

Année 2014

**TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LE
VEMURAFENIB ASSOCIÉ À L'IPILIMUMAB :
INTÉRÊT CHEZ LE CHIEN ?**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

Le

Par

Marie, Dominique, Élisabeth BALANGER

Née le 27 juin 1989 à Paris 14^{ème}

JURY

Président : Pr.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL

Membres

Directeur : Jean-Jacques Panthier, Professeur à l'ENVA

Assesseur : Fanny Pilot-Storck, Maître de conférences à l'ENVA

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur GOGNY Marc

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs : COTARD Jean-Pierre, MIALOT Jean-Paul, MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard.

Professeurs honoraires : Mme et MM. : BENET Jean-Jacques, BRUGERE Henri, BRUGERE-PICOUX Jeanne, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard, CRESPEAU François, DEPUTTE Bertrand, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, POUCHÉLON Jean-Louis, ROZIER Jacques.

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département par intérim : M. GRANDJEAN Dominique, Professeur - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

UNITE DE CARDIOLOGIE - Mme CHETBOUL Valérie, Professeur * - Mme GKOUNI Vassiliki, Praticien hospitalier - Mme SECHI-TREHIOU, Praticien hospitalier UNITE DE CLINIQUE EQUINE - M. AUDIGIE Fabrice, Professeur - M. DENOIX Jean-Marie, Professeur - Mme BERTONI Lélia, Maître de conférences contractuel - Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier * - M. LECHARTIER Antoine, Maître de conférences contractuel - Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Praticien hospitalier - Mme TRACHSEL Dagmar, Maître de conférences contractuel UNITE D'IMAGERIE MEDICALE - Mme PEY Pascaline, Maître de conférences contractuel - Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier UNITE DE MEDECINE - Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel - M. BLOT Stéphane, Professeur* - Mme FREICHE-LEGROS Valérie, Praticien hospitalier - Mme MAUREY-GUENEC Christelle, Maître de conférences UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT - Mme CLERO Delphine, Maître de conférences contractuel - M. GRANDJEAN Dominique, Professeur * - Mme YAGUIYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel	DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION - M. PARAGON Bernard, Professeur DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE - Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES - M. BLAGA Radu Gheorghe, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - M. CHERMETTE René, Professeur (rattaché au DSBP) - Mme FAIVRE Noëlle, Praticien hospitalier - M. GUILLOT Jacques, Professeur * - Mme MARIGNAC Geneviève, Maître de conférences - M. POLACK Bruno, Maître de conférences UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE - M. FAYOLLE Pascal, Professeur - M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences - M. MANASSERO Mathieu, Maître de conférences contractuel - M. MOISSONNIER Pierre, Professeur* - Mme RAVARY-PLUMIOEN Béangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) - Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Professeur - M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS - Mme STEBLAJ Barbara, Praticien Hospitalier DISCIPLINE : NOUVEAUX ANIMAUX DE COMPAGNIE - M. PIGNON Charly, Praticien hospitalier
--	---

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Professeur - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur

UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE - M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences - M. BOLNOT François, Maître de conférences * - M. CARLIER Vincent, Professeur UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES - Mme DUFOUR Barbara, Professeur* - Mme HADDAD/HOANG-XUAN Nadia, Professeur - Mme PRAUD Anne, Maître de conférences - Mme RIVIERE Julie, Maître de conférences contractuel UNITE DE PATHOLOGIE DES ANIMAUX DE PRODUCTION - M. ADJOU Karim, Maître de conférences * - M. BELBIS Guillaume, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel - M. HESKIA Bernard, Professeur contractuel - M. MILLEMANN Yves, Professeur	UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE - Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences - M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Mme MAENHOUDT Cindy, Praticien hospitalier - Mme MASSE-MOREL Gaëlle, Maître de conférences contractuel - M. MAUFFRE Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel - M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - M. REMY Dominique, Maître de conférences* UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE - M. ARNE Pascal, Maître de conférences - M. BOSSE Philippe, Professeur* - M. COURREAU Jean-François, Professeur - Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur - Mme LEROY-BARASSIN Isabelle, Maître de conférences - M. PONTER Andrew, Professeur
--	---

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES - M. CHATEAU Henry, Maître de conférences* - Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur - M. DEGUEURCE Christophe, Professeur - Mme ROBERT Céline, Maître de conférences DISCIPLINE : ANGLAIS - Mme CONAN Muriel, Professeur certifié UNITE DE BIOCHIMIE - M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences* - Mme LAGRANGE Isabelle, Praticien hospitalier - M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences DISCIPLINE : BIostatISTIQUES - M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE - M. PHILIPS Pascal, Professeur certifié DISCIPLINE : ETHOLOGIE - Mme GILBERT Caroline, Maître de conférences UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE - Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences - M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur*	UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE - Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences* - M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur - Mme LALOY Eve, Maître de conférences contractuel - M. REYES GOMEZ Edouard, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE - M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur - Mme LE ROUX Delphine, Maître de conférences - Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE - Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur - M. PERROT Sébastien, Maître de conférences - M. TISSIER Renaud, Professeur* UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE - Mme COMBRISON Hélène, Professeur - Mme PILOT-STORCK Fanny, Maître de conférences - M. TIRET Laurent, Maître de conférences* UNITE DE VIROLOGIE - M. ELOIT Marc, Professeur - Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences *
---	---

* responsable d'unité

REMERCIEMENTS

Au Président de la Faculté de médecine de Créteil,
Qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse.
Hommage respectueux.

Au Professeur Jean-Jacques Panthier,
Professeur de l'Unité médicale et moléculaire de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,
Qui m'a fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse.
Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance, merci de m'avoir soutenue
et guidée dans mes choix.

Au Docteur Fanny Pilot-Storck,
Maître de conférences et membre de l'Unité de Physiologie et Thérapeutique à l'École
Nationale Vétérinaire d'Alfort.
Qui m'a fait l'honneur d'accepter l'assessorat de cette thèse.
Qu'elle trouve ici l'assurance de ma profonde gratitude.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLEAUX.....	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	7
INTRODUCTION.....	11
1. Aspects histologiques, cliniques et génétiques du mélanome	13
1.1. Rappels biologiques.....	13
1.1.1. Origine de la lignée mélanocytaire.....	13
1.1.2. Présentation des mélanocytes.....	13
1.1.3. Processus de pigmentation	14
1.1.3.1. Le mélanosome, un organe spécifique des mélanocytes	15
1.1.3.2. La mélanogenèse.....	16
1.1.3.2.1. Différents stades de maturation des mélanosomes	16
1.1.3.2.2. Synthèse des mélanines.....	17
1.1.3.2.3. Migration et transfert des mélanosomes aux kératinocytes	19
1.1.3.3. Variations individuelles de la pigmentation	20
1.1.4. Facteurs de régulation de la mélanogenèse.....	21
1.1.4.1. Les rayons ultraviolets	21
1.1.4.2. Facteurs génétiques.....	21
1.1.4.3. Facteurs hormonaux	22
1.1.4.4. Facteurs tissulaires	23
1.2. Généralités sur le mélanome	23
1.2.1. Présentation clinique du mélanome.....	23
1.2.1.1. Le mélanome chez l'Homme.....	23
1.2.1.2. Le mélanome canin.....	25
1.2.2. Etiologie du mélanome.....	29
1.2.2.1. Données génétiques chez l'Homme	29
1.2.2.2. Données génétiques chez le chien.....	31
1.2.3. Outils diagnostiques disponibles.....	32
2. Mélanome et thérapeutique en médecine humaine	35
2.1. Traitement chirurgical	35
2.2. Traitements adjuvants.....	35
2.2.1. Notion de réponse au traitement et critères d'évaluation.....	36
2.2.2. Radiothérapie.....	38
2.2.3. Chimiothérapie cytotoxique.....	38
2.2.4. Thérapie ciblée.....	39
2.2.4.1. Immunothérapies	39
2.2.4.1.1. Immunothérapie non spécifique.....	39
2.2.4.1.1.1. L'interféron alpha.....	39

