MAPK/MEK/ERK dans ce cas (Figure 11b). Il est important de noter que, les inhibiteurs spécifiques comme les inhibiteurs multikinases induisent la liaison de BRAF avec CRAF dans les cellules mutées NRAS ou KRAS, mais pas dans les cellules mutées pour BRAF.

Heidorn et *al.* expliquent ce phénomène par le fait que, dans les cellules RAS muté, BRAF se maintient sous une conformation inactive par sa propre activité kinase. Lorsque que BRAF^{WT} est inhibé, il échappe à son auto-inhibition et est recruté à la membrane par RAS où il forme un complexe

avec CRAF. En revanche, les inhibiteurs pan-kinases n'induisent pas d'activation de MEK/ERK car ils inhibent BRAF et CRAF.

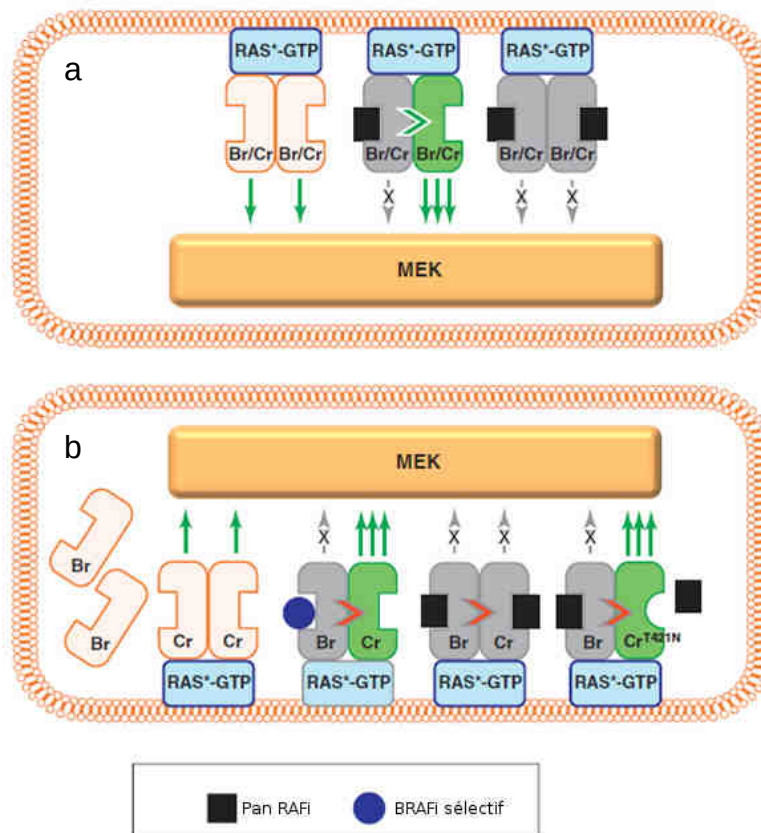


Figure 11 : Modèles d'activation et d'inhibition de RAF¹⁰⁹.

Ainsi, les études de Hatzivassiliou et *al.*, Heidorn et *al.* et Poulidakos et *al.* soulignent deux aspects importants. Premièrement, ils montrent que les inhibiteurs de BRAF peuvent entraîner une activation de la voie MEK/ERK dans les cellules BRAF^{WT} (Figure 12). Ils soulignent donc l'importance de rechercher le profil génétique et le statut mutationnel du patient. D'une part, pour rechercher quels sont les patients les plus susceptibles de répondre au traitement et d'autre part, pour exclure ceux pour qui le traitement est délétère.

Deuxièmement, une inhibition complète de BRAF^{V600E} est nécessaire pour obtenir un bénéfice clinique et l'activation, même d'une très faible proportion de BRAF^{WT} peut être suffisante pour activer la voie MAPK/MEK/ERK des cellules mutées pour RAS. Ainsi, pour être efficace, il est nécessaire de développer des inhibiteurs exclusivement sélectifs de la protéine mutante.

Enfin, on peut penser que le développement de résistance contre le vémurafénib se fait par acquisition de mutation de RAS ou d'un composé en amont qui active RAS ou que les inhibiteurs contribuent à sélectionner la population de cellules qui a développé une mutation de RAS.

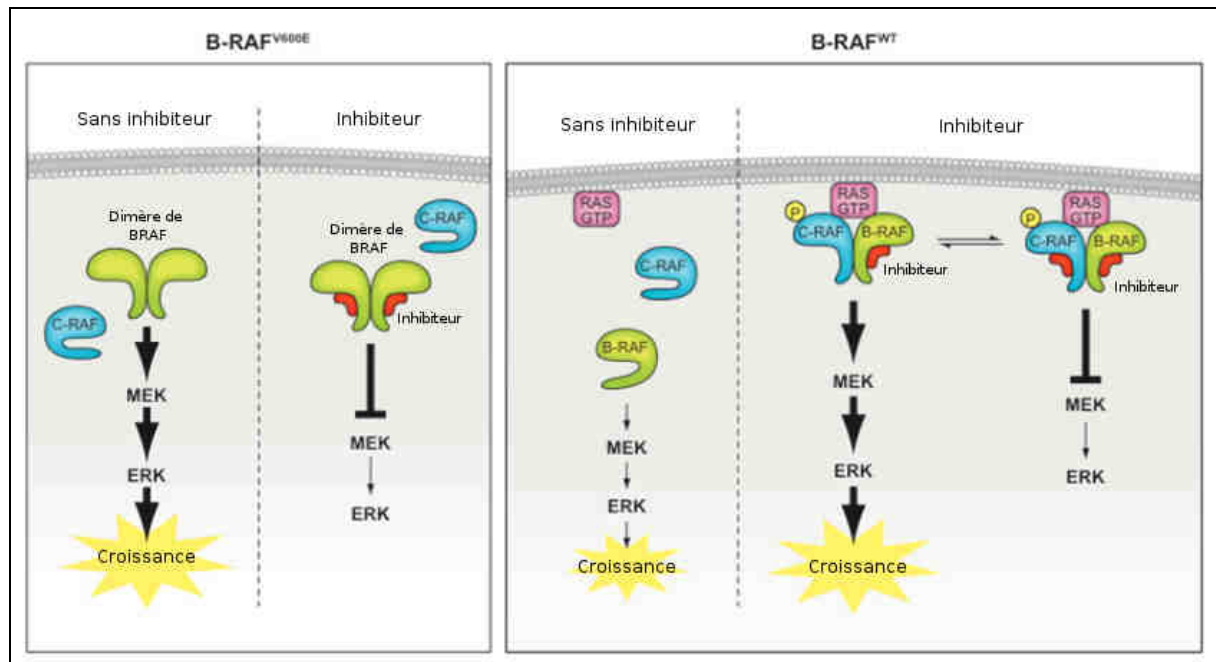


Figure 12 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de RAF dans les cellules BRAF^{WT} et BRAF^{V600E} 108

1.2.2.2.2. Altérations dans les étapes du cycle cellulaire dépendantes de ERK1/2

Il a été montré que BRAF muté favorise la prolifération cellulaire en induisant l'expression de la cycline D1 via l'activation de ERK1/2¹¹⁰. La cycline D1 forme des complexes avec la cycline dépendent-kinase 4 (CDK4) qui vont phosphoryler la protéine Rb et permettre l'entrée en phase S et la prolifération cellulaire. Ainsi, l'augmentation de l'expression de la cycline D1 et de CDK4 ou une mutation activatrice de CDK4 peut être un mécanisme de résistance aux inhibiteurs de BRAF. Dans des conditions physiologiques, CDK4 est régulé négativement par la protéine p16^{INK4A}. Or, comme nous l'avons vu précédemment, il y a souvent une perte de fonction de p16 dans mélanome liée à une mutation du locus CDKN2A.

Dans un article paru en 2008, Smalley et *al.* montrent que la présence d'une mutation de CDK4 n'altère pas la réponse de l'inhibiteur BRAF sur l'inhibition du cycle cellulaire¹¹¹. En revanche, ils détectent une amplification de CCND1 dans 25% de leur lignée cellulaire de mélanome mutées BRAF^{V600E}. Cette amplification de CCND1 est corrélée avec une augmentation de l'expression de la protéine cycline D1. Selon les auteurs, la surexpression de la cycline D1 dans une cellule suffit à induire une résistance au traitement par SB-590885 (un inhibiteur de BRAF). De plus, ils mettent en évidence que la résistance est encore plus forte lorsque la cellule surexprime à la fois la cycline D1 et CDK4.

Ceci laisse penser que des cellules avec une amplification de CCND1 et un niveau basale de cycline D1 élevé seraient moins dépendantes de la voie BRAF/MEK pour induire leur cycle cellulaire.

On peut en déduire que les patients atteints de mélanome avec à la fois une mutation BRAF^{V600E} et une amplification de CCND1 sont plus susceptibles de développer une résistance aux inhibiteurs de BRAF.

1.2.2.2.3. Activation d'une voie de signalisation alternative

De nombreuses équipes ont créé des lignées cellulaires avec BRAF muté qui ont développé une résistance pour les inhibiteurs de RAF mais elles n'ont pas toutes montré une réactivation de la voie ERK1/2¹⁰². Ceci montre que les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de RAF peuvent être indépendants de ERK1/2.

En 2010, Nazarian et *al.* analysent les gènes codant pour des récepteurs à activité tyrosine kinase. Ils montrent que dans certaines lignées de mélanome mutées BRAF^{V600E} et résistantes au vémurafénib, il y a une surexpression des gènes KIT, MET, EGFR et PDGFR β . Une régulation positive des ARN codant pour ces quatre RTK est corrélée avec une augmentation du nombre de copie de gène correspondant et une augmentation de l'expression de chaque protéine. Cependant, seul le PDGFR β présente un niveau d'activation élevé. Il est intéressant de noter que la régulation positive du PDGFR β est présente dans les cellules résistantes et pas dans les cellules parentales. Les études *in vivo* ont permis de montrer que sur onze échantillons de patients résistants au vémurafénib, quatre présentent une surexpression du PDGFR β . **Il semble donc que l'activation de la voie du PDGFR β soit un mécanisme de résistance possible**¹⁰¹.

D'autre part, Villanueva et *al.* ont étudié le degré d'activation de plusieurs RTK dans des cellules résistantes au inhibiteur de BRAF¹⁰³. Ils ont ainsi mis en évidence que seule l'inhibition de l'IGF-R conduit à une diminution de la viabilité de ces cellules. Ils ont aussi montré les cellules résistantes surexpriment ce récepteur à la différence des cellules parentales et qu'il reste phosphorylé après un traitement par le SB-590885. Paradoxalement, cette surexpression de l'IGF-R n'est liée ni à une augmentation de la quantité d'ARNm ni à une augmentation de l'expression de la protéine. Il semble donc que la persistance de l'activité de l'IGF-R dans les cellules résistantes aux inhibiteurs de BRAF soit liée à des modifications post-transcriptionnelles.

L'IGFBP-3 régule négativement l'IGF-R en séquestrant l'IGF et en l'empêchant de se lier à son récepteur. Après un traitement au SB-590885, l'expression de l'IGFBP-3 est augmentée dans les cellules parentales et réduite dans les cellules résistantes. Ainsi, la régulation IGFBP-3 apparaît comme l'un des facteurs de modulation la signalisation par l'IGFR et permet de contourner l'inhibition de BRAF.

L'IGF-R un RTK qui peut activer à la fois la voie des MAPK mais aussi la voie des PI3K, qui ont toutes les deux un rôle important dans l'oncogénèse. En utilisant des inhibiteurs de l'IGFR, Villanueva et *al.* n'ont constaté aucun changement dans l'activation ERK alors que la phosphorylation d'AKT

était inhibée. Ceci suggère que **la persistance de la signalisation IGF-R induit l'activation de la voie PI3K/AKT dans les cellules BRAF^{V600E} et résistantes aux inhibiteurs de BRAF.**

Ces mêmes auteurs ont ensuite étudié l'impact de l'inhibition concomitante de MEK et l'IGF-R sur l'expression de certaines protéines de la famille de Bcl2 impliquées dans la survie des cellules de mélanome telles que Mcl-1, BAD et BIM¹⁰³. Ils montrent alors que l'inhibition de MEK ou de l'IGF-R inhibe partiellement le facteur anti-apoptotique Mcl-1 et que l'utilisation d'un inhibiteur de MEK et d'un inhibiteur de l'IGF-R a un effet additif sur la sous-expression de Mcl-1. Ainsi, **MEK et l'IGF-R semblent agir ensemble pour permettre la survie des cellules résistantes aux inhibiteurs de BRAF via la régulation de Mcl-1.** Le ciblage concomitant de MEK et de la voie IGF-R/PI3K constitue une altérative thérapeutique intéressante dans la lutte contre la résistance aux inhibiteurs de BRAF.

1.2.2.2.4. Régulation de la chromatine

Les mutations sont des évènements rares et le temps nécessaire pour développer une résistance est long. Pour expliquer les phénomènes de résistance développés à court terme, le concept de « tolérance au médicament » avant l'acquisition d'une résistance permanente a été avancé. La tolérance est un état réversible où les cellules tolérantes peuvent revenir à un état « sensible ». Ainsi, plus les cures se multiplient plus il y a un risque que les cellules développent une mutation secondaire et que des cellules résistantes soient sélectionnées.