2.2.4.1.1.2.	L'interleukine 2	40
2.2.4.1.2.	Immunothérapie spécifique	41
2.2.4.1.2.1.	Vaccination génétique : l'immunothérapie active	41
2.2.4.1.2.2.	Anti-CTLA-4 : l'ipilimumab	43
2.2.4.1.2.3.	Anti-PD-1	46
2.2.4.1.2.4.	Anti-PDL-1	47
2.2.4.2.	Inhibiteurs de la voie des MAP kinases	47
2.2.4.2.1.	Les inhibiteurs de B-RAF	47
2.2.4.2.1.1.	Généralités	47
2.2.4.2.1.2.	Effets indésirables et échappement tumoral	51
2.2.4.2.1.3.	Inhibiteurs de B-RAF et métastases cérébrales	52
2.2.4.2.2.	Les inhibiteurs de MEK	52
2.2.4.2.2.1.	Généralités	52
2.2.4.2.2.2.	Inhibiteurs de MEK et mélanome choroïdien	53
2.2.4.2.3.	Combinaison d'inhibiteurs de B-RAF et de MEK	54
2.2.4.3.	Combinaison des deux stratégies : immunothérapie et inhibiteur de la voie MAP kinase	54

3. Mélanome canin et thérapeutique : des nouvelles perspectives de traitements..... 59

3.1. Traitements actuels 59

3.1.1.	Traitement chirurgical	59
3.1.2.	Traitements adjuvants disponibles.....	59
3.1.2.1.	Radiothérapie.....	59
3.1.2.2.	Chimiothérapie.....	59
3.1.2.3.	Immunothérapie spécifique active : la vaccination.....	61

3.2. Perspectives thérapeutiques : intérêt de la thérapie ciblée 62

CONCLUSION..... 65

BIBLIOGRAPHIE 67

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Mélanocyte humain (D’après Delevoye <i>et al.</i> , 2011).....	13
Figure 2 : Schéma d’une unité fonctionnelle mélano-kératinocytaire (schéma personnel).	14
Figure 3 : Mélanocyte et pigmentation cutanée (D’après INCa, 2013).	15
Figure 4 : Spécialisation du trafic intracellulaire au sein d’un mélanocyte (D’après Delevoye <i>et al.</i> , 2011).....	17
Figure 5 : Synthèse de l’eumélanine et de phaeomélanine (schéma personnel).	18
Figure 6 : Migration des mélanosomes au sein des dendrites mélanocytaires et transfert aux kératinocytes voisins (D’après CEDEF, 2013).	20
Figure 7 : Distribution de 2 350 tumeurs mélanocytaires canines de nature bénigne / maligne en fonction de leur localisation (D’après Gillard <i>et al.</i> , 2013).....	27
Figure 8 : Mélanome buccal au niveau de la mandibule droite chez un labrador retriever de 10 ans (D’après De Lorimier, 2013).	28
Figure 9 : Mélanome digité au niveau du doigt 4 du membre thoracique droit chez un mastiff de 7 ans (D’après De Lorimier, 2013).....	28
Figure 10 : Voie de signalisation du récepteur à l’EGF (D’après Monnier <i>et al.</i> , 2004).....	29
Figure 11 : Niveau de Clark et indice de Breslow (D’après INCa, 2013 et AIM, 2013).....	33
Figure 12 : Principe de la vaccination anti-tumorale (D’après Campagne, 2010).	42
Figure 13 : Mécanisme d’action de l’ipilimumab (D’après Lacouture <i>et al.</i> , 2014).....	43
Figure 14 : Mécanisme d’action du vemurafenib (D’après Flaherty <i>et al.</i> , 2011).	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents stades des mélanosomes lors de la mélanogenèse (D’après Delevoeye <i>et al.</i> , 2011).	16
Tableau 2 : Éléments de différenciation entre tumeurs mélanocytaires bénignes et malignes (D’après Withrow et Vail, 2007).	26
Tableau 3 : Diversités des altérations moléculaires dans les mélanomes humains (D’après Soria <i>et al.</i> , 2012).	30
Tableau 4 : Épaisseur de Breslow et marges d’exérèse correspondantes (D’après Lipsker et Cribier, 2005 ; INCa, 2013).	35
Tableau 5 : Options thérapeutiques possibles selon le stade du mélanome chez l’Homme (D’après INCa, 2013).	36
Tableau 6 : Taux de survie à 1, 2 et 3 ans selon les cohortes A et B (D’après Robert <i>et al.</i> , 2011).	45
Tableau 7 : Notation Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG) (D’après Bower et Waxman, 2010).	46
Tableau 8 : Mutations de <i>B-RAF</i> connues, incidence et substitution correspondantes (D’après Jordan et Kelly, 2012).	48
Tableau 9 : Caractéristiques des 2 cohortes et résultats de l’étude B-Raf In Melanoma 3 (BRIM 3) (D’après Chapman <i>et al.</i> , 2011 ; Chapman <i>et al.</i> , 2012).	50
Tableau 10 : Caractéristiques du vemurafenib et de l’ipilimumab (D’après Chapman, 2011).	55
Tableau 11 : Recommandations aux propriétaires lors de la période de surveillance accrue (D’après Soyer et Doliger, 2011).	60

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α -MSH : Alpha mélanotropine ou *alpha melanocyte stimulating hormone*
ACTH : Hormone adénocorticotrope ou *adrenocorticotropin hormone*
ACT : Transfert adoptif de cellules ou *adoptive cell transfert*
ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps ou *antibody dependent cell mediated cytotoxicity*
ADN : Acide désoxyribonucléique
Ag : Antigène
ALM : Mélanome acral lentigineux ou *acral lentigenous melanoma*
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AP-1 : Protéine adaptatrice de type 1 ou *adaptator protein 1*
AP-3 : Protéine adaptatrice de type 3 ou *adaptator protein 3*
ASCO : *American Society of Clinical Oncology*
bFGF : Facteur de croissance fibroblastique basique ou *basic fibroblast growth factor*
B-RAF : *V raf murine sarcoma oncogene homolog B1*
BCG : Bilié de Calmette et Guérin
BRIM : *B-RAF In Melanoma*
CD4 : *Cluster* de différenciation 4
CE : Commission Européenne
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CPK : Créatine phosphokinase
CR : Réponse complète ou *complete response*
CTLA-4 : Lymphocyte cytotoxique T associé à l'antigène 4 ou *cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4*
DCT : Dopachrome tautomérase
DHI : 5,6-dihydroindole
DHICA : Acide 5,6-dihydroxy 2-carboxylique
DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine
DTIC : Diméthyltriazenoimidazole carboxamide ou dacarbazine
ECOG : *Eastern Cooperative Oncology Group performance status*
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
EGF : Facteur de croissance épidermique ou *epidermal growth factor*
EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique ou *epidermal growth factor receptor*
EMA : *European Medicines Agency*
ER kinase : *Extracellular signal regulated kinase*
FDA : *Food and Drug Administration*
FLT-3 : *Fms-like tyrosine kinase 3*
GTP : Guanosine triphosphate
HMW-MAA : Antigène associé au mélanome de poids moléculaire élevé ou *high molecular weight-melanoma associated antigen*
IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase
IFN : Interféron
IL : Interleukine
INCa : Institut national du cancer
IPD : Pigmentation immédiate ou *immediate pigment darkening*

IRAE : Effets secondaires d'ordre immunitaire ou *immune related adverse events*
 KIT : Protéine codée par le proto-oncogène *Kit*
 LAK : Cellule tueuse activée par la lymphokine ou *lymphokine activated killer*
 LAMPs : Lysosomal associated membrane proteins
 LB : Lymphocyte B
 LDH : Lactate déshydrogénase
 LIF : Facteur inhibiteur de la leucémie ou *leukemia inhibitory factor*
 LMM : Mélanome malin sur mélanose de Dubreuilh ou *lentigo malignant melanoma*
 LT : Lymphocyte T
 LT 4 : Lymphocyte T CD4
 MAGE : Antigène associé au mélanome ou *melanoma associated antigen*
 MAP kinase : Protéine kinase activée par des agents mitogènes ou *mitogen-activated protein kinase*
 MART-1 : *Melanoma antigen recognized by T cells 1*
 MC1R : Récepteur de la mélanocortine de type 1 ou *melanocortin 1 receptor*
 MEK : MAPK kinase
 MITF : Protéine codée par le gène *microphthalmia-associated transcription factor*
 MLPH : Mélanophiline
 MYC : Proto-oncogène *MYC*
 NCCN : *National Comprehensive Cancer Network*
 Cellule NK : Cellule tueuse naturelle ou *natural killer*
 NM : Mélanome nodulaire ou *nodular melanoma*
 NO : Monoxyde d'azote
 N-RAS : Proto-oncogène *N-RAS*
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 PD-1 : Gène *program death 1*
 PD : Maladie progressive ou *progressive disease*
 PDGF : *Platelet derived growth factor*
 PI3K : Phosphatidyl inositol 3-kinase
 POMC : Pro-opiomélanocortine
 PR : Réponse partielle ou *partial response*
 PTEN : *Phosphatase and tensin homolog*
 RAS : Proto-oncogène *RAS*
 RECIST : Critères d'évaluation de réponse des tumeurs solides ou *response evaluation criteria in solid tumors*
 REG : Réticulum endoplasmique granuleux
 REL : Réticulum endoplasmique lisse
 RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase
 RO : Rémission objective
 SD : Maladie stable ou *stable disease*
 SPGL : Somme totale des plus grandes longueurs
 SSM : Mélanome à extension superficielle ou *superficial spreading melanoma*
 SSRIs : Inhibiteurs sélectifs du recaptage de la sérotonine ou *selective serotonin reuptake inhibitors*
 TAP : Protéine transporteuse associée au processus de présentation de l'antigène ou *transporter associated with antigen processing*
 TIL : Lymphocyte infiltrant les tumeurs ou *tumor infiltrating lymphocyte*
 TNF α : Facteur de nécrose tumorale alpha ou *tumor necrosis factor alpha*
 TRP1 (ou TYRP1) : *Tyrosinase-related protein 1*
 TRP2 (ou TYRP2) : *Tyrosinase-related protein 2*

TYR : Tyrosinase

UV : Ultraviolet

VEGF R : Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ou *vascular endothelial growth factor receptor*

VLS : Syndrome de fuite vasculaire ou *vascular leak syndrome*

INTRODUCTION

Le mélanome est une entité pathologique ancienne. L'examen nécropsique de momies péruviennes incas, datées au carbone 14 et vieilles de plus de 2 400 ans, a mis en évidence des lésions similaires à celles résultant de la progression du mélanome, telles que des masses cutanées mélaniques et des métastases osseuses (Urteaga et Pack, 1966).

René Laennec a le premier utilisé le terme de mélanome du grec *melas* qui signifie noir. Il a également décrit les métastases pulmonaires couramment associées. C'est alors qu'il n'était encore qu'un jeune étudiant en médecine qu'il fit sa première conférence sur les mélanomes, conférence qui sera publiée en 1806 par la Faculté de Médecine de Paris (Laennec, 1806). Il y explique comment ces tumeurs sont d'une variabilité remarquable, tant au niveau de la couleur allant « *du brun-jaunâtre (...) au beau noir foncé* », qu'au niveau du volume qu'il décrit comparable à « *un grain de millet (...) jusqu'à celui de deux œufs de poules réunis* ». Laennec insiste déjà sur la gravité de « *cette espèce particulière de cancer* » que représente le mélanome en termes de mortalité, résultant d'une dégradation de l'état clinique général par « *diminution graduelle des forces vitales* ».

On appelle mélanomes les tumeurs qui se développent à partir des mélanocytes, les cellules qui produisent la mélanine dans la peau ou dans l'œil par exemple (Marignac, 2010). Il faut bien faire la distinction entre les tumeurs bénignes et malignes. Une tumeur dérivée de mélanocytes et diagnostiquée bénigne est appelée mélanocytome ou également « *naevus naevo cellulaire* » (Ramos, 2007 ; Marignac, 2010). Le terme de mélanome désigne une tumeur maligne à haut potentiel métastatique (Bower et Waxman, 2010).

Depuis les travaux de Laennec, le mélanome, et en particulier le traitement de celui-ci, a fait l'objet d'une multitude d'études internationales. Les différents travaux réalisés ont permis de mettre en place rapidement des mesures préventives. Henri Oliver Lancaster a montré en 1956 que l'apparition de la tumeur est étroitement liée à une exposition importante au soleil (Lancaster, 1956). Cette observation a permis de sensibiliser la population au danger que représentent les rayons ultraviolets et l'importance d'une protection contre ceux-ci. A la suite de cette découverte, de nombreuses recherches dans le domaine spécifique de la thérapie du mélanome ont été entreprises. De nos jours, la médecine humaine dispose de plusieurs options de traitement face à un diagnostic de mélanome telles que l'exérèse chirurgicale associée à une chimiothérapie systémique et/ou à une radiothérapie, voire à une thérapie ciblée selon le stade du mélanome. En l'occurrence, les thérapies ciblées suscitent actuellement le développement de nombreux traitements expérimentaux, avec récemment l'essai de nouvelles molécules aux résultats très encourageants (Quéreux, 2013). C'est en particulier le cas du traitement par des inhibiteurs de la protéine B-Raf comme le vemurafenib, et des anticorps monoclonaux dans le cadre d'immunothérapies spécifiques utilisant l'ipilimumab, qui est actuellement le plus prometteur chez l'Homme (Quéreux, 2013).

Le mélanome est une maladie très préoccupante. Le mélanome cutané par exemple représente environ 100 000 à 132 000 nouveaux cas chaque année selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), dont environ 9 700 cas en France (INCa, 2013). L'institut national du cancer (INCa) ainsi que le syndicat des dermatologues notent une constante augmentation du nombre de cas de mélanomes cutanés diagnostiqués en France. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a annoncé dans son rapport sur la mortalité, qu'à l'heure actuelle, aucun pays au monde n'est épargné par le mélanome (Soria *et al.*, 2012).

Le mélanome de l'Homme, comme le mélanome canin, est caractérisé par son extrême agressivité (Withrow et Vail, 2007 ; Bower et Waxman, 2010). Cette caractéristique est essentiellement due à sa forte capacité à métastaser de façon très rapide par les voies lymphatique et sanguine. Malgré un diagnostic précoce, la médecine humaine permet difficilement l'obtention d'une médiane de survie satisfaisante avec les traitements traditionnels comme la radiothérapie et la chimiothérapie. En médecine vétérinaire, le mélanome canin connaît également un pronostic très réservé à tendance très sombre. Chez l'Homme, la médiane de survie est significativement augmentée avec le développement des thérapies ciblées (Quéreux, 2013). Les résultats des différents essais thérapeutiques reposant sur une utilisation du vemurafenib et d'ipilimumab sont positifs alors que le traitement du mélanome canin reste décevant. Aujourd'hui, il n'existe pas de traitement réellement efficace disponible en médecine vétérinaire face au diagnostic de mélanome chez le chien (Doliger, 2003).

La question que nous nous poserons au cours de cette étude bibliographique est la suivante : *le traitement du mélanome par le vemurafenib associé à l'ipilimumab, qui donne des résultats encourageants chez l'Homme, est-il envisageable chez le chien ?*

Une première partie présentera le mélanome avec ses aspects génétiques, histologiques et cliniques chez l'Homme et chez le chien. La deuxième partie abordera les multiples moyens thérapeutiques disponibles en médecine humaine pour traiter le mélanome et détaillera en particulier les thérapies ciblées avec le traitement par le vemurafenib, un inhibiteur de B-RAF, et l'ipilimumab, un anticorps monoclonal anti-CTLA-4. La dernière partie concernera la thérapeutique vétérinaire du mélanome canin. Nous discuterons l'intérêt des thérapies ciblées en cancérologie vétérinaire, et en particulier l'utilisation du vemurafenib et d'ipilimumab chez le chien.