Cet état de tolérance réversible est lié à une élévation de l'expression de l'IGF1-R et à un remodelage de la chromatine, favorisé par une augmentation de l'expression du JARID1A, une histone déméthylase¹¹². Les cellules de mélanome sont connues pour leur plasticité et une thérapie ciblée peut entraîner une régulation adaptative de la chromatine et contribuer à l'acquisition d'une résistance.

1.3. Les stratégies thérapeutiques dirigées contre NRAS et BRAF

1.3.1. Les inhibiteurs de l' Heat Shock Protein 90 (Hsp90)

La protéine Heat Shock 90 (Hsp90) est une protéine chaperonne qui régule la stabilité, l'activation et la dégradation de ses protéines clientes. Ces protéines clientes sont CRAF, ERB-B2, BCR-ABL, CDK4, AKT, p53 mutant, MET, h-TERT et HIF-1 α .

Plusieurs inhibiteurs sont en cours de développement dont le 17-allylamino-17demethoxygeldanamycine (17-AAG) qui inhibe HSP90 ce qui conduit à la dégradation de nombreuses protéines clientes par la voie du protéasome.

Il a été démontré que BRAF^{V600E} est une protéine cliente de Hsp90. Les cellules exposées à un inhibiteur de l'Hsp90 présentent une déplétion en BRAF^{V600E} mais pas de BRAF^{WT}.

Une étude préclinique a cherché à déterminer s'il existe un lien entre le statut mutationnel de BRAF et NRAS et la sensibilité au 17-AAG chez les patients atteints de mélanome. Sur douze patients traités, aucun n'a présenté de réponse complète ou partielle. Le patient qui a le mieux répondu avait un phénotype NRAS^{G13D}/BRAF^{WT} (TTP de quarante-neuf mois), un autre de phénotype NRAS^{WT}/BRAF^{V600E} avait un TTP de quinze mois et celui qui a le moins bien répondu avait un phénotype NRAS^{WT}/BRAF^{WT} (TTP de un mois) (Cf Annexe). Cependant, cette étude n'a été réalisée que sur un très petit nombre de patients et permet juste de constater que les patients qui ont le mieux répondu ont une mutation NRAS^{G13D} ou BRAF^{V600E}.¹¹³

Une étude de phase II a été menée afin d'étudier de manière plus approfondie le lien entre la sensibilité au 17-AAG et le statut mutationnel des deux kinases¹¹⁴. Vingt-et-un patients ont été inclus et quinze ont été évalués. Parmi ces quinze patients, six étaient de « type sauvage » et neuf présentaient une mutation de BRAF. Quelque soit le groupe de patient traité, aucun n'a présenté de réponse complète ou partielle. Un patient est resté dans un état stable pendant la durée du traitement, tous les autres ont progressé (Cf Annexe). Les auteurs observent bien une diminution des kinases RAF, de phospho-ERK et de CDK4 dans les échantillons de biopsies, mais cet effet n'est que transitoire. Il y a bien un effet biologique du 17-AAG mais à court terme. D'autres études pourraient être menées avec un inhibiteur de l'Hsp90 plus puissant et administrable de façon chronique, entraînant une inhibition prolongée de la voie des MAPK.

1.4. Les inhibiteurs de MEK

Les inhibiteurs de BRAF sont une option thérapeutique très intéressante mais le développement de résistance contre ces molécules ou leur effet délétère dans les tumeurs BRAF^{WT} a conduit à rechercher d'autres cibles thérapeutiques.

MEK 1/2 constitue une cible intéressante dans sa position clé dans la voie des RAS/RAF/MEK/ERK. De plus, aucun effet d'activation paradoxal par les inhibiteurs de MEK n'est connu à ce jour, à la différence des inhibiteurs de BRAF.

1.4.1. Le selumetinib (AZD6244)

Le selumetinib est un inhibiteur allostérique ATP non-compétitif de MEK1/2 qui montre une activité antitumorale dans le mélanome en études précliniques¹¹⁵. Il inhibe notamment la croissance cellulaire de cellules BRAF^{V600E}^{116, 117}. Deux autres inhibiteurs de MEK ont été testés en essais cliniques. Le CI-1040 montre une activité anti-tumorale insuffisante pour permettre son développement¹¹⁸ et le développement d'un inhibiteur de seconde génération, le PD0325901, a été arrêté.

Une étude de phase I a été réalisée chez cinquante-sept patients dont vingt atteints de mélanome. Dix-neuf d'entre eux ont présenté un état stable à la fin du deuxième cycle de traitement et neuf ont montré une amélioration de la SD de plus de cinq mois (Cf Annexe). Cette étude a aussi évalué l'impact d'une mutation de BRAF, NRAS ou KRAS sur la réponse au traitement et a montré que l'étude est plus longue chez les patients qui portent une mutation que chez ceux qui n'en portent pas. Cependant, le faible nombre de patients inclus ne permet pas de conclure quant à l'importance d'une mutation dans la réponse au traitement¹¹⁹.

Ces résultats encourageants ont conduit à réaliser une étude de phase II¹²⁰. Celle-ci a comparé l'efficacité du selumetinib administré par voie orale, par rapport à un traitement de référence, le témozolomide, chez des patients n'ayant pas reçu de traitement de chimiothérapie et à un stade avancé de la maladie. Le témozolomide (TMZ) a été choisi comme référence car il possède une AMM dans le traitement du mélanome dans plusieurs pays et qu'il a le même métabolite actif que la dacarbazine. Après analyse des résultats, aucune PFS n'est observée dans chacun des deux bras. Le nombre de patients en rémission partielle confirmée est de 5,8% (6/104) dans le bras « selumetinib » et de 9,4% (9/96) dans le bras contrôle. Aucune rémission complète n'est observée quel que soit le groupe de patients. Quarante huit patients (46,2%) présentent un état stable pendant plus de six mois avec le selumetinib contre trente-six patients (37,5%) traités par le TMZ.

Cette étude a aussi analysé l'impact d'une mutation BRAF ou NRAS sur la réponse au traitement. Les auteurs ont pu constater qu'il n'existe pas de différence significative entre les PFS de patients BRAF muté et les patient BRAF « type sauvage ». Chez les patients avec un phénotype BRAF muté, le taux de réponse au traitement par selumetinib est de 11,1% (5/45) et de 10,7% (3/28) lorsqu'ils ont reçu du TMZ (Cf annexe).

Suite à ces résultats, les auteurs concluent qu'il n'existe pas de différence significative entre un traitement par selumetinib seul ou un traitement par TMZ dans la population générale tout comme dans les sous-populations de patients avec une mutation BRAF ou mutés BRAF/NRAS.

1.4.2. Vers une utilisation optimale des inhibiteurs de MEK ?

1.4.2.1. Les inhibiteurs de MEK et les mélanomes BRAF^{V600E}

De nombreuses équipes ont montré qu'une mutation de BRAF augmente la sensibilité aux inhibiteurs de MEK^{121, 122, 123}. Les travaux de Solit et *al.* ont notamment montré que les cellules BRAF^{WT}/RAS présentent une résistance au CI-1040, un inhibiteur non-compétitif de MEK1/2 alors que les cellules qui portent une mutation BRAF y sont sensibles¹²². De même, le traitement par CI-1040 diminue la concentration en cycline D dans les cellules mutées BRAF. Cette diminution s'accompagne d'une inhibition de la phosphorylation de la protéine Rb, un arrêt du cycle en phase G1

et une apoptose de la plupart de ces cellules. Ceci suggère que l'inhibition de MEK dans un contexte de mutation de BRAF exerce un effet cytotoxique et cytostatique. En revanche, le CI-1040 n'a pas d'effet sur l'expression de la cycline D1 dans la plupart des cellules RAS/BRAF^{WT}.

Ces mêmes auteurs ont réalisé des essais *in vivo* et montrent que l'utilisation du PD0325901, un autre inhibiteur de MEK, permet de réduire la croissance tumorale de tumeur BRAF^{V600E} dans des modèles de xénogreffes de souris. Il permet aussi de réduire la croissance tumorale de tumeur mutée pour NRAS, mais à des concentrations plus élevées. En revanche, aucune régression n'est observée lorsque les cellules injectées sont de « type sauvage ». Ainsi, on peut dire que l'efficacité clinique des inhibiteurs de MEK dépend du statut mutationnel BRAF de la tumeur *in vitro* et *in vivo*.

Il semble donc intéressant d'optimiser l'effet du selumetinib en l'associant à d'autres molécules de chimiothérapie. Les résultats préliminaires d'essai de phase I sur les combinaisons « selumetinib plus dacarbazine, docétaxel ou temsirolimus » ont démontré des réponses objectives chez cinq patients sur neuf avec des tumeurs à mutation BRAF positives.

1.4.2.2. Les inhibiteurs de MEK et les mélanomes mutés sur GNAQ et GNA11

Les cellules de mélanome de l'uvée se caractérisent par des mutations de GNAQ et GNA11 et expriment fortement ERK phosphorylé. Quand elles sont traitées avec de l'AZD6244, les cellules GNAQ^{WT} sont résistantes alors que les cellules GNAQ^{Q209L} sont très sensibles, avec une IC50 de 100-250nmol/L¹²⁴.

Romano et *al.* ont analysé les résultats cliniques d'essais réalisés chez des patients atteints de mélanome de l'uvée et traités par de l'AZD6244¹²⁵. Vingt patients ont été randomisés dans une première étude de phase II. Dix-sept ont reçu de l'AZD6244, soit après un premier traitement au TMZ soit en première ligne. La PFS moyenne est de cinquante jours chez les patients ayant déjà reçu du TMZ et de cent-quatorze jours chez les patients traités par l'AZD6244 en première intention. D'une manière générale, les auteurs ont recensé vingt-trois patients atteints de mélanome de l'uvée sur l'ensemble des études réalisées avec l'AZD6244. Le statut GNAQ a été établi chez douze d'entre eux, quatre avaient une mutation GNAQ^{Q209L} et huit étaient GNAQ^{WT}. Romano et *al.* concluent que le nombre de patients inclus est insuffisant pour prouver le bénéfice clinique de l'AZD6244 dans le traitement du mélanome de l'uvée. Une nouvelle étude de phase II est actuellement en cours. Elle compare l'efficacité du TMZ versus l'AZD3244 chez des patients GNAQ et GNA11 « type sauvage » ou mutés et atteints de mélanome de l'uvée.

2. Développement de molécules modulant le cycle cellulaire

Comme il a été décrit précédemment, le développement et la progression de mélanome peuvent se faire par la perte de contrôle du cycle cellulaire par la protéine p16INK4A. Normalement, p16 se lie et bloque la fonction des CDK4 et 6. Celles-ci ne peuvent se lier à la cycline D pour phosphoryler la protéine Rb ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Des mutations sur le gène p16 et/ou des pertes d'expression de ce gène se retrouvent dans 10 à 40% des mélanomes ce qui conduit à une prolifération cellulaire, à une absence de sénescence et à une augmentation du nombre de mutations génétiques liées à une mauvaise réparation de l'ADN en phase G1/S.

2.1. Les inhibiteurs de cycline dépendent kinases (CDK)

Le flavopiridol est un inhibiteur ATP-compétitif de CDKs et particulièrement des CDK1, 2 et 4. Une étude *in vitro* réalisée par Robinson et *al.* a montré que les cellules qui n'expriment pas p16 sont plus sensibles au flavopiridol que les cellules qui expriment cette protéine (l'IC50 est de 12,5nM dans les cellules p16- et de 25nM dans les cellules p16+). Ils montrent aussi qu'aux concentrations correspondant aux IC50, l'effet sur la croissance cellulaire est essentiellement dû à un arrêt du cycle cellulaire. L'apoptose des cellules n'est observée qu'à une dose beaucoup plus forte de 200nM. A cette concentration, ils constatent une diminution de l'expression de la protéine Rb, du facteur E2F et du facteur anti-apoptotique Bcl-2 dans la plupart des lignées cellulaires de mélanome étudiées¹²⁶.

Ces résultats ont conduit à des essais cliniques chez l'homme. Une étude de phase II a été réalisée par Burdette-Radoux et *al.* chez des patients atteints de mélanome métastatique et réfractaires aux traitements standards. Malgré le traitement par flavopiridol, aucun patient ne présente de réponse objective au traitement. La meilleure réponse observée est un état stable chez sept patients (44%) après deux cycles de traitement. Les auteurs concluent qu'en dépit des résultats *in vitro* encourageants, le flavopiridol ne présente pas d'intérêt clinique en monothérapie (Cf Annexe). Ils l'expliquent par le fait que dans le mélanome, 10% à 15% des patients répondent au traitement grâce à une réaction du système immunitaire. Or, le flavopiridol entraîne une lymphopénie et une immunodépression qui peuvent inhiber la réponse immune anti-tumorale dans ce groupe de patients. De plus, ils ont constaté que les cellules cancéreuses développent une résistance à ce médicament. Elle est due à une surexpression d'ATP-binding protéines et de cycline E dans les cancers du sein et du colon par exemple. Enfin, la faible efficacité du flavopiridol peut aussi être liée à sa toxicité qui ne permet pas d'administrer des doses suffisantes pour permettre une efficacité optimale¹²⁷.