1. Aspects histologiques, cliniques et génétiques du mélanome

1.1. Rappels biologiques

1.1.1. Origine de la lignée mélanocytaire

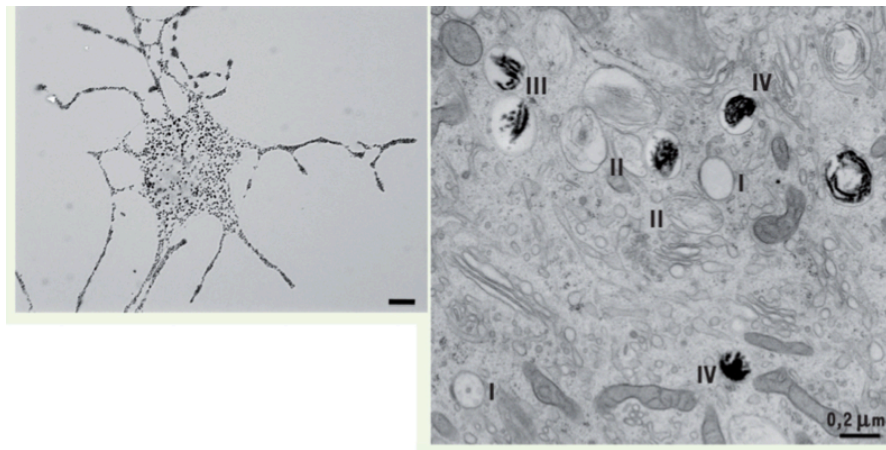
Les mélanocytes sont des cellules dendritiques d'origine ectodermique, dérivées de la crête neurale (Marignac, 2010). Les mélanoblastes, précurseurs des mélanocytes, sont de grandes cellules rondes qui se différencient en mélanocytes par l'acquisition d'une activité dopa-oxydase et l'acquisition d'un aspect dendritique. La différenciation des mélanoblastes en mélanocytes est décrite chez l'Homme lors du premier tiers de la gestation (avant la 14^{ème} semaine). Les mélanocytes colonisent le derme et l'épiderme. Lors de la formation des follicules pileux, les mélanocytes se répartissent de façon aléatoire dans les ébauches pilaires, puis se localisent dans l'infundibulum et à l'apex de la papille dermique à l'intérieur du bulbe pileux, où ils se trouvent à partir du sixième mois de la gestation (Fontenay, 2007). Le nombre de mélanocytes dans le derme ne cesse de diminuer au cours de la gestation jusqu'à leur disparition quasi-complète. A la naissance, les mélanocytes sont localisés dans l'épiderme juste au-dessus de la membrane basale, au niveau de la jonction dermo-épidermique (Fontenay, 2007).

1.1.2. Présentation des mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules qui synthétisent de la mélanine, par l'intermédiaire d'organites cellulaires appelés mélanosomes (Marignac, 2010). Les mélanocytes sont responsables de la pigmentation de la peau et des phanères chez les Vertébrés (Figure 1) (Delevoye *et al.*, 2011). On retrouve des mélanocytes dans l'épiderme au niveau de la membrane basale et au sein des follicules pileux (dans l'infundibulum et à l'apex de la papille dermique), et également dans la rétine et l'iris, ainsi que dans l'oreille interne, l'encéphale, et les épithéliums digestifs (Marignac, 2010).

Figure 1 : Mélanocyte humain (D'après Delevoye *et al.*, 2011)

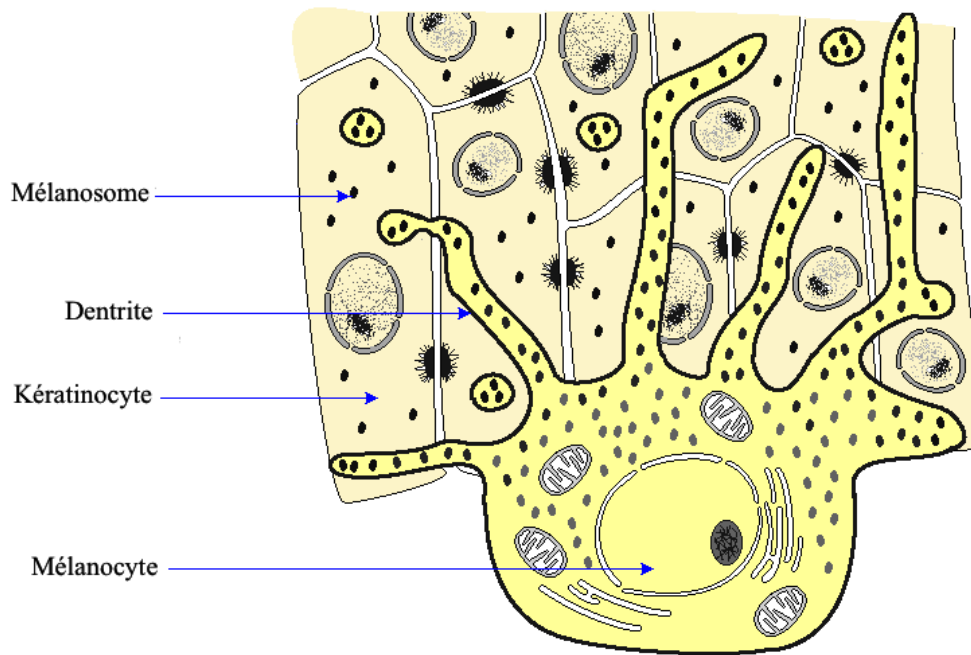
À gauche, visualisation d'un mélanocyte humain en microscopie optique (échelle microscopique : 10 μ m) et à droite, en microscopie électronique (échelle microscopique : 0,2 μ m). On notera en particulier l'aspect dendritique du mélanocyte à gauche et les différents stades de mélanosomes coexistants (stades I à IV) dans un mélanocyte à droite.



Les mélanocytes représentent environ 5 % des cellules de l'épiderme, ils sont répartis de façon homogène parmi les kératinocytes basaux. On considère qu'il y a 1 mélanocyte pour environ 35 kératinocytes avoisinants ; cet ensemble constitue l'unité fonctionnelle mélano-kératinocytaire (Guaguere et Alhaidari, 1992 ; Marignac, 2010) (Figure 2).

Figure 2 : Schéma d'une unité fonctionnelle mélano-kératinocytaire (schéma personnel)

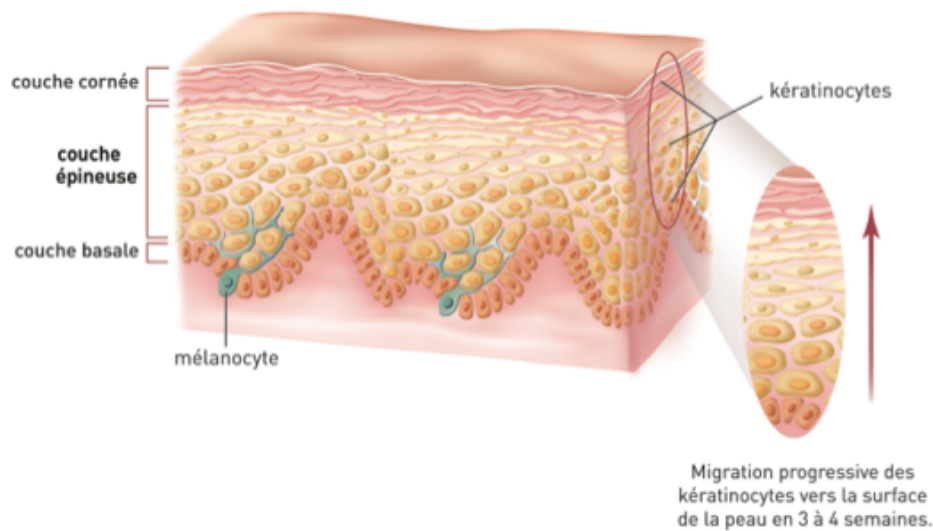
On notera l'aspect dendritique du mélanocyte et la migration des mélanosomes vers les kératinocytes voisins au cours de la mélanogénèse.