Cependant, les inhibiteurs de CDK peuvent avoir un intérêt en poly-chimiothérapie. En effet, des aberrations de BRAF et de p16INK4A coexistent souvent dans les cellules de mélanome bien que leur mécanisme d'interaction soit méconnu. Zhao et *al.* ont évalué le rôle de BRAF et de p16INK4A

sur la croissance cellulaire et l'induction de l'apoptose¹²⁸. Ils montrent que l'inhibition de BRAF par un ARN interférent associée à l'expression de p16INK4A dans des cellules de mélanome, inhibe la croissance cellulaire de manière plus efficace que les cellules où seul BRAF est inhibé ou seul p16INK4A est exprimé. En effet, CDK4/6 peuvent aussi être activée via la voie des MAPK. Ainsi l'inhibition de BRAF « aide » l'action de p16INK4A en réduisant l'activité basale du complexe cycline D-CDK4/6. De plus, ces mêmes auteurs ont constaté que l'inhibition de BRAF est corrélée à une augmentation du taux de protéine p27KIP1. Cette protéine est aussi impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et régule négativement le complexe cycline E/CDK2. Ainsi, l'inhibition de BRAF associée à l'expression de p16INK4A conduit à l'inhibition de la phosphorylation de Rb aux niveaux des deux sites CDK2 et CDK4/6 ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire.

Par ailleurs, Zhao et *al.* montrent que dans ces mêmes cellules de mélanome où BRAF est réprimé et p16INK4A exprimé, il y a une augmentation de la concentration en facteur pro-apoptotique Bim et une diminution en facteur anti-apoptotique Bcl-2. Ainsi, en plus d'une inhibition de la croissance cellulaire, l'inhibition de BRAF associée à l'induction ou la restauration des fonctions de p16INK4A favorise l'apoptose des cellules de mélanome.

2.2. La bryostatine

La bryostatine a des effets biologiques pléiotropes par son effet agoniste partiel de la protéine kinase C (PKC). Elle peut inhiber les cyclines-dépendent kinases, activer les lymphocytes, favoriser l'expression des récepteurs à l'interleukine 2 et induire la sécrétion de cytokines telles que le TNF- α ou l'interleukine 6.

Plusieurs études de phase II ont été menées pour rechercher l'efficacité clinique de la bryostatine dans le mélanome. L'étude de Propper et *al.*, a consisté à administrer de la bryostatine à des patients atteints de mélanome métastatique et préalablement traités par chimiothérapie¹²⁹. Sur les quinze patients évalués, quatorze ont dû arrêter le traitement car la maladie progressait. Le seul patient restant a présenté un état stable pendant neuf mois après le traitement mais a dû être retiré du protocole pour cause de myalgie après six cures (Cf Annexe). L'utilisation de la bryostatine en monothérapie et selon le schéma de l'étude, ne présente pas d'intérêt clinique chez des patients déjà traités par chimiothérapie. Les raisons avancées pour expliquer cet échec sont le temps de demi-vie court de cette molécule et le fait que son effet anti-tumoral soit potentialisé lorsque la bryostatine est administrée sur une longue période. De plus, l'expression des isotypes de la PKC peuvent varier d'une tumeur à une autre et elles ne sont pas toutes également dérégulées par la bryostatine. Ces isotypes peuvent agir comme des oncogène ou comme des gènes suppresseurs de tumeur, selon le type de tumeur. Ainsi, l'effet clinique de la bryostatine est un mécanisme complexe. De plus, dans cette étude, les patients ont déjà reçu des traitements de chimiothérapie et quatre d'entre eux ont aussi reçu une radiothérapie. Il

est donc vraisemblable que ces traitements ont entraîné une immunosuppression ce qui empêche la bryostatine d'agir par un mécanisme immunitaire¹²⁹.

L'étude de phase II réalisée par Tozer et *al.* compare deux schémas d'administration de la bryostatine chez des patients atteints de mélanome métastatique et n'ayant pas reçu de traitement préalable¹³⁰. Quinze patients sont inclus dans le bras A et reçoivent 25 µg/m²/semaine. Quinze autres patients sont inclus dans le bras B et reçoivent 60µg/m²/semaine. Parmi les patients du bras A, trois sont restés stables. Aucun ne présente de réponse complète ou partielle au traitement et les douze patients restant ont une progression de leur maladie. Dans le bras B, quatre patients ont une SD et onze ont une progression de leur maladie (Cf Annexe). Ainsi, comme dans l'étude précédente, les schémas thérapeutiques testés ici ne permettent pas d'obtenir une efficacité clinique.

Cependant, certaines études montrent que la bryostatine permet de moduler la résistance multi-drogue (MDR)^{131, 132}. Ainsi, si la bryostatine n'a pas d'efficacité en monothérapie, une utilisation combinée avec d'autres molécules efficaces dans le mélanome pourrait optimiser la prise en charge thérapeutique.

3. Développement de molécules dirigées contre des éléments de la voie des PI3K/AKT/mTOR

Comme nous l'avons vu précédemment, la voie des PI3K/AKT/mTOR est souvent activée dans les mélanomes. Cette activation peut être la conséquence d'une inactivation du gène suppresseur de tumeur PTEN ou d'une surexpression d'AKT ce qui favorise la survie, la prolifération et l'invasion cellulaire.

3.1. La perifosine

Afin d'inhiber la voie des PI3K/AKT/mTOR, une première stratégie a consisté à inhiber AKT. La perifosine est un inhibiteur de cette kinase. Elle inhibe sa phosphorylation et l'empêcher de migrer vers la membrane.

Une étude de phase II réalisée par Ernest et *al.* a recherché si l'inhibition d'AKT était une stratégie thérapeutique intéressante. Elle a inclus dix-huit patients atteints de mélanome métastatique et réfractaire aux traitements habituels. Aucune réponse objective n'a été observée chez aucuns des dix-huit patients inclus. Trois patients ont présenté un état stable après deux cycles et onze ont vu leur

maladie progresser malgré le traitement. Cette étude conclut à l'inefficacité de la perifosine en monothérapie dans le traitement du mélanome¹³³ (Cf Annexe).

Par ailleurs, le RX-0201, un oligonucléotide complémentaire de l'ARNm codant pour AKT-1 est actuellement en cours d'étude^{134, 135}. Des études *in vitro* ont montré que cette molécule réduit l'expression de l'ARNm d'AKT et inhibe l'expression de la protéine correspondante. Des études pharmacologiques ont aussi montré que le RX-0201 inhibe la prolifération cellulaire de plusieurs carcinome et notamment le mélanome. *In vivo*, il inhibe de manière significative la croissance tumorale dans des modèles de cancer de la prostate et du cerveau chez la souris Nude¹³⁴.

3.2. Les inhibiteurs de mTOR

Une autre stratégie consiste à inhiber l'une des cibles d'AKT, mTOR. mTOR est une kinase qui occupe un rôle central dans la signalisation induite par les récepteurs aux facteurs de croissance et qui a un effet important sur la croissance cellulaire et la survie. Il peut former deux complexes, mTORC1 et mTORC2. mTORC1 est composé de la sérine thréonine kinase mTOR, de la protéine de régulation raptor et de mLST8/GβL. L'activation du complexe mTORC1 conduit à la phosphorylation et à l'activation de p70 S6kinase (S6K) et à l'inhibition de *l'eukaryotic initiation factor 4E-binding protein* (4EBP1). Sous forme déphosphorylée, 4EBP1 est lié au facteur d'initiation de la traduction eIF-4E ce qui inhibe la traduction. Lorsque mTORC1 est activé, la phosphorylation de 4EBP1 entraîne la dissociation du complexe 4EBP1/eIF-4E, ce qui favorise la formation du complexe d'initiation de la traduction. Le complexe mTORC2 est aussi composé de mTOR et de mLST8/GβL, mais aussi de deux protéines de régulation, rictor et mSin-1. Il est impliqué dans la régulation du cytosquelette d'actine.

3.2.1. Le temsirolimus (CCI-779)

Le temsirolimus est un inhibiteur de la kinase mTOR, dérivé du sirolimus. Les médicaments de cette classe empêchent la progression du cycle cellulaire en se liant à la *FK506-binding protein-12* (FKBP12) pour former un complexe qui interagit avec mTOR. Il en résulte une inhibition du signal de transduction nécessaire à la progression du cycle cellulaire. Il est important de noter que contrairement à la rapamycine, qui inhibe aussi l'activité de mTOR, le temsirolimus n'est pas d'activité immunosuppressive aux doses et aux schémas de prise conférant une activité anti-tumorale.

Des études précliniques ont montré que des lignées cellulaires de mélanome peuvent être inhibées par le CCI-779 et qu'il a une activité anti-tumorale dans des modèles animaux,. Une étude de phase II a été menée pour confirmer ce résultat chez l'homme¹³⁶. 250mg de temsirolimus sont administrés de façon hebdomadaire à trente-trois patients à un stade avancé de mélanome. L'analyse des résultats donne une PFS de dix semaines et une survie globale médiane de cinq mois. Un patient

présente une réponse partielle pendant deux mois, tous les autres progressent malgré le traitement (Cf Annexe). **Les auteurs concluent que le temsirolimus utilisé à cette dose et selon ce schéma ne permet pas d'avoir une activité anti-tumorale suffisante.**

D'autres études ont cherché à mettre en évidence l'efficacité du temsirolimus en association avec des molécules de chimiothérapie classique. L'une d'entre elles a testé l'efficacité de la combinaison « temsirolimus plus cisplatine ». Les auteurs partent du fait que le complexe mTOR est impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Beaucoup de tumeurs ont une sensibilité à l'apoptose. Cette propriété est utilisée par les molécules de chimiothérapie, comme le cisplatine, qui créent des dommages à l'ADN et entraînent la destruction des cellules tumorales par apoptose. Ainsi l'utilisation concomitante d'un agent réduisant les mécanismes de réparation de l'ADN (le temsirolimus) et d'un agent de dommage à l'ADN (le cisplatine) constitue une stratégie thérapeutique intéressante. Les conclusions de cette étude montrent que le CCI-779 accroît la sensibilité au cisplatine en favorisant l'inhibition de la croissance tumorale induite par celui-ci. L'association permet de détruire quatre lignées de mélanome humaines sur six dans des modèles de souris SCID. L'analyse des résultats montrent que le temsirolimus n'induit pas l'apoptose à lui seul, mais augmente la sensibilité à l'apoptose des cellules de mélanome, induite par le cisplatine. Il exerce aussi une activité anti-proliférative en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1¹³⁷.

Dans le même objectif, une autre étude a comparé l'efficacité de la combinaison « temsirolimus plus dacarbazine » par rapport à la dacarbazine (DTIC) seule. La dacarbazine est agent alkylant qui crée des dommages à l'ADN. Les auteurs montrent, ici aussi, que l'association « temsirolimus plus DTIC » a un effet anti-néoplasique supérieur à celui de la dacarbazine seule, dans la plupart des lignées de mélanome humaines testées chez la souris SCID. Une analyse approfondie montre que l'association est efficace dans les lignées qui ont un fort taux de mTOR phosphorylé (p-mTOR). En revanche, elle a la même efficacité que la dacarbazine seule dans les lignées qui expriment faiblement p-mTOR¹³⁸.

Ces deux études nous montrent que, bien que le temsirolimus ait peu d'intérêt en monothérapie, son utilisation avec des agents de chimiothérapie induisant des dommages à l'ADN peut constituer une stratégie thérapeutique intéressante.

3.2.2. L'everolimus (RAD-001)

L'everolimus comme de temsirolimus est un inhibiteur de mTOR. Comme précédemment, une étude de phase II est en cours pour rechercher l'efficacité de l'everolimus chez des patients atteints de mélanome métastatique. Les résultats préliminaires montrent que les vingt-quatre patients inclus ont une PFS de trois mois. Aucune réponse objective n'est observée et sept patients présentent un état

stable après traitement. Les auteurs concluent au bénéfice clinique de l'everolimus dans le traitement du mélanome¹³⁹ (Cf Annexe).

D'autre part, Hainsworth et *al.* ont recherché l'intérêt clinique de l'association « everolimus plus bevacizumab »¹⁴⁰. Ces auteurs partent du constat que, d'une part, la voie du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) est souvent surexprimée dans le mélanome métastatique et qu'un taux sérique élevé en VEGF est un facteur de mauvais pronostic. D'autre part, l'everolimus est un inhibiteur de mTOR, il va donc avoir des répercussions sur de nombreuses voies et induit notamment la sous-expression du récepteur au VEGF (VEGFR). Ainsi, l'utilisation concomitante de l'everolimus et d'un inhibiteur du VEGF, le bévazumab, semble être une stratégie intéressante. Dans leur étude, Hainsworth et *al.* ont inclus cinquante-sept patients atteints de mélanome métastatique qui ont reçus chacun deux cycles de traitement (six semaines). Sept d'entre eux (12%) présentent une réponse optimale avec un patient en réponse complète et six patients en réponse partielle. De plus, vingt-trois patients présentent un état stable selon les critères RECIST. La PFS médiane est de quatre mois et la survie globale médiane est de 8,6 mois (Cf Annexe).

Ainsi, dans cette étude, l'association « everolimus plus bevacizumab » montre une activité anti-tumorale intéressante bien qu'elle soit modeste. On sait qu'il existe des connexions entre la voie des MAPK et celle des PI3K/AKT. Une activation de la voie des MAPK est souvent accompagnée de l'activation de la voie des PI3K/AKT. De plus, l'inhibition de mTOR peut induire une activation des MAPK via une boucle de régulation dépendante des PI3K. On peut donc supposer qu'une inhibition concomitante des PI3K/AKT et des MAPK augmente l'efficacité du traitement des patients dans le mélanome.

4. Développement de molécule dirigée contre le récepteur c-KIT : l'imatinib

L'imatinib est une petite molécule inhibitrice des tyrosines kinases KIT, Abl et du récepteur au *platelet-derived growth factor* (PDGF) α et β . Il est utilisé avec succès dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) et les tumeurs gastro-intestinales stromales (GIST).

Les cellules de mélanome expriment le récepteur C-KIT, le PDGF-R et Abl et il a été montré que C-KIT est fréquemment muté ou amplifié dans les mélanomes acraux ou muqueux. Ces différents récepteurs jouent un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire et la survie par l'activation de différentes voies de signalisation. On peut donc penser que l'imatinib, par son action inhibitrice sur des récepteurs à activité tyrosine kinase, diminue la viabilité cellulaire et inhibe la prolifération des cellules de mélanome⁷².

Cette hypothèse a été testée en essai de phase II chez des patients atteints de mélanome métastatique non sélectionnés. Ugurel et *al.* montrent alors que chez les seize patients évalués, aucun ne présente de réponse objective. Un seul présente une stabilisation de sa maladie pendant 2,6 mois. Les quinze autres patients progressent après deux à huit semaines de traitement. La survie globale dans la population *per protocole* est de 4,2 mois. Les auteurs concluent que, dans cette étude, l'imatinib n'est pas efficace dans le traitement du mélanome. De plus, en dépit de l'hétérogénéité de leurs profils d'expression, toutes les cellules de mélanome testées pour un essai *in vitro* anti-prolifératif ne sont pas sensibles à l'imatinib. Ainsi, les auteurs concluent qu'il n'y a pas de corrélation entre le profil d'expression des récepteurs et une inhibition de croissance *in vitro* par l'imatinib. Ugurel et *al.* expliquent cet échec par le fait que la population testée n'a pas été sélectionnée et que l'imatinib pourrait être efficace pour une sous-population de patient. Cependant, l'échantillon de seize patients est trop petit pour pouvoir mettre en évidence une efficacité¹⁴¹.

L'étude de phase II de Kim et *al.* tirent les mêmes conclusions. Sur vingt-et-un patients traités par imatinib, quatre présentent une SD d'une durée maximale de douze semaines et un seul patient présente une réponse partielle au traitement durant 12,8 mois. Le temps moyen jusqu'à progression est de 1,4 mois et la survie globale médiane est de 7,5 mois. Ici aussi, les auteurs expliquent que l'efficacité du traitement dépend de la population traitée et qu'une sélection plus stricte des patients pourrait donner de meilleurs résultats. Ils montrent aussi qu'il n'existe pas de corrélation entre le statut mutationnel de C-KIT et la réponse au traitement. Par ailleurs, ils évoquent la possibilité qu'une mutation de BRAF puisse rendre les patients résistants au traitement par imatinib. En effet, BRAF est un effecteur des récepteurs kinases et une mutation activatrice de BRAF permet de compenser l'inhibition du récepteur par l'imatinib. Kim et *al.* suggèrent alors qu'une utilisation de l'imatinib avec un inhibiteur de BRAF ou une sélection des patients qui n'ont pas de mutation de BRAF pourrait donner des résultats cliniques intéressants¹⁴².

Plus récemment une étude de phase II a été réalisée sur une population ciblée. Elle a inclus des patients atteints de mélanome métastatique avec une mutation de C-KIT sur les exons 9, 11, 13, 17 et 18 ou une amplification du nombre de copie du gène C-KIT¹⁴³. Sur les quarante-trois patients inclus, vingt-et-un avaient un mélanome acral et onze un mélanome muqueux. Après analyse, les auteurs ont conclu à une réponse partielle chez dix patients, un état stable chez treize autres et une progression de la maladie chez vingt patients. Dix-huit patients ont présenté une régression de leur masse tumorale. La PFS médiane est de 3,5 mois et elle est plus longue chez les patients avec une mutation de l'exon 11 ou de l'exon 13. L'OS médiane est 14 mois. D'une manière générale, l'analyse montre que les patients avec une mutation sur l'exon 11 ou sur l'exon 13 répondent mieux à l'imatinib.

Les auteurs concluent donc qu'un traitement dirigé contre C-KIT chez des patients atteints de mélanome métastatique avec une mutation de ce récepteur ou une amplification du gène

correspondant est efficace. Ainsi, une sélection des patients selon leur statut mutationnel ou leur profil d'expression de C-KIT permet d'optimiser la prise en charge thérapeutique. Des mutations de C-KIT ont pu être détectées sur plusieurs exons en plus des exons 11 et 13 mais seules les mutations sur ces deux derniers exons sont prédictives d'une réponse au traitement.

Partie 4 : Exemple d'une classification moléculaire dans de mélanome

Après analyse des différentes mutations rencontrées dans le mélanome et de leur implication dans le développement de celui-ci, l'équipe de Shrager a proposé un modèle moléculaire de maladie (*Molecular Disease Model* (MDM)) pour le mélanome¹⁴⁴. Ce modèle répertorie les différents sous-types moléculaires et propose des traitements correspondants. Les sous-types sont définis par rapport aux gènes clés et aux voies de signalisation impliqués dans la mélanogénèse et leur combinaison. Chaque sous-type est rattaché à un oncogène ou à un gène suppresseur de tumeur.

Les Tableau 4 et Tableau 5 présentent ces différents types. Les auteurs considèrent que les oncogènes du Tableau 4 peuvent être des oncogènes dominants et sont des points d'intervention thérapeutique intéressants. En revanche, les oncogènes présentés dans le Tableau 5 jouent un rôle support et doivent coexister avec un des oncogènes du Tableau 4.

Sous-types	Voies de signalisation	Gène clé/biomarqueur	Traitement potentiel
1.1	MAPK	BRAF	Inhibiteurs de BRAF, inhibiteurs de MEK, inhibiteurs de l'Hsp90
1.2		BRAF/PTEN	Inhibiteurs de BRAF, inhibiteurs des PI3K, inhibiteurs d'AKT et mTOR
1.3		BRAF/AKT	Inhibiteurs de BRAF, inhibiteurs d'AKT et mTOR
1.4		BRAF/CDK4	Inhibiteurs de BRAF et inhibiteurs de CDK
2.1	C-KIT	C-KIT	Imatinib et autres inhibiteurs de C-KIT
3.1	GNAQ GNA11	GNAQ	Inhibiteurs de MEK
3.2		GNA11	Inhibiteurs de MEK
4.1	NRAS	NRAS	Inhibiteurs des MAPK et PI3K, inhibiteurs de la farnésyl transférase
5.1	MITF	MITF	Inhibiteurs de l'HDAC

Tableau 4 : Principaux sous-types moléculaires dans le mélanome¹⁴⁴.

Sous-type	Voies de signalisation	Gène clé/biomarqueur	Traitement potentiel
6.1	AKT/PI3K	PTEN	Inhibiteurs de PI3K, inhibiteurs d'AKT et mTOR
6.2		AKT	Inhibiteurs d'AKT et mTOR
6.3		PI3K	Inhibiteur de PI3K, inhibiteurs d'AKT et mTOR
7.1	CDK	ARF/INK4A	Inhibiteur de CDK
7.2		CDK4	Inhibiteur de CDK
7.3		CCND1/Cycline D1	Inhibiteur de CDK
8.1	P53/BCL	Bcl-2	TBD
8.2		P53	TBD

Tableau 5 : Sous-types secondaires dans le mélanome¹⁴⁴.

1. Le sous-type 1

Le sous-type 1 présente des aberrations de la voie des MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), seules ou combinées avec des altérations d'autres voies comme celle des PI3K/AKT ou CDK. La voie des MAPK fait intervenir différentes molécules : RAS, RAF, MEK et ERK. L'activation successive de ces différents composés conduit à l'activation de plusieurs gènes impliqués dans la survie et la prolifération.

1.1. Le sous-type 1.1

Le sous-type 1.1 concerne les mutations de BRAF, mutée dans 40 à 70% des mélanomes. 80% d'entre elles sont des mutations V600E (modification d'une valine en acide glutamique en position 600). Plusieurs types d'inhibiteurs peuvent être utilisés dans ce sous-type, les inhibiteurs de BRAF, de MEK ou encore de l'Hsp90. Comme nous l'avons vu précédemment, les inhibiteurs pan-kinases ont été les premiers à être utilisés en essais cliniques. Malheureusement, leur faible activité clinique, que ce soit en monothérapie ou en polychimiothérapie, n'ont pas permis leur développement dans cette pathologie. Des inhibiteurs spécifiques de BRAF muté V600E, tel que le vémurafénib, ont ensuite été développés et donnent de meilleurs résultats cliniques, qu'ils soient utilisés seuls ou en association. Cependant, la rechute rapide des patients nécessite de connaître précisément quels sont les mécanismes de résistance mis en jeu et quels sont les moyens de les contourner. Dans cette objectif, il est nécessaire de rechercher l'efficacité du vémurafénib en association avec d'autres types d'inhibiteur et notamment les inhibiteurs de MEK ou de développer de nouvelles molécules qui inhibent les mécanismes de résistance.

1.2. Les sous-types 1.2 et 1.3

Les sous-types 1.2 et 1.3 regroupent les anomalies de la voie des MAPK et des PI3K/AKT. Bien que les traitements actuels ne se concentrent que sur une seule anomalie ou sur une seule voie de signalisation, il semble de plus en plus évident que le mélanome nécessite l'activation de plusieurs voies pour se développer et métastaser. De nombreuses interactions existent entre la voie des MAPK et celle des PI3K/AKT. On remarque notamment que 1) les mutations de BRAF sont souvent accompagnées d'une perte de PTEN ou une activation d'AKT⁶⁴, 2) une extinction de PTEN est nécessaire pour la transformation des mélanocytes BRAF-mutés dans des modèles de souris¹⁴⁵ et 3) une inhibition pharmacologique des deux voies est efficace dans des modèles pré-cliniques¹⁴⁶. Il existe plusieurs cibles thérapeutiques dans ces deux voies. Dans ces sous-types, l'utilisation concomitante d'inhibiteurs des MAPK et des PI3K/AKT semble être la stratégie thérapeutique la plus pertinente.

1.3. Le sous-type 1.4

Le sous-type 1.4 regroupe les aberrations des voies des MAPK et des CDK, principalement l'activation de BRAF et la surexpression du complexe CCND1/Cycline D. On pense que les CDK favorisent la formation de métastases des mélanomes mutés pour BRAF. Curtin et *al.* ont montré que les mélanomes primaires dérivant d'une zone exposée au soleil (*chronically sun-damages skin, CSD*) ou de site muqueux qui généralement ne présentent pas de mutation de BRAF ou de NRAS, ont une augmentation du nombre de copies de CCND1³⁰. A la différence des mélanomes primaires, plus de 15% des mélanomes métastatiques avec une mutation de BRAF ont une amplification de CCND1. Ces mélanomes sont résistants aux inhibiteurs de BRAF et nécessitent le développement de combinaison « inhibiteurs de MAPK plus inhibiteurs de CDK ».

2. Le sous-type 2

Ce sous-type caractérise les mutations de C-KIT. Le signal induit par ce récepteur à activité tyrosine kinase est transduit via les voies des MAPK, PI3K/AKT et MITF et est impliqué dans la croissance cellulaire, la division et la migration cellulaire.

Le sous-type 2.1 regroupe les mutations de C-KIT que l'on retrouve majoritairement au niveau des mélanomes acraux, muqueux et les CSD mais rarement au niveau des mélanomes de la peau non exposée au soleil⁷². Comme nous l'avons vu précédemment, les premiers essais de phase II réalisés sur une population non sélectionnée sur son statut C-KIT, n'ont pas montré d'intérêt clinique. En revanche, les études réalisées chez des patients présentant une mutation ou une amplification de C-KIT ont donné de meilleurs résultats. Une première étude de phase II présentée au congrès annuel de l'ASCO en 2009 a notamment montré que sur douze patients inclus, deux ont présenté une réponse complète, deux autres une réponse partielle, six ont eu une stabilisation de leur maladie et deux ont progressé. Les auteurs ont constaté que les réponses sont corrélées avec les aberrations de C-KIT, suggérant que la réponse aux inhibiteurs de ce RTK est spécifique du génotype du patient. Ainsi, les patients avec une CR ont soit une mutation sur l'exon 11 (L576P) soit une amplification de C-KIT. Les patients avec une PR présentent aussi soit une mutation L576P sur l'exon 11 soit une mutation sur l'exon 13. Les patients en SD ont une mutation sur l'exon 13 avec ou sans amplification du gène. Enfin les patients qui ont progressé présentent des mutations connues pour induire une résistance à l'Imatinib dans les GIST. Ces mutations se retrouvent notamment au niveau du site actif de la kinase.