1.1.3. Processus de pigmentation

La pigmentation est le résultat d'une synthèse de mélanine dans les mélanosomes, de la migration des mélanosomes dans les dendrites du mélanocyte et de leur transfert aux kératinocytes voisins (Figure 3).

Figure 3 : Mélanocyte et pigmentation cutanée (D'après INCa, 2013)



1.1.3.1. Le mélanosome, un organe spécifique des mélanocytes

Les mélanosomes sont des organites intracellulaires qui appartiennent à une famille d'organites spécifiques dits « organites liés aux lysosomes ». Cette famille comprend les granules lytiques des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules Natural Killer (NK), les granules denses des plaquettes, les granules basophiles et azurophiles des neutrophiles et les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales (Delevoye *et al.*, 2011). Comme les lysosomes, les mélanosomes contiennent des hydrolases acides et des marqueurs spécifiques de la membrane lysosomale, les protéines LAMPs (pour *lysosomal-associated membrane proteins*) (Delevoye *et al.*, 2011).

Les mélanosomes sont le résultat final de la fusion de plusieurs vésicules. Ces vésicules sont dérivées pour certaines d'entre elles de l'appareil de Golgi et renferment plusieurs protéines, en particulier la tyrosinase, la dopachrome tautomérase (DCT) et l'acide carboxylique dihydroxyindole (DHICA) oxydase. Elles fusionnent avec des vésicules produites par le réticulum endoplasmique granuleux qui contiennent notamment les futurs éléments de structure des mélanosomes (Delevoye *et al.*, 2011).

Dans les mélanocytes, il existe deux types de mélanosomes qui présentent des structures différentes selon le type de mélanine produite. Les eumélanosomes réalisent la synthèse de l'eumélanine, pigment de couleur brun-noir, et les phaeomélanosomes, celle de la phaeomélanine, pigment de couleur jaune-rouge (Marignac, 2010). Le rôle majeur des mélanines est de protéger la peau contre les effets néfastes des rayons ultraviolets et de limiter ainsi le développement de tumeurs cutanées (Miller *et al.*, 2012). De plus, les mélanines jouent un rôle de détoxification important au sein des mélanocytes et des kératinocytes car elles possèdent la capacité de se lier aux cations, aux anions et à diverses substances chimiques (Miller *et al.*, 2012).

1.1.3.2. La mélanogénèse

1.1.3.2.1. Différents stades de maturation des mélanosomes

La différenciation des mélanosomes peut être présentée en 4 stades (Tableau 1). La protéine Pmel17 est une protéine transmembranaire de grande importance qui compose les fibres des prémélanosomes (stade I). Pmel17 va ensuite être clivée par une pro-hormone convertase de la famille des furines ; les domaines clivés vont ensuite s'auto-assembler au sein de l'organite en fibres permettant la formation d'un mélanosome de stade II (Delevoye *et al.*, 2011).

Tableau 1 : Les différents stades des mélanosomes lors de la mélanogénèse (D'après Delevoye *et al.*, 2011)

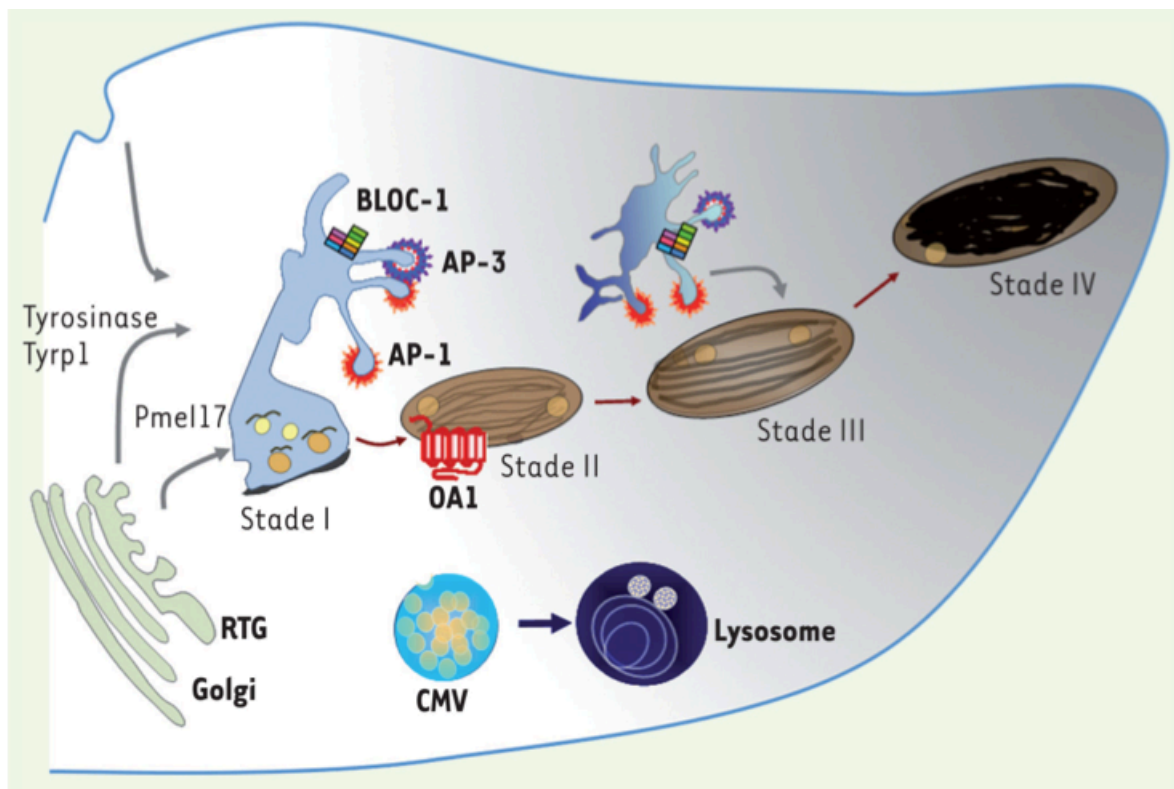
Stade I		Stade II	Stade III	Stade IV
*Pas d'activité tyrosinase Organites non pigmentés de forme ronde, en position péri-nucléaire appelés pré-mélanosome. Pré - eumélanosomes présentant une richesse en structures fibrillaires.	La maturation du stade I au stade II est dépendante de Pmel 17 et de Melan-A (ou Mart-1), une autre protéine nécessaire à l'expression, à la stabilité et à la maturation de Pmel 17. 	*Tyrosinase inactive <u>Phaeomélanosomes</u> Structure ronde et matrice vésicoglobulaire contenant de la mélanine, qui deviendra de la phaeomélanine. <u>Eumélanosomes</u> Forme ovale (se remplit de plus en plus de structures fibrillaires) ; pas de production de mélanine à ce stade.	* Synthèse de mélanine après activation de la tyrosinase et dépôt de mélanine de façon <u>uniforme</u> au sein des mélanosomes des deux types.	*Arrêt de l'activité tyrosinase au terme du stade IV Synthèse et dépôt des mélanines jusqu'à ce que la structure interne ne soit plus visible. Lorsque le dépôt est complet, on parle de 'lac de mélanine'.

La mélanogénèse est le produit de différentes enzymes clés (Delevoye *et al.*, 2011) :

- la **tyrosinase** inactive aux stades I et II puis pleinement active au stade III et au début du stade IV ; enfin, inactive à la fin du stade IV ;
- la protéine **TRP1** (ou TYRP1) (pour *tyrosinase-related protein 1*) ;
- la protéine **DCT / TRP2** (ou TYRP2) (dopachrome tautomérase / *tyrosinase-related protein 2*).

Le transport des enzymes mélanosomales telles que la tyrosinase et la protéine TRP1 depuis les endosomes vers les mélanosomes est régulé par les adaptateurs AP-1 et AP-3 (Figure 4). L'adaptateur AP-1 est acteur dans le positionnement des endosomes par l'intermédiaire de la kinésine KIF13A, facilitant ainsi les interactions avec ces organites spécifiques, nécessaires à leur maturation. De plus, le récepteur transmembranaire OA1 des mélanosomes immatures contrôle la formation des pré-mélanosomes (Delevoye *et al.*, 2011).

Figure 4 : Spécialisation du trafic intracellulaire au sein d'un mélanocyte (D'après Delevoye *et al.*, 2011)



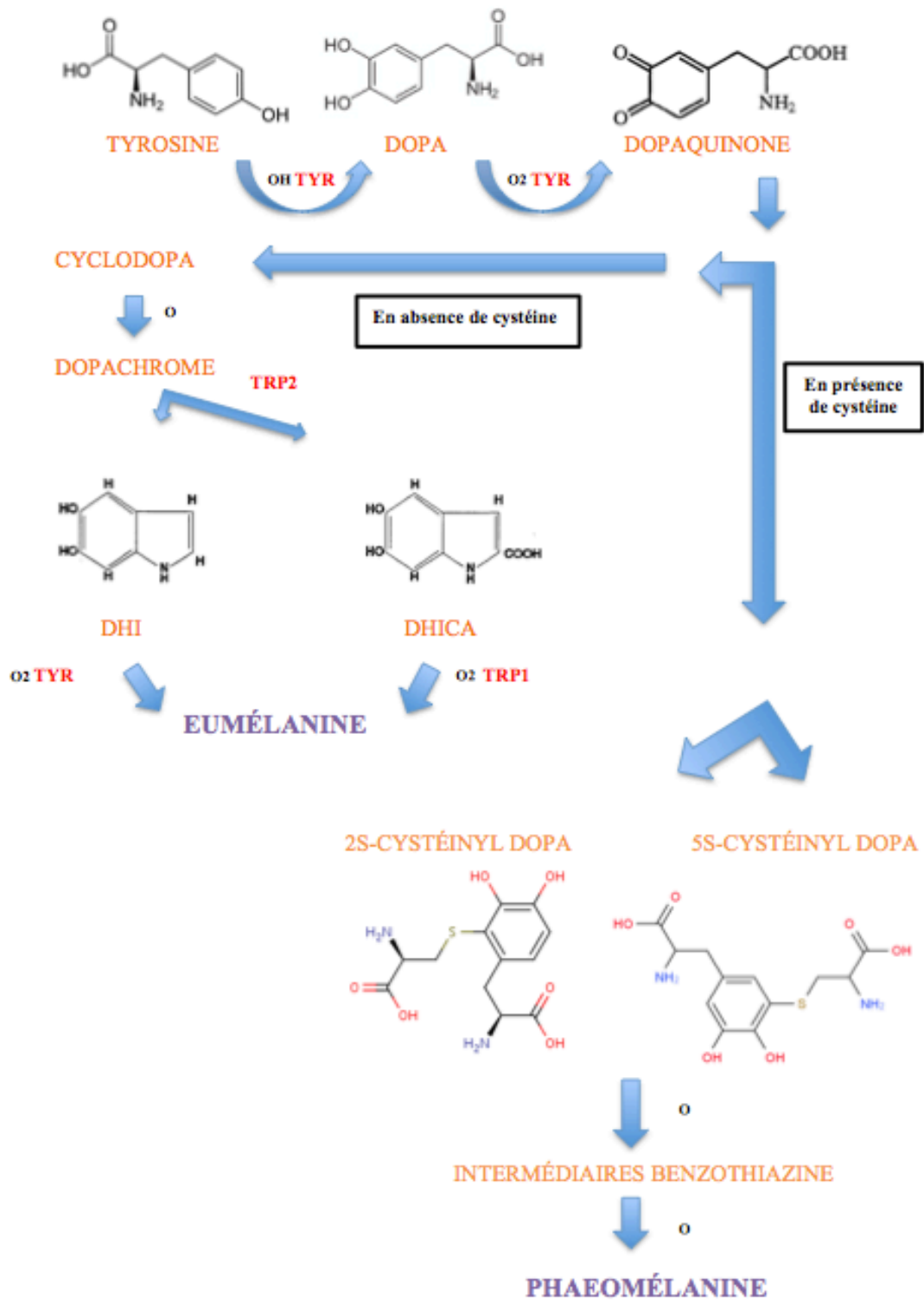
1.1.3.2.2. Synthèse des mélanines

Les mélanines sont synthétisées à partir de la tyrosine exogène apportée par la circulation sanguine (Miller *et al.*, 2012). La tyrosinase joue un rôle pivot au sein du processus (Figures 4 et 5). Un précurseur inactif de l'enzyme est activé par la stimulation du récepteur membranaire MC1R par l' α -MSH (α -mélanotropine) via l'AMPc.

L'eumélanine est un copolymère hétérogène synthétisé à partir du dihydroindole (DHI) et de l'acide carboxylique dihydroxyindole (DHICA) sous forme réduite ou oxydée. La phaeomélanine est composée d'intermédiaires benzothiazines contenant du soufre (Miller *et al.*, 2012). Le soufre est fourni à la cellule par l'acide aminé cystéine ou par le glutathion (tripeptide) qui aboutit à la libération d'une cystéine via l'action d'une glutamyl-transpeptidase.

Figure 5 : Synthèse de l'eumélanine et de phaeomélanine (schéma personnel)

TYR = Tyrosinase ; TRP1 = Tyrosinase-related protein 1 et TRP2 = Tyrosinase-related protein 2.



Les trois enzymes mélanosomales (TYR, TRP1 et TRP2) jouent des rôles primordiaux dans la synthèse des mélanines (Figure 5) (Delevoye et al., 2011 ; Miller *et al.*, 2012) :

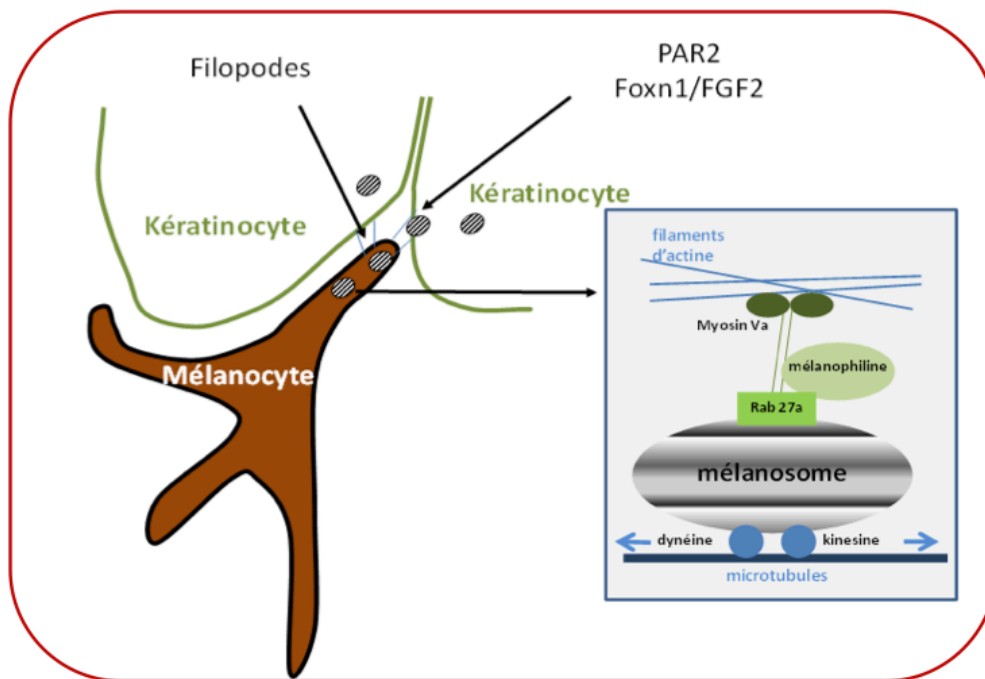
- **La tyrosinase (TYR)** : elle catalyse l'hydroxylation de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) et l'oxydation de la DOPA en DOPAquinone. Elle intervient également dans l'oxydation du 5,6-dihydroxyindole (DHI) en indole 5,6-quinone. La protéine agouti exerce une action antagoniste de l' α -MSH en se fixant sur le récepteur des mélanocortines MC1R, et en stabilisant la forme inactive de ce récepteur. La protéine agouti empêche l'activation de la tyrosinase ;
- **La protéine DCT / TRP2** : elle catalyse l'isomérisation de la DOPAchrome (indolene 2-carboxylic acid 5,6-quinone) en DHICA (5,6-dihydroxyindole 2-carboxylic acid) et stabilise la tyrosinase. La protéine TRP2 a un rôle présumé important dans la détoxification au sein des mélanosomes ;
- **La protéine TRP1** : elle catalyse l'oxydation du DHICA et stabilise la tyrosinase. Cette enzyme est nécessaire au transfert de la tyrosinase au mélanosome.