3. Le sous-type 3

Ce sous-type présente les mutations sur les protéines G, GNAQ et GNA11. Les sous-types 3.1 et 3.2 concernent les mutations des gènes de GNAQ et GNA11 respectivement, sur le codon 209 et qui conduit à une activation constitutive de la voie des MAPK. Les mutations de ces protéines concernent surtout les mélanomes de l'uvée. Les mélanomes qui présentent ce type d'anomalie peuvent être pris en charge par des inhibiteurs de MEK.

4. Le sous-type 4

Ce sous-type regroupe les anomalies de RAS. RAS est une petite GTP-ase qui active à la fois la voie des MAPK et la voie des PI3K/AKT pour contrôler l'intégrité du cytosquelette d'actine, la prolifération, la différenciation, l'adhésion cellulaire, l'apoptose et la migration cellulaire.

Le sous-type 4.1 regroupe les aberrations de NRAS, observées dans environ 15% des mélanomes. Deux approches thérapeutiques sont envisagées : la première consiste à bloquer la farnésylation de RAS, mais cette approche n'a pas montré de grand intérêt thérapeutique chez une population de patients non sélectionnés sur leur statut de NRAS. La seconde approche consiste à cibler les éléments situés en aval de NRAS dans les voies des MAPK et des PI3K/AKT.

5. Le sous-type 5

Ce sous-type caractérise les anomalies rencontrées au niveau des voies impliquées dans le développement et la survie. Au sein de ces voies, le facteur de transcription mélanocytaire, le MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*) régule le développement, la différenciation et la maintenance des mélanocytes. Le MITF est activé par la voie des MAPK comme par l'AMPc et conduit à la transcription de gènes impliqués dans la pigmentation, dans la progression du cycle cellulaire et dans la survie. Ainsi, le MITF peut accroître l'activité de Bcl-2 ou induire la transcription de régulateur du cycle cellulaire comme le CDK2.

Le sous-type 5.1 prend en compte les aberrations du MITF. Il a été constaté qu'une amplification du MITF était corrélée à une diminution de la survie globale des patients et à une résistance à la chimiothérapie. Il représente donc une bonne cible thérapeutique⁷⁶. Il est montré que l'expression du MITF est atténuée par des inhibiteurs de l'histone désacétylase (HDAC). Une étude de phase I est actuellement en cours chez des patients atteints de mélanome métastatique et traités par panobinostat (LBH589).

6. Le sous-type 6

Ce sous-type concerne les anomalies sur la voie PI3K/AKT qui joue un rôle crucial dans la prolifération, la croissance, la survie et le métabolisme cellulaire induit par des stimuli externes.

Le sous-type 6.1 regroupent les anomalies liées à PTEN qui régule négativement la voie des PI3K. La perte de PTEN est associée à de nombreux cancer et notamment à 20 à 40% des mélanomes. Le sous-type 6.2 concerne les aberrations d'AKT. Près de 70% des mélanomes primaires et métastatiques présentent une activité d'AKT élevée^{67, 68}. Le sous-type 6.3 se caractérise par les aberrations des PI3K. Les PI3K se divisent en trois familles et parmi elles, la classe Ia, la plus connue et la plus impliquée dans le cancer. L'expression de PI3K est élevée dans le mélanome et est corrélée à un mauvais pronostic.

Il y a trois cibles thérapeutiques possibles pour la voie des PI3K/AKT : AKT, PI3K et mTOR. Les inhibiteurs de mTOR sont les plus développés et s'ils ne présentent pas un grand intérêt en monothérapie, leur utilisation avec des agents de chimiothérapie comme les alkylant représente une solution thérapeutique intéressante.

7. Le sous-type 7

Ce sous-type caractérise les aberrations au niveau des complexes CDK/Cycline, impliqués dans la régulation des différentes étapes du cycle cellulaire.

Le sous-type 7.1 est associé aux aberrations de ARF/INK4A qui code pour p16INK4A, un régulateur du cycle cellulaire, et p14ARF, un régulateur de p53. ARF/INK4A est un locus clé dans les formes familiales de mélanome. Les mutations de ce locus concerne généralement le gène de p16INK4A, seul ou en combinaison avec une mutation de p14ARF, ce qui suggère que p16INK4A est un GST important.

Le sous-type 7.2 concerne les aberrations de CDK4, qui permet le passage de la phase G1 à la phase S par complexation avec la cycline D et phosphorylation de la protéine Rb. Une amplification de CDK4 est relativement commune dans les mélanomes acraux et muqueux.

Le sous-type 7.3 regroupe les aberrations de la cycline D. Elle est souvent impliquée dans le cancer après mutation, surexpression ou amplification. Dans le mélanome, des amplifications de la cycline D sont surtout observées dans les mélanomes acraux lentigineux (44%) et dans une moindre mesure dans les autres types de mélanome⁴¹.

Les tumeurs avec une mutation de p16INK4A peuvent être traitées avec des inhibiteurs de CDK4/6. Il n'y a pour le moment, pas de solution thérapeutique pour les tumeurs mutées p14ARF uniquement.

8. Le sous-type 8

Ce sous-type est associé aux anomalies de la voie intrinsèque de la mort cellulaire régulée par p53. Cette voie est initiée par p53 en réponse à un stress cellulaire et conduit à l'activation des protéines de la famille de Bcl-2 pro-apoptotiques.

Le sous-type 8.1 regroupe les aberrations sur la protéine Bcl-2, un inhibiteur clé de l'apoptose. Cette protéine est surexprimée dans le mélanome^{147, 148} et cette surexpression réduit l'apoptose et la sensibilité des cellules de mélanome aux stimuli pro-apoptotiques.

Le sous-type 8.2 caractérise les aberrations sur le GST p53. Celui-ci est fréquemment muté dans le cancer mais rarement dans le mélanome.

Il n'y a actuellement pas de médicament approuvés ou en essai dans cette catégorie. Seul l'agent anti-apoptotique, l'Oblimersen, un anti-sens de Bcl-2 pourrait donner des résultats.

Conclusion

Le mélanome est la forme la plus agressive de cancer de la peau et son incidence à travers le monde ne cesse de s'accroître. Si les formes précoces de mélanome peuvent être traitées avec succès par chirurgie, il existe peu de traitements efficaces pour les formes avancées. Le mélanome métastatique présente de nombreuses anomalies moléculaires qui peuvent être utilisées comme cible thérapeutique. Aujourd'hui, il semble plus intéressant de déterminer des sous-groupes de patients présentant telle(s) ou telle(s) anomalie(s) plutôt que de considérer le mélanome comme une maladie identique d'un patient à un autre. Actuellement, l'objectif est de développer des traitements « personnalisés » pour un sous-groupe de patients donné de manière à optimiser la prise en charge.

De nombreux agents ont récemment été développés et ciblent notamment la voie des MAPK, des PI3K/AKT/mTOR et les régulateurs du cycle cellulaire. Aucune de ces molécules n'a, jusqu'à présent, amélioré significativement la survie des patients atteints de mélanome métastatique à l'exception du vémurafénib, un inhibiteur de BRAF muté (BRAF^{V600E}), qui améliore la survie de 84% des patients traités. Cependant, l'apparition rapide de résistance conduit à rechercher quels sont les mécanismes développés par les cellules cancéreuses et quels sont les moyens de les contourner. Plusieurs stratégies sont envisageables, le vémurafénib peut être associé à une molécule qui inhibe le mécanisme de résistance ou il peut être utilisé en combinaison avec un agent de chimiothérapie insensible à ce mécanisme de résistance. Par exemple, si la résistance est due à une surexpression du récepteur à l'IGF, il y a une activation de la voie PI3K/AKT bien que BRAF^{V600E} soit inhibé. Ainsi, l'utilisation concomitante du vémurafénib avec un inhibiteur de l'IGFR ou de mTOR permettrait de rétablir la sensibilité au vémurafénib.

Comme nous l'avons vu, les agents de thérapie ciblée ont peu d'efficacité en monothérapie. De nouvelles études cliniques sont actuellement en cours et recherche l'efficacité de ces agents en combinaison avec d'autres agents¹⁴⁹ :

- Vémurafénib et bevacizumab (AcM bloquant dirigé contre le VEGF) chez des patients en stade IV,
- Phase I/II avec Vémurafénib et ipilimumab (AcM anti-CTLA4),
- Temsirolimus et AZD6244 en traitement de première ligne chez des patients en stade IV, mutés BRAF,
- Imatinib et Everolimus,
- Imatinib et bevacizumab en traitement de deuxième ligne,
- Imatinib et temozolomide.

Ces combinaisons font intervenir des molécules qui ciblent les anomalies moléculaires rencontrées dans le mélanome métastatique mais qui utilisent aussi d'autres stratégies, comme l'ipilimumab. Cet anticorps est une IgG1 monoclonale dirigée contre le CTLA4. Il empêche l'interaction du CTLA4, situé sur les lymphocytes T, avec ses récepteurs CD80/CD86, situés sur les cellules dendritiques et inhibe ainsi le signal de co-stimulation négatif. Le blocage de CTLA4 entraîne alors une meilleure réponse immunitaire contre le mélanome.

Les recherches futures devront aussi développer des techniques qui permettent de sélectionner les sous-groupes de patients les plus susceptibles de répondre à un traitement donné. Par exemple, la combinaison de technique comme les puces à ADN, l'analyse mutationnelle des principaux oncogènes par CGH (*Comparative genomic hybridation*) ou encore le séquençage haut débit, pourrait permettre de connaître le profil génétique du patient et d'adapter son traitement par rapport à ce profil.

Ainsi, les traitements contre le mélanome comme ceux de nombreux autres cancers tendent à être de plus en plus personnalisés. On ne peut plus considérer le cancer comme une maladie unique, spécifique d'organe mais comme une pathologie caractérisée par certaines anomalies génétiques et moléculaires.

Bibliographie

1. Elaine N. Marieb Anatomie et physiologie humaine.
2. Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma, *N Engl J Med*. 2006 Jul 6;355(1):51-65.
3. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion, *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1565-70.
4. Sánchez-García I. The crossroads of oncogenesis and metastasis, *N Engl J Med*. 2009 Jan 15;360(3):297-9.
5. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective, *Cancer Res*. 2010 Jul 15;70(14):5649-69.
6. Maddodi N, Setaluri V. Role of UV in cutaneous melanoma, *Photochem Photobiol*. 2008 Mar-Apr;84(2):528-36.
7. Broekaert SM, Roy R, Okamoto I, van den Oord J, Bauer J, Garbe C, Barnhill RL, Busam KJ, Cochran AJ, Cook MG, Elder DE, McCarthy SW, Mihm MC, Schadendorf D, Scolyer RA, Spatz A, Bastian BC. Genetic and morphologic features for melanoma classification, *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010 Dec;23(6):763-70.
8. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis, *Front Biosci*. 2002 Apr 1;7:d765-83.
9. Lund LP, Timmins GS. Melanoma, long wavelength ultraviolet and sunscreens: controversies and potential resolutions, *Pharmacol Ther*. 2007 May;114(2):198-207.
10. Zaidi MR, Day CP, Merlino G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse, *J Invest Dermatol*. 2008 Oct;128(10):2381-91.
11. Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology, *Semin Cancer Biol*. 2004 Dec;14(6):427-32.
12. Rothhammer T, Bosserhoff AK. Epigenetic events in malignant melanoma, *Pigment Cell Res*. 2007 Apr;20(2):92-111.
13. Muthusamy V, Duraisamy S, Bradbury CM, Hobbs C, Curley DP, Nelson B, Bosenberg M. Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma, *Cancer Res*. 2006 Dec 1;66(23):11187-93.
14. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob JJ, Malvehy J, Newton-Bishop J, Stratigos A, Pehamberger H, Eggermont A. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline, *Eur J Cancer*. 2010 Jan;46(2):270-83.
15. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification, *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6199-206.
16. Giehl K Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis, *Biol Chem*. 2005 Mar;386(3):193-205.
17. Campbell PM, Der CJ. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis, *Semin Cancer Biol*. 2004 Apr;14(2):105-14.
18. Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer, *J Clin Oncol*. 2005 Sep 20;23(27):6771-90.
19. Kohno M, Pouyssegur J. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy, *Ann Med*. 2006;38(3):200-11.
20. Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. Toward a molecular classification of melanoma, *J Clin Oncol*. 2007 Apr 20;25(12):1606-20.
21. Ball NJ, Yohn JJ, Morelli JG, Norris DA, Golitz LE, Hoeffler JP. Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression, *J Invest Dermatol*. 1994 Mar;102(3):285-90.
22. van Elsas A, Zerp S, van der Flier S, Krüse-Wolters M, Vacca A, Ruiter DJ, Schrier P. Analysis of N-ras mutations in human cutaneous melanoma: tumor heterogeneity detected by polymerase chain reaction/single-stranded conformation polymorphism analysis, *Recent Results Cancer Res*. 1995;139:57-67.
23. van 't Veer LJ, Burgering BM, Versteeg R, Boot AJ, Ruiter DJ, Osanto S, Schrier PI, Bos JL N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites, *Mol Cell Biol*. 1989 Jul;9(7):3114-6.

24. Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, Cordon-Cardo C, McNutt NS, Bressler J, Andreeff M. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype, *Oncogene*. 1989 Nov;4(11):1363-74.
25. Hocker TL, Singh MK, Tsao H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the benchside to the bedside, *J Invest Dermatol*. 2008 Nov;128(11):2575-95.
26. Kyrgidis A, Tzellos TG, Triaridis S. Melanoma: Stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications, *J Carcinog*. 2010 Apr 1;9:3.
27. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.
28. Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, Springer CJ, Marais R. V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes, *Cancer Res*. 2004 Apr 1;64(7):2338-42.
29. Hingorani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, Herlyn M, Tuveson DA. Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation, *Cancer Res*. 2003 Sep 1;63(17):5198-202.
30. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma, *N Engl J Med*. 2005 Nov 17;353(20):2135-47.
31. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi, *Nature*. 2009 Jan 29;457(7229):599-602.
32. Van Raamsdonk CD, Fitch KR, Fuchs H, de Angelis MH, Barsh GS. Effects of G-protein mutations on skin color, *Nat Genet*. 2004 Sep;36(9):961-8.
33. Eliason MJ, Larson AA, Florell SR, Zone JJ, Cannon-Albright LA, Samlowski WE, Leachman SA. Population-based prevalence of CDKN2A mutations in Utah melanoma families, *J Invest Dermatol*. 2006 Mar;126(3):660-6.
34. Cowan JM, Halaban R, Francke U. Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas, *J Natl Cancer Inst*. 1988 Sep 21;80(14):1159-64.
35. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types, *Science*. 1994 Apr 15;264(5157):436-40.
36. Bartkova J, Lukas J, Guldberg P, Alsner J, Kirkin AF, Zeuthen J, Bartek J. The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis, *Cancer Res*. 1996 Dec 1;56(23):5475-83.
37. Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Lin AH, Markl ID, Fountain JW. Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets, *Genes Chromosomes Cancer*. 1998 Jun;22(2):157-63.
38. Straume O, Smeds J, Kumar R, Hemminki K, Akslen LA. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase, *Am J Pathol*. 2002 Jul;161(1):229-37.
39. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma, *Nat Genet*. 1996 Jan;12(1):97-9.
40. Tsao H, Benoit E, Sober AJ, Thiele C, Haluska FG. Novel mutations in the p16/CDKN2A binding region of the cyclin-dependent kinase-4 gene, *Cancer Res*. 1998 Jan 1;58(1):109-13.
41. Sauter ER, Yeo UC, von Stemm A, Zhu W, Litwin S, Tichansky DS, Pistrutto G, Nesbit M, Pinkel D, Herlyn M, Bastian BC. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma, *Cancer Res*. 2002 Jun 1;62(11):3200-6.
42. Heere-Ress E, Thallinger C, Lucas T, Schlagbauer-Wadl H, Wacheck V, Monia BP, Wolff K, Pehamberger H, Jansen B. Bcl-X(L) is a chemoresistance factor in human melanoma cells that can be inhibited by antisense therapy, *Int J Cancer*. 2002 May 1;99(1):29-34.
43. Thallinger C, Wolschek MF, Wacheck V, Maierhofer H, Günsberg P, Polterauer P, Pehamberger H, Monia BP, Selzer E, Wolff

- K, Jansen B. Mcl-1 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in a SCID mouse xenotransplantation model, *J Invest Dermatol.* 2003 Jun;120(6):1081-6.
44. Galluzzi L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy, *Oncogene.* 2006 Aug 7;25(34):4812-30.
 45. Jin S, Levine AJ The p53 functional circuit, *J Cell Sci.* 2001 Dec;114(Pt 23):4139-40.
 46. Albino AP, Vidal MJ, McNutt NS, Shea CR, Prieto VG, Nanus DM, Palmer JM, Hayward NK Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma, *Melanoma Res.* 1994 Feb;4(1):35-45.
 47. Akslen LA, Monstad SE, Larsen B, Straume O, OGREID D. Frequent mutations of the p53 gene in cutaneous melanoma of the nodular type, *Int J Cancer.* 1998 Feb 20;79(1):91-5.
 48. Harland M, Taylor CF, Chambers PA, Kukulizch K, Randerson-Moor JA, Guis NA, de Snoo FA, ter Huurne JA, Goldstein AM, Tucker MA, Bishop DT, Bishop JA. A mutation hotspot at the p14ARF splice site, *Oncogene.* 2005 Jun 30;24(28):4604-8.
 49. Li G, Bush JA, Ho VC. p53-dependent apoptosis in melanoma cells after treatment with camptothecin, *J Invest Dermatol.* 2000 Mar;114(3):514-9.
 50. Zhai S, Yaar M, Doyle SM, Gilchrist BA. Nerve growth factor rescues pigment cells from ultraviolet-induced apoptosis by upregulating BCL-2 levels, *Exp Cell Res.* 1996 May 1;224(2):335-43.
 51. Borner C, Schlagbauer Wadl H, Fellay I, Selzer E, Polterauer P, Jansen B. Mutated N-ras upregulates Bcl-2 in human melanoma in vitro and in SCID mice, *Melanoma Res.* 1999 Aug;9(4):347-50.
 52. McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, Lin YL, Ramaswamy S, Avery W, Ding HF, Jordan SA, Jackson IJ, Korsmeyer SJ, Golub TR, Fisher DE. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability, *Cell.* 2002 Jun 14;109(6):707-18.
 53. Zhai D, Jin C, Huang Z, Satterthwait AC, Reed JC. Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1, *J Biol Chem.* 2008 Apr 11;283(15):9580-6.
 54. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Dec 4;104(49):19512-7 Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 4;104(49):19512-7.
 55. Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, Zhou X, Ho VC, Trotter MJ. Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma, *Clin Cancer Res.* 1998 Aug;4(8):1865-71.
 56. Chetoui N, Sylla K, Gagnon-Houde JV, Alcaide-Loridan C, Charron D, Al-Daccak R, Aoudjit F. Down-regulation of mcl-1 by small interfering RNA sensitizes resistant melanoma cells to fas-mediated apoptosis, *Mol Cancer Res.* 2008 Jan;6(1):42-52.
 57. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins, *Genes Dev.* 2005 Jun 1;19(11):1294-305.
 58. Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma, *Nature.* 2001 Jan 11;409(6817):207-11.
 59. Mustika R, Budiyo A, Nishigori C, Ichihashi M, Ueda M. Decreased expression of Apaf-1 with progression of melanoma, *Pigment Cell Res.* 2005 Feb;18(1):59-62.
 60. Omholt K, Kröckel D, Ringborg U, Hansson J. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma, *Melanoma Res.* 2006 Apr;16(2):197-200.
 61. Curtin JA, Stark MS, Pinkel D, Hayward NK, Bastian BC. PI3-kinase subunits are infrequent somatic targets in melanoma, *J Invest Dermatol.* 2006 Jul;126(7):1660-3.
 62. Tsao H, Zhang X, Benoit E, Haluska FG. Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines, *Oncogene.* 1998 Jul 2;16(26):3397-402.
 63. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma, *Oncogene.* 2003 May 19;22(20):3113-22.

64. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma, *J Invest Dermatol*. 2004 Feb;122(2):337-41.
65. Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, Haluska FG. Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines, *Cancer Res*. 2000 Apr 1;60(7):1800-4.
66. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, Kester M, Sandirasegarane L, Robertson GP. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma, *Cancer Res*. 2004 Oct 1;64(19):7002-10.
67. Meier F, Schitteck B, Busch S, Garbe C, Smalley K, Satyamoorthy K, Li G, Herlyn M. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma, *Front Biosci*. 2005 Sep 1;10:2986-3001.
68. Slipicevic A, Holm R, Nguyen MT, Böhler PJ, Davidson B, Flørenes VA. Expression of activated Akt and PTEN in malignant melanomas: relationship with clinical outcome, *Am J Clin Pathol*. 2005 Oct;124(4):528-36.
69. del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nuñez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt, *Science*. 1997 Oct 24;278(5338):687-9.
70. Grichnik JM. Kit and melanocyte migration, *J Invest Dermatol*. 2006 May;126(5):945-7.
71. Funasaka Y, Boulton T, Cobb M, Yarden Y, Fan B, Lyman SD, Williams DE, Anderson DM, Zakut R, Mishima Y, et al. c-Kit-kinase induces a cascade of protein tyrosine phosphorylation in normal human melanocytes in response to mast cell growth factor and stimulates mitogen-activated protein kinase but is down-regulated in melanomas, *Mol Biol Cell*. 1992 Feb;3(2):197-209.
72. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma, *J Clin Oncol*. 2006 Sep 10;24(26):4340-6.
73. Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche, *Science*. 2005 Feb 4;307(5710):720-4.
74. Widlund HR, Fisher DE. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival, *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3035-41.
75. Carreira S, Liu B, Goding CR. The gene encoding the T-box factor Tbx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes, *J Biol Chem*. 2000 Jul 21;275(29):21920-7.
76. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhi R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma, *Nature*. 2005 Jul 7;436(7047):117-22.
77. Wu M, Hemesath TJ, Takemoto CM, Horstmann MA, Wells AG, Price ER, Fisher DZ, Fisher DE. c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi, *Genes Dev*. 2000 Feb 1;14(3):301-12.
78. Widlund HR, Horstmann MA, Price ER, Cui J, Lessnick SL, Wu M, He X, Fisher DE. Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor, *J Cell Biol*. 2002 Sep 16;158(6):1079-87.
79. Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines, *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1790-2.
80. Rimm DL, Caca K, Hu G, Harrison FB, Fearon ER. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma, *Am J Pathol*. 1999 Feb;154(2):325-9.
81. Omholt K, Platz A, Ringborg U, Hansson J. Cytoplasmic and nuclear accumulation of beta-catenin is rarely caused by CTNNB1 exon 3 mutations in cutaneous malignant melanoma, *Int J Cancer*. 2001 Jun 15;92(6):839-42.
82. Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M, Denat L, Goodall J, Luciani F, Viros A, Demirkan N, Bastian BC, Goding CR,

- Larue L. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development, *Genes Dev.* 2007 Nov 15;21(22):2923-35.
83. Smalley KS, Eisen TG. Farnesyl transferase inhibitor SCH66336 is cytostatic, pro-apoptotic and enhances chemosensitivity to cisplatin in melanoma cells, *Int J Cancer.* 2003 Jun 10;105(2):165-75.
 84. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis, *Cancer Res.* 2004 Oct 1;64(19):7099-109.
 85. Karasarides M, Chilioches A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, Ogilvie L, Hedley D, Martin J, Marshall CJ, Springer CJ, Marais R. B-Raf is a therapeutic target in melanoma, *Oncogene.* 2004 Aug 19;23(37):6292-8.
 86. Eisen T, Ahmad T, Flaherty KT, Gore M, Kaye S, Marais R, Gibbens I, Hackett S, James M, Schuchter LM, Nathanson KL, Xia C, Simantov R, Schwartz B, Poulin-Costello M, O'Dwyer PJ, Ratain MJ. Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis, *Br J Cancer.* 2006 Sep 4;95(5):581-6.
 87. Ott PA, Hamilton A, Min C, Safarzadeh-Amiri S, Goldberg L, Yoon J, Yee H, Buckley M, Christos PJ, Wright JJ, Polsky D, Osman I, Liebes L, Pavlick AC. A phase II trial of sorafenib in metastatic melanoma with tissue correlates, *PLoS One.* 2010 Dec 29;5(12):e15588.
 88. Niessner H, Beck D, Sinnberg T, Lasithiotakis K, Maczey E, Gogel J, Venturelli S, Berger A, Mauthe M, Toulany M, Flaherty K, Schaller M, Schadendorf D, Proikas-Cezanne T, Schitteck B, Garbe C, Kulms D, Meier F. The farnesyl transferase inhibitor lonafarnib inhibits mTOR signaling and enforces sorafenib-induced apoptosis in melanoma cells, *J Invest Dermatol.* 2011 Feb;131(2):468-79.
 89. Metzner T, Bedeir A, Held G, Peter-Vörösmarty B, Ghassemi S, Heinzle C, Spiegl-Kreinecker S, Marian B, Holzmann K, Grasl-Kraupp B, Pirker C, Micksche M, Berger W, Heffeter P, Grusch M. Fibroblast growth factor receptors as therapeutic targets in human melanoma: synergism with BRAF inhibition, *J Invest Dermatol.* 2011 Oct;131(10):2087-95.
 90. McDermott DF, Sosman JA, Gonzalez R, Hodi FS, Linette GP, Richards J, Jakub JW, Beeram M, Tarantolo S, Agarwala S, Frenette G, Puzanov I, Cranmer L, Lewis K, Kirkwood J, White JM, Xia C, Patel K, Hersh E. Double-blind randomized phase II study of the combination of sorafenib and dacarbazine in patients with advanced melanoma: a report from the 11715 Study Group, *J Clin Oncol.* 2008 May 1;26(13):2178-85.
 91. Eisen T, Marais R, Affolter A, Lorigan P, Robert C, Corrie P, Ottensmeier C, Chevreau C, Chao D, Nathan PD, Jouary T, Harries M, Negrier S, Montegriffo E, Ahmad T, Gibbens I, James MG, Strauss UP, Prendergast S, Gore ME. Sorafenib and dacarbazine as first-line therapy for advanced melanoma: phase I and open-label phase II studies, *Br J Cancer.* 2011 Jul 26;105(3):353-9.
 92. Flaherty KT, Schiller J, Schuchter LM, Liu G, Tuveson DA, Redlinger M, Lathia C, Xia C, Petrenciuc O, Hingorani SR, Jacobetz MA, Van Belle PA, Elder D, Brose MS, Weber BL, Albertini MR, O'Dwyer PJ. A phase I trial of the oral, multikinase inhibitor sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel, *Clin Cancer Res.* 2008 Aug 1;14(15):4836-42.
 93. K. T. Flaherty, M. Brose, L. Schuchter, D. Tuveson, R. Lee, B. Schwartz, C. Lathia, B. Weber, P. O'Dwyer Phase I/II trial of BAY 43-9006, carboplatin (C) and paclitaxel (P) demonstrates preliminary antitumor activity in the expansion cohort of patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 22, No 14S (July 15 Supplement), 2004: 7507.
 94. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, Hogg D, Robert C, Hersey P, Eggermont A,