1.1.3.2.3. Migration et transfert des mélanosomes aux kératinocytes

L'étape suivante de la mélanogenèse est la migration des mélanosomes au sein du mélanocyte depuis la région périnucléaire vers les dendrites. Cette migration implique plusieurs structures intra-cellulaires comme les microtubules, les dynéines, les kinésines, les filaments d'actine et la myosine Va (Delevoye *et al.*, 2011 ; CEDEF, 2013). Chaque dendrite est constitué d'un axe central de microtubules et d'un réseau périphérique d'actine subcortical. Les microtubules permettent un transport à longue distance. L'actine contribue au transport de proche en proche ainsi qu'au transfert des mélanosomes. Les kinéines et les dynéines cytoplasmiques servent respectivement au transport antérograde et rétrograde des mélanosomes le long des microtubules pour un transport à longue distance. C'est la myosine Va qui prend en charge la migration des mélanosomes dans le réseau subcortical d'actine à l'aide d'une GTPase, appelée Rab27a, et de la mélanophiline (ou MLPH) (Figure 6) (CEDEF, 2013).

Les modalités de transfert des mélanosomes aux kératinocytes sont à l'heure actuelle inconnues. Plusieurs hypothèses à même d'expliquer le transfert des mélanosomes aux kératinocytes ont été proposées (Delevoye *et al.*, 2011) : (i) la cytophagocytose, (ii) le relargage dans l'espace extracellulaire puis l'endocytose de la mélanine, (iii) la fusion membranaire (communication directe) entre mélanosomes et kératinocytes, (iv) ou encore une endocytose directe via le récepteur PAR-2 (pour *protease-activated receptor 2*). L'existence de petites excroissances sur les dendrites des mélanocytes (les filipodes) a également été rapportée dans ce contexte. Des recherches sur le modèle murin ont récemment démontré que le facteur de transcription FOXN1 joue un rôle clé dans le transfert des mélanosomes (Weiner *et al.*, 2007). Les observations faites sur des souris suggèrent que FOXN1 induit une mélanisation dans les kératinocytes qui l'expriment. Les kératinocytes ainsi activés répondent en émettant des signaux comme la sécrétion du facteur de croissance FGF2 leur permettant de recevoir des mélanosomes. Les kératinocytes receveurs migrent progressivement vers la surface de l'épiderme (la couche cornée) en 3 à 4 semaines. A la fin de ce processus, ils deviendront des cornéocytes (Figures 3 et 6) (Miller *et al.*, 2012).

Figure 6 : Migration des mélanosomes au sein des dendrites mélanocytaires et transfert aux kératinocytes voisins (D'après CEDEF, 2013)



1.1.3.3. Variations individuelles de la pigmentation

La pigmentation finale de la peau et des poils est déterminée par le nombre, la taille, le type et la répartition des mélanosomes. Plusieurs étapes critiques orientent le type de pigmentation cutanée ; par exemple : la migration des mélanoblastes vers l'épiderme, le bon déroulement de la mélanogenèse, la densité des mélanocytes, la bonne conformation et l'expression des différents constituants des mélanosomes, la synthèse de l'eumélanine et de phaeomélanine, le transport des mélanosomes aux dendrites au sein du mélanocyte, le transfert aux kératinocytes et enfin la distribution des mélanines et leur dégradation au niveau des couches superficielles de l'épiderme (Delevoye *et al.*, 2011 ; Miller *et al.*, 2012).

Ainsi, le facteur principal du déterminisme de la couleur de la peau est le type de pigment synthétisé ainsi que l'activité des mélanocytes, et non le nombre des mélanocytes épidermiques. Cependant, il faut également tenir compte de la contribution de trois autres pigments dans la coloration de la peau : l'hémoglobine oxygénée des capillaires (couleur rouge), l'hémoglobine réduite des veinules dermiques (couleur bleue) et le carotène alimentaire (couleur orange) (Miller *et al.*, 2012).

1.1.4. Facteurs de régulation de la mélanogenèse

La mélanogenèse est régulée par une multitude de facteurs intrinsèques ou extrinsèques comme par exemple : la région anatomique, le sexe, la race, l'âge, les changements du cycle pileux, les troubles endocriniens ou encore le climat et les différentes saisons avec une exposition aux rayons UV variable, l'alimentation, le stress, les contacts avec des toxines, des polluants, etc (Miller *et al.*, 2012).

Les facteurs intrinsèques sont principalement des facteurs génétiques et hormonaux. Les facteurs extrinsèques sont surtout les rayons ultraviolets et l'alimentation (Delta, 2009).

1.1.4.1. Les rayons ultraviolets

Les rayons UV sont des ondes électromagnétiques définies par leur longueur d'onde ($\lambda = 200$ à 400 nm). On distingue les UVA de 320 à 400 nm, les UVB de 280 à 320 nm et les UVC de 200 à 280 nm. Les UVC sont, en général, arrêtés par la couche d'ozone, ce sont donc les UVA et UVB auxquels nous sommes exposés. Les rayons UVA et UVB stimulent la mélanogenèse en induisant une réponse immédiate et une réponse tardive. L'action immédiate consiste en une oxydation des pigments pré-existants et une redistribution des mélanosomes, sans augmentation réelle de la mélanogenèse. Ceci a pour résultat dès les premières minutes suivant l'exposition aux UV d'augmenter visiblement la pigmentation de la peau. Cette pigmentation persiste pendant quelques jours. On l'appelle également IPD pour *Immediate pigment darkening*. La réponse tardive est une véritable activation de la mélanogenèse qui fait suite à une augmentation de l'expression du facteur de transcription MITF (pour *microphthalmia-associated transcription factor*), le régulateur majeur de la transcription de nombreux gènes du mélanocyte comme les gènes *Pmel17*, *Mart1*, *Tyr*, et *Dct / Trp2*. À cela s'ajoute une action directe des rayons UV sur les mélanocytes épidermiques, ainsi que sur les kératinocytes qui répondent en augmentant leurs productions d'hormones α -MSH et ACTH, stimulant le récepteur MC1R à la surface des mélanocytes, et donc le processus de mélanogenèse (Guaguere et Alhaidari, 1992).

Il faut noter que le polymorphisme du gène codant le récepteur MC1R est étroitement associé au risque de développement du mélanome. Ce risque concerne en particulier les personnes portant une mutation dans le gène *Mclr*. Ces personnes ont généralement une peau claire, et/ou présentent des tâches de rousseur, avec ou sans cheveux roux (Freedberg *et al.*, 1999). Chez elles, la synthèse de mélanine est très faible et elles présentent un risque plus important de développer un mélanome que le reste de la population générale.