- Grabbe S, Gonzalez R, Gille J, Peschel C, Schadendorf D, Garbe C, O'Day S, Daud A, White JM, Xia C, Patel K, Kirkwood JM, Keilholz U. Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma, *J Clin Oncol*. 2009 Jun 10;27(17):2823-30.
95. Egberts F, Gutzmer R, Ugurel S, Becker JC, Trefzer U, Degen A, Schenck F, Frey L, Wilhelm T, Hassel JC, Schadendorf D, Livingstone E, Mauch C, Garbe C, Berking C, Rass K, Mohr P, Kaehler KC, Weichenthal M, Hauschild A. Sorafenib and pegylated interferon- α 2b in advanced metastatic melanoma: a multicenter phase II DeCOG trial, *Ann Oncol*. 2011 Jul;22(7):1667-74.
 96. Karreth FA, DeNicola GM, Winter SP, Tuveson DA. C-Raf inhibits MAPK activation and transformation by B-Raf(V600E), *Mol Cell*. 2009 Nov 13;36(3):477-86.
 97. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma, *N Engl J Med*. 2010 Aug 26;363(9):809-19.
 98. A. Ribas, K. B. Kim, L. M. Schuchter, R. Gonzalez, A. C. Pavlick, J. S. Weber, G. A. McArthur, T. E. Hutson, K. T. Flaherty, S. J. Moschos, D. P. Lawrence, P. Hersey, R. F. Kefford, B. Chmielowski, I. Puzanov, J. Li, K. B. Nolop, R. J. Lee, A. K. Joe, J. A. Sosman BRIM-2: An open-label, multicenter phase II study of vemurafenib in previously treated patients with BRAF V600E mutation-positive metastatic melanoma. - ASCO - *J Clin Oncol* 29: 2011.
 99. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation, *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2507-16.
 100. Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, Kehoe SM, Johannessen CM, Macconail LE, Hahn WC, Meyerson M, Garraway LA. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling, *J Clin Oncol*. 2011 Aug 1;29(22):3085-96.
 101. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, Attar N, Sazegar H, Chodon T, Nelson SF, McArthur G, Sosman JA, Ribas A, Lo RS. Melanomas acquire resistance to B-Raf(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation, *Nature*. 2010 Dec 16;468(7326):973-7. à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/21107323>
 102. Montagut C, Sharma SV, Shioda T, McDermott U, Ulman M, Ulkus LE, Dias-Santagata D, Stubbs H, Lee DY, Singh A, Drew L, Haber DA, Settleman J. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma, *Cancer Res*. 2008 Jun 15;68(12):4853-61.
 103. Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, Wubbenhorst B, Xu X, Gimotty PA, Kee D, Santiago-Walker AE, Letrero R, D'Andrea K, Pushparajan A, Hayden JE, Brown KD, Laquerre S, McArthur GA, Sosman JA, Nathanson KL, Herlyn M. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K, *Cancer Cell*. 2010 Dec 14;18(6):683-95.
 104. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, Emery CM, Stransky N, Cogdill AP, Barretina J, Caponigro G, Hieronymus H, Murray RR, Salehi-Ashtiani K, Hill DE, Vidal M, Zhao JJ, Yang X, Alkan O, Kim S, Harris JL, Wilson CJ, Myer VE, Finan PM, Root DE, Roberts TM, Golub T, Flaherty KT, Dummer R, Weber BL, Sellers WR, Schlegel R, Wargo JA, Hahn WC, Garraway LA. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation, *Nature*. 2010 Dec 16;468(7326):968-72.
 105. Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, Sawyer AM, Niu L, Kim JJ, Hatton C, Chopra R, Oberholzer PA, Karpova MB, MacConaill LE, Zhang J, Gray NS, Sellers WR, Dummer R, Garraway LA. MEK1

- mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 1;106(48):20411-6.
106. Poulidakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF, *Nature*. 2010 Mar 18;464(7287):427-30.
 107. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, Hussain J, Reis-Filho JS, Springer CJ, Pritchard C, Marais R. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF, *Cell*. 2010 Jan 22;140(2):209-21.
 108. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJ, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, Morales T, Aliagas I, Liu B, Sideris S, Hoeflich KP, Jaiswal BS, Seshagiri S, Koeppen H, Belvin M, Friedman LS, Malek S. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth, *Nature*. 2010 Mar 18;464(7287):431-5.
 109. Ji Z, Flaherty KT, Tsao H. Targeting the RAS pathway in melanoma, *Trends Mol Med*. 2011 Sep 29.
 110. Bhatt KV, Spofford LS, Aram G, McMullen M, Pumiglia K, Aplin AE. Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling, *Oncogene*. 2005 May 12;24(21):3459-71.
 111. Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, Xiao M, Desai B, Egyhazi S, Hansson J, Wu H, King AJ, Van Belle P, Elder DE, Flaherty KT, Herlyn M, Nathanson KL. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas, *Mol Cancer Ther*. 2008 Sep;7(9):2876-83.
 112. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, Wong KK, Brandstetter K, Wittner B, Ramaswamy S, Classon M, Settleman J. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations, *Cell*. 2010 Apr 2;141(1):69-80.
 113. Banerji U, Affolter A, Judson I, Marais R, Workman P. BRAF and NRAS mutations in melanoma: potential relationships to clinical response to HSP90 inhibitors, *Mol Cancer Ther*. 2008 Apr;7(4):737-9.
 114. Solit DB, Osman I, Polsky D, Panageas KS, Daud A, Goydos JS, Teitcher J, Wolchok JD, Germino FJ, Krown SE, Coit D, Rosen N, Chapman PB. Phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with metastatic melanoma, *Clin Cancer Res*. 2008 Dec 15;14(24):8302-7.
 115. Yeh TC, Marsh V, Bernat BA, Ballard J, Colwell H, Evans RJ, Parry J, Smith D, Brandhuber BJ, Gross S, Marlow A, Hurley B, Lyssikatos J, Lee PA, Winkler JD, Koch K, Wallace E. Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor, *Clin Cancer Res*. 2007 Mar 1;13(5):1576-83.
 116. Friday BB, Yu C, Dy GK, Smith PD, Wang L, Thibodeau SN, Adjei AA. BRAF V600E disrupts AZD6244-induced abrogation of negative feedback pathways between extracellular signal-regulated kinase and Raf proteins, *Cancer Res*. 2008 Aug 1;68(15):6145-53.
 117. Madhunapantula SV, Robertson GP. Is B-Raf a good therapeutic target for melanoma and other malignancies?, *Cancer Res*. 2008 Jan 1;68(1):5-8.
 118. Rinehart J, Adjei AA, Lorusso PM, Waterhouse D, Hecht JR, Natale RB, Hamid O, Varterasian M, Asbury P, Kaldjian EP, Gulyas S, Mitchell DY, Herrera R, Sebolt-Leopold JS, Meyer MB. Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer, *J Clin Oncol*. 2004 Nov 15;22(22):4456-62.
 119. Adjei AA, Cohen RB, Franklin W, Morris C, Wilson D, Molina JR, Hanson LJ, Gore L, Chow L, Leong S, Maloney L, Gordon G, Simmons H, Marlow A, Litwiler K, Brown S, Poch G, Kane K, Haney J, Eckhardt SG. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral, small-molecule mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) in patients with advanced cancers, *J Clin Oncol*. 2008 May 1;26(13):2139-46.
 120. Kirkwood JM, Bastholt L, Robert C, Sosman JA, Larkin J, Hersey P, Middleton MR, Cantarini MV, Zazulina V, Kemsley K, Dummer R. Phase II, Open-Label,

- Randomized Trial of the MEK 1/2 Inhibitor Selumetinib as Monotherapy versus Temozolomide in Patients with Advanced Melanoma, *Clin Cancer Res*. 2011 Nov 2.
121. Davies BR, Logie A, McKay JS, Martin P, Steele S, Jenkins R, Cockerill M, Cartlidge S, Smith PD. AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models, *Mol Cancer Ther*. 2007 Aug;6(8):2209-19.
 122. Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, Ye Q, Lobo JM, She Y, Osman I, Golub TR, Sebolt-Leopold J, Sellers WR, Rosen N. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition, BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition.
 123. Collisson EA, De A, Suzuki H, Gambhir SS, Kolodney MS. Treatment of metastatic melanoma with an orally available inhibitor of the Ras-Raf-MAPK cascade, *Cancer Res*. 2003 Sep 15;63(18):5669-73.
 124. Ambrosini, Grazia, Schwartz, Gary K. The MEK inhibitor AZD6244 is active in GNAQ mutant ocular melanoma cells, 101st Annual Meeting of the American Association-for-Cancer-Research - Washington, DC, USA - April 17 -21, 2010.
 125. Romano E, Schwartz GK, Chapman PB, Wolchock JD, Carvajal RD. Treatment implications of the emerging molecular classification system for melanoma, *Lancet Oncol*. 2011 Feb 22.
 126. Robinson WA, Miller TL, Harrold EA, Bemis LT, Brady BM, Nelson RP. The effect of flavopiridol on the growth of p16+ and p16- melanoma cell lines, *Melanoma Res*. 2003 Jun;13(3):231-8.
 127. Burdette-Radoux S, Tozer RG, Lohmann RC, Quirt I, Ernst DS, Walsh W, Wainman N, Colevas AD, Eisenhauer EA. Phase II trial of flavopiridol, a cyclin dependent kinase inhibitor, in untreated metastatic malignant melanoma, *Invest New Drugs*. 2004 Aug;22(3):315-22.
 128. Zhao Y, Zhang Y, Yang Z, Li A, Dong J. Simultaneous knockdown of BRAF and expression of INK4A in melanoma cells leads to potent growth inhibition and apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jun 6;370(3):509-13.
 129. Propper DJ, Macaulay V, O'Byrne KJ, Braybrooke JP, Wilner SM, Ganesan TS, Talbot DC, Harris AL. A phase II study of bryostatin 1 in metastatic malignant melanoma, *Br J Cancer*. 1998 Nov;78(10):1337-41.
 130. Tozer RG, Burdette-Radoux S, Berlangier K, Davis ML, Lohmann RC, Rusthoven JR, Wainman N, Zee B, Seymour L; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. A randomized phase II study of two schedules of bryostatin-1 (NSC339555) in patients with advanced malignant melanoma: A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study, *Invest New Drugs*. 2002 Nov;20(4):407-12.
 131. Philip PA, Rea D, Thavasu P, Carmichael J, Stuart NS, Rockett H, Talbot DC, Ganesan T, Pettit GR, Balkwill F, et al. Phase I study of bryostatin 1: assessment of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha induction in vivo. The Cancer Research Campaign Phase I Committee, *J Natl Cancer Inst*. 1993 Nov 17;85(22):1812-8.
 132. Scala S, Dickstein B, Regis J, Szallasi Z, Blumberg PM, Bates SE. Bryostatin 1 affects P-glycoprotein phosphorylation but not function in multidrug-resistant human breast cancer cells, *Clin Cancer Res*. 1995 Dec;1(12):1581-7.
 133. Ernst DS, Eisenhauer E, Wainman N, Davis M, Lohmann R, Baetz T, Belanger K, Smylie M. Phase II study of perifosine in previously untreated patients with metastatic melanoma, *Invest New Drugs*. 2005 Dec;23(6):569-75.
 134. S. M. Malik, J. Hwang, J. Marshall, P. Ramzi, J. Posey, C. Ahn, Y. Lee Phase I study of RX-0201 in patients with advanced or metastatic solid tumors, *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S.
 135. J. Marshall, J. Posey, J. Hwang, S. Malik, R. Shen, K. Kazempour, L. R. White, K. M. Fraser, C. G. Chang, C. H. Ahn A phase I trial of RX-0201 (AKT anti-sense) in patients with an advanced cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S.

136. Margolin K, Longmate J, Baratta T, Synold T, Christensen S, Weber J, Gajewski T, Quirt I, Doroshow JH. CCI-779 in metastatic melanoma: a phase II trial of the California Cancer Consortium, Cancer. 2005 Sep 1;104(5):1045-8.
137. Thallinger C, Poepl W, Pratscher B, Mayerhofer M, Valent P, Tappeiner G, Joukhadar C. CCI-779 plus cisplatin is highly effective against human melanoma in a SCID mouse xenotransplantation model, Pharmacology. 2007;79(4):207-13.
138. Thallinger C, Werzowa J, Poepl W, Kovar FM, Pratscher B, Valent P, Quehenberger P, Joukhadar C. Comparison of a treatment strategy combining CCI-779 plus DTIC versus DTIC monotherapy in human melanoma in SCID mice, J Invest Dermatol. 2007 Oct;127(10):2411-7.
139. R. D. Rao, H. E. Windschitl, J. B. Allred, V. J. Lowe, W. J. Maples, M. K. Gornet, V. J. Suman, E. T. Creagan, H. C. Pitot, S. N. Markovic Phase II trial of the mTOR inhibitor everolimus (RAD-001) in metastatic melanoma, Journal of Clinical Oncology, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S.
140. Hainsworth JD, Infante JR, Spigel DR, Peyton JD, Thompson DS, Lane CM, Clark BL, Rubin MS, Trent DF, Burris HA 3rd. Bevacizumab and everolimus in the treatment of patients with metastatic melanoma: a phase 2 trial of the Sarah Cannon Oncology Research Consortium, Cancer. 2010 Sep 1;116(17):4122-9.
141. Ugurel S, Hildenbrand R, Zimpfer A, La Rosée P, Paschka P, Sucker A, Keikavoussi P, Becker JC, Rittgen W, Hochhaus A, Schadendorf D. Lack of clinical efficacy of imatinib in metastatic melanoma, Br J Cancer. 2005 Apr 25;92(8):1398-405.
142. Kim KB, Eton O, Davis DW, Frazier ML, McConkey DJ, Diwan AH, Papadopoulos NE, Bedikian AY, Camacho LH, Ross MI, Cormier JN, Gershenwald JE, Lee JE, Mansfield PF, Billings LA, Ng CS, Charnsangavej C, Bar-Eli M, Johnson MM, Murgo AJ, Prieto VG. Phase II trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma, Br J Cancer. 2008 Sep 2;99(5):734-40.
143. Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X, Zhu Y, Corless CL, Li L, Li H, Sheng X, Cui C, Chi Z, Li S, Han M, Mao L, Lin X, Du N, Zhang X, Li J, Wang B, Qin S. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification, J Clin Oncol. 2011 Jul 20;29(21):2904-9.
144. Vidwans SJ, Flaherty KT, Fisher DE, Tenenbaum JM, Travers MD, Shrager J. A melanoma molecular disease model, PLoS One. 2011 Mar 30;6(3):e18257.
145. Dankort D, Curley DP, Cartledge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE Jr, You MJ, DePinho RA, McMahon M, Bosenberg M. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma, Nat Genet. 2009 May;41(5):544-52.
146. Smalley KS, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT, Herlyn M. Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases, Mol Cancer Ther. 2006 May;5(5):1136-44.
147. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis, Mol Cell Biochem. 2011 May;351(1-2):41-58.
148. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance, Oncogene. 2003 May 19;22(20):3138-51.
149. www.ClinicalTrials.gov.
150. Jones S, Hruban RH, Kamiyama M, Borges M, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Palmisano E, Brune K, Jaffee EM, Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Parmigiani G, Kern SE, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Eshleman JR, Goggins M, Klein AP. Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene, Science. 2009 Apr 10;324(5924):217.
151. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. DNMT3A mutations in acute myeloid

leukemia, N Engl J Med. 2010 Dec
16;363(25):2424-33.

152. Shah SP, Köbel M, Senz J, Morin RD, Clarke BA, Wiegand KC, Leung G, Zayed A, Mehl E, Kalloger SE, Sun M, Giuliany R, Yorlida E, Jones S, Varhol R, Swenerton KD, Miller D, Clement PB, Crane C, Madore J, Provencher D, Leung P, DeFazio A, Khattra J, Turashvili G, Zhao Y, Zeng T, Glover JN, Vanderhyden B, Zhao C, Parkinson CA, Jimenez-Linan M, Bowtell DD, Mes-Masson AM, Brenton JD, Aparicio SA, Boyd N, Hirst M, Gilks CB, Marra M, Huntsman DG. Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary, N Engl J Med. 2009 Jun 25;360(26):2719-29.

Annexes

Les inhibiteurs multikinases

Etude	Protocole	OS	PFS	CR	PR	ORR (PR+CR)	SD	DCR (CR+PR+SD)	TTP	PD
Sorafenib seul										
Eisen et al., 2006, Br J Cancer	Phase II N=502, 501 ont reçu du sorafenib dont 37 avec un mélanome malin 400mg/b.i.d de sorafenib pdt 12 sem.				62%		19%		11 sem.	
Ott et al., 2010	Phase II N=36 400mg/b.i.d de sorafenib pdt 28j.			0	3% (1/36)		8% (3/36)	11,1% (4/36)	63 jrs	
Sorafenib en association										
McDermott et al., 2008, J Clin Oncol.	Phase II N=101 → n=50 dacarbazine + placebo (1) → n=51 dacarbazine + sorafenib (2) D1→D21, 1mg/m ² dacarbazine IV 400mg sorafenib ou placebo b.i.d, VO	(1) 51,3 sem.	(1) 11,7 sem.	0	(1) 12%	(1) 12%	(1) 44%	(1) 56%	(1) 11,7 sem.	(1) 42%
		(2) 45,6 sem.	(2) 21,1 sem.	0	(2) 24 %	(2) 24%	(2) 47%	(2) 71%	(2) 21,1 sem.	(2) 29%
Eisen et al., 2011, Br J Cancer	Phase II N=83 D1 → D21, 1mg/m ² dacarbazine IV 400mg sorafenib b.i.d, VO	37 sem.	20 sem.	1%	11%	12%	37%	49%	14,6 sem.	41%
Hauschild et al., 2009, J Clin Oncol.	Phase III N=270 → n=135 sorafenib + carboplatine + paclitaxel (1) → n=135 placebo + carboplatine + paclitaxel (2) D1: Carboplatine IV + paclitaxel IV 225mg/m ² D2→D19 : placebo ou sorafenib 400mg b.i.d VO	(1) 42 sem.	(1) 17,9 sem.				(1) 51%	(1) 62%		
		(2) 42 sem.	(2) 17,4 sem.				(2) 54%	(2) 66%		
Egberts et al., 2011, Ann Oncol.	Phase II N=55 Peg-IFN-α2b : 3μg/kg une fois p/ sem., s.c Sorafenib : 400mg b.i.d, VO	9,47 mois (40,6 sem.)	2,47 mois (10,6 sem.)	0	7,3%		21,8%	29,1%		61,8%

Les inhibiteurs spécifiques de BRAFV600E

Etude	Protocole	OS	PFS	CR	PR	ORR (PR+CR)	SD	DCR (CR+PR+SD)	TTP	PD
Flaherty et al., 2010, NEJM	Phase I N=32 960mg vemurafenib b.i.d			6%	75%	81%				
Ribas et al., 2011, J Clin Oncol	Phase II N=132 960mg b.i.d		6,2 mois (24,5 sem.)	2,3%	50%	52,3%	29,5%			13,6%
Chapman et al., 2011, N Engl J Med.	Phase III N=2107 →n=675, 960mg vemurafenib b.i.d (1) →n=675, 1000mg dacarbazine/m ² , IV (2)	84% (1)	5,3 mois (21,2 sem.)	1% (2/219)	47% (104/219)					
		64% (2)	1,6 mois (6,4 sem.)	0	5% (12/220)					

Les inhibiteurs de l'Hsp90

Etude	Protocole	OS	PFS	CR	PR	ORR (PR+CR)	SD	DCR (CR+PR+SD)	TTP	PD
Banerji et al., 2008, Mol Cancer Ther	Pré-clinique N=12 320 à 450mg/m ² /sem. de 17-AAG			0	0					
Solit et al., 2008, Clion Cancer Res	Phase II N=15 450mg/m ² /sem. de 17-AAG pdt 6 sem., suivi de 2 sem. sans tmt			0	0		6% (1/15) pdt 6 sem.			

Les inhibiteurs de MEK

Etude	Protocole	OS	PFS	CR	PR	ORR (PR+CR)	SD	DCR (CR+PR+SD)	TTP	PD
Adjei et al., 2008, J Clin Oncol	Phase I N=57 dont 20 mélanome (35%) 100mg de selumetinib b.i.d						33% à la fin du 2ème cycle 16% SD> 5 mois			
Kirkwood et al., 2011, Clin Cancer Res	Phase II N=200 → n=104 : selumetinib (1) → n=96 TMZ (2) D0→D28 : 100mg selumetinib b.i.d, VO D0→D5 : 200mg/m ² /jr, VO, suivi de 23 jrs sans ttt		0	0	(1) 5,8% (2) 9,4%		(1) 46,2% > 6 sem. (2) 37,5% > 6 sem.		(1) 284 j. (2) 369j.	

Médicaments interférant avec le cycle cellulaire

Etude	Protocole	OS	PFS	CR	PR	ORR (PR+CR)	SD	DCR (CR+PR+SD)	TTP	PD
Burdette-Radoux et al., 2004, Invest New Drugs	Phase II N=17 50mg/m ² /jr de flavopirinol sur 3 jrs. Cycle tous les 21jrs			0	0		44% (7/17) après 2 cycles			
Propper et al., 1998, Br J Cancer	Phase II N=16 25µg/m ² de bryostatine de D1→D8 et de D15 à D18									
Tozer et al., 2002, Invest New Drugs	Phase II N=34 →n=15, A : 25µg/m ² bryostatine →n=15, B : 120µg/m ²			0	0		20% (3/15)			80%
				0	0		26% (4/15)			74%

Inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR

Etude	Protocole	OS	PFS	CR	PR	ORR (PR+CR)	SD	DCR (CR+PR+SD)	TTP	PD
Ernest et al., 2005, Invest New Drugs	Phase II N=14 900mg perifosine à D1 puis 150mg D1→D21 sur un cycle de 28 jrs. Dose de charge de 300mg pour les cycle suivant			0	0		21% (3/14)			78% (11/14)
Margolin et al., 2005, Cancer	Phase II N=33 250mg/semaine de temsirolimus	5 mois (20 sem.)	10 sem.		3% (1/33)					
Rao et al., 2006, J Clin Oncol	Phase II N=24 30mg/sem. d'everolimus. Cycle de 8 semaines	0	3 mois (12 sem.)				35% (7/24)			
Hainsworth et al., 2010, Cancer	Phase II N=57 D1→D21 :15mg/kg bévacicumab IV Tous les jrs, 10mg everolimus VO	8,6 mois	4 mois (16 sem.)	1% (1/57)	10% (6/57)		40% (23/57)			

Inhibiteur de c-KIT

Etude	Protocole	OS	PFS	CR	PR	ORR (PR+CR)	SD	DCR (CR+PR+SD)	TTP	PD
Ugurel et al., 2005, Br J Cancer	Phase II N=16 400mg imatinib p.o. b.i.d pdt 8 sem.	4,2 mois		0	0		6% (1/16) de 2,6 mois			
Kim et al., 2008, Br J Cancer	Phase II N=21 400mg imatinib b.i.d	7,5 mois					20% (4/21) <12,8 mois		1,4 mois	
Guo et al., 2011, J Clin Oncol.	Phase II N=43 400mg /jr imatinib et jusqu'à 600 à 800mg/jr	14 mois	3,5 mois		23,3% (10/43)		30,2% (13/43)			46,5% (20/43)

SEHEDIC Delphine

Titre de la thèse : Importance de la classification moléculaire dans la prise en charge de patients atteints de mélanome métastatique

Résumé :

Le mélanome est la forme la plus agressive de cancer de la peau et son incidence à travers le monde ne cesse de s'accroître. Si les formes précoces de mélanome peuvent être traitées avec succès par chirurgie, il existe peu de traitements efficaces pour les formes avancées. Le mélanome métastatique présente de nombreuses anomalies moléculaires qui peuvent être utilisées comme cible thérapeutique. Aujourd'hui, il semble plus intéressant de déterminer des sous-groupes de patients présentant telle(s) ou telle(s) anomalie(s) plutôt que de considérer le mélanome comme une maladie identique d'un patient à un autre. Actuellement, l'objectif est de développer des traitements « personnalisés » pour un sous-groupe de patients donné de manière à optimiser la prise en charge. Les altérations génétiques et moléculaires mises en évidence à ce jour concernent notamment la voie des MAPK et des PI3K/AKT/mTOR impliquées dans la survie, l'invasion et la prolifération cellulaire. Les résultats cliniques obtenus l'an passé avec les inhibiteurs spécifiques de BRAF^{V600E} ont suscité un vif enthousiasme mais le développement rapide de résistance conduit à développer des traitements dirigés contre d'autres cibles ou à contre les mécanismes de résistance mis en jeu.

MOTS CLES : mélanome métastatique, classification moléculaire, cancer, BRAF.

JURY

PRESIDENT : Pr. Stéphane BEZIEAU, Chef du service de génétique médicale, CHU Nantes

**ASSESEURS : M. François LANG, Professeur de Pharmacologie, Faculté de Pharmacie de
Nantes**

**Mme Laurence COIFFARD, Professeur de Cosmétologie, Faculté de
Pharmacie de Nantes**