1.1.4.2. Facteurs génétiques

La synthèse et la répartition des pigments mélaniques sur le corps est sous dépendance génétique (Trinquier, 1990). Pour le chien, on distingue quatre types de robes : unipigmentée, bipigmentée, bigarée ou avec des panachures de couleur blanche. Les couleurs de robes sont le reflet des proportions d'eumélanine et de phaeomélanine. Plusieurs gènes canins ont été identifiés et répartis dans différentes catégories. Il existe des gènes déterminant la couleur de base de la robe, des gènes régulant l'intensité de la couleur, et des gènes supprimeurs de la pigmentation (Trinquier, 1990). La robe résulte de la combinaison des effets de chaque gène

et de leurs allèles. Les loci impliqués chez le chien sont nombreux : le locus *A* pour *Agouti*, *B* pour *Black*, *C* pour *Coloration*, *D* pour *Dilution*, *E* pour *Extension*, *G* pour *Grisonnement*, *M* pour *Merle*, *P* pour *Pink-eyed*, *T* pour *Ticking*, *R* pour *Rouanning* (Trinquier I, 1990). Par exemple, le locus *B* contrôle l'expression de l'eumélanine, qui peut donner une couleur allant du brun au noir. Les deux allèles du locus sont B^+ pour la couleur noire et b pour marron. B^+ est un allèle dominant et b un allèle récessif.

1.1.4.3. Facteurs hormonaux

Les hormones hypophysaires mélanotropes sont l'ACTH et l' α -MSH. Elles possèdent une même séquence d'acides aminés nécessaire à leur action mélanotrope (Slominski *et al.*, 2004). Ces hormones sont le produit du clivage de la pro-opiomélanocortine (POMC) qui est synthétisée dans l'hypophyse et dans la peau (Slominski *et al.*, 2004). La production cutanée de la POMC a lieu principalement au niveau des unités kératino-mélanocytaires. L'ACTH et l' α -MSH se fixent sur le récepteur transmembranaire MC1R, dont l'activité est couplée à celle de l'adénylate cyclase. Une augmentation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire stimule la mélanogenèse de plusieurs façons (Trinquier, 1990 ; Bertolotto *et al.*, 2001) :

- en activant la transcription du gène codant le facteur de transcription MITF via une protéine kinase,
- en activant la fixation du facteur de transcription MITF sur le promoteur des gènes codant les enzymes mélanogéniques (tyrosinase, TRP1 et TRP2) stimulant ainsi leur transcription.

L' α -MSH a également une activité sur les mélanocytes. Elle favorise la dispersion des mélanosomes au sein des mélanocytes et leur migration des dendrites vers les kératinocytes (Trinquier, 1990 ; Bertolotto *et al.*, 2001). Le syndrome de Cushing et la maladie d'Addison sont des exemples types d'hyperpigmentation cutanée due à une hypersécrétion d'ACTH.

La mélatonine est une neurohormone synthétisée à partir de la sérotonine dans la glande pinéale. À forte concentration, la mélatonine possède une action antagoniste sur l'ACTH et l' α -MSH (Slominski *et al.*, 2004).

Les hormones stéroïdiennes sont produites par plusieurs glandes endocrines. On distingue les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les androgènes, les œstrogènes et les progestagènes, tous dérivés du cholestérol. Lors d'affections endocriniennes comme le syndrome de Cushing, l'hyperpigmentation atteste du rôle activateur des hormones stéroïdiennes sur la mélanogenèse. Par ailleurs, les œstrogènes sont souvent à l'origine de troubles de la pigmentation. L'existence de récepteurs aux œstrogènes au niveau des mélanocytes humains a été démontrée. En présence d'œstrogènes, une augmentation de l'activité de la tyrosinase et donc une activation de la mélanogenèse peut être observée (Castin et Hearing, 2007). Des cas d'hyperpigmentation peuvent ainsi être rapportés lors de grossesses, de prises de pilule contraceptive ou encore pendant une hormonothérapie.

1.1.4.4. Facteurs tissulaires

Les mélanocytes interagissent avec les autres cellules épidermiques telles que les cellules de Langerhans, les kératinocytes, les fibroblastes, les lymphocytes et les macrophages. De cette façon, plusieurs facteurs de croissance et cytokines peuvent être acheminés jusqu'aux mélanocytes et réguler l'activité mélanocytaire (Fontenay, 2007). Différentes cytokines participent au processus de l'inflammation et aux réactions immunitaires, ce qui permet d'expliquer l'apparition de troubles de la pigmentation lors de ces événements (Slominski *et al.*, 2004). On peut noter quelques exemples : le facteur de croissance bFGF (pour *basic fibroblast growth factor*) produit par les kératinocytes épidermiques stimule la mélanogenèse après induction par les rayons UV (Slominski *et al.*, 2004). Les interleukines IL1 (pour *interleukine 1*), IL6 (pour *interleukine 6*) et le TNF- α (pour *tumor necrosis factor alpha*) possèdent une action inhibitrice sur la mélanogenèse, tout comme le leucotriène 4 (Guaguere et Alhaidari, 1992).

1.2. Généralités sur le mélanome

Le mélanome est défini comme une tumeur mélanocytaire maligne, à distinguer du mélanocytome qui correspond à une tumeur bénigne des mélanocytes (Ramos, 2007). Chez l'Homme, comme chez le chien, le mélanome peut apparaître sur la peau (mélanome cutané), au niveau de l'œil (mélanomes choroïdien ou irien) ou encore sur des muqueuses (mélanome de la muqueuse buccale, fréquent chez le chien) (Withrow et Vail, 2007 ; Bower et Waxman, 2010). Les localisations du mélanome diffèrent en terme de fréquence entre l'Homme et le chien.

1.2.1. Présentation clinique du mélanome

1.2.1.1. Le mélanome chez l'Homme

Le mélanome affecte toutes les classes d'âges avec une incidence plus élevée entre 40 et 50 ans. Il touche de plus en plus de jeunes adultes, âgés de moins de 30 ans, ce qui était autrefois très rare (Bower et Waxman, 2010 ; INCa, 2013). Ce type de tumeur demeure anecdotique chez les individus pré-pubères. Le site de préférence s'avère être la peau (Bower et Waxman, 2010).

Un mélanome peut se développer sur une peau saine, sans lésion pré-existante, ou au niveau d'un grain de beauté que l'on appelle naevus. Ces tumeurs se présentent généralement sous l'aspect de lésions asymétriques à bords irréguliers, avec une couleur non homogène (brun-noir nuancé avec parfois des zones dépigmentées blanches), un diamètre souvent supérieur à 6 mm et une capacité d'évolution très importante en termes de taille, de forme, de relief et de couleur. C'est ce qu'on appelle la règle « **ABCDE** » (INCa, 2013) : **A** pour asymétrie, **B** pour bords irréguliers, **C** pour couleur, **D** pour diamètre et **E** pour évolution.

On définit 6 types de mélanomes selon des critères anatomo-cliniques (Bower et Waxman, 2010 ; Soria *et al.*, 2012) :

- **Le mélanome des muqueuses** : surtout rencontré au niveau des muqueuses buccales ou ano-génitales ;
- **Le mélanome oculaire** ;
- **Les mélanomes cutanés** qui sont de 4 types distincts :
 - **Le mélanome à extension superficielle ou *Superficial Spreading Melanoma* (SSM)** : tumeur la plus fréquente, 60 à 70 % des tumeurs ;
 - **Le mélanome sur mélanose de Dubreuilh ou *Lentigo Malignant Melanoma* (LMM)** : tumeur apparaissant avec une fréquence de 5 à 10 %, surtout au niveau du visage et chez les sujets de plus de 60 ans ;
 - **Le mélanome acral lentigineux ou *Acral Lentiginous Melanoma* (ALM)** : observé avec une fréquence de 2 à 10 %, surtout sur les extrémités et les ongles ;
 - **Le mélanome nodulaire ou *Nodular Melanoma* (NM).**

Pour tous les types anatomo-cliniques, le pronostic du mélanome primitif est essentiellement lié à l'épaisseur des lésions tumorales évaluée par la méthode dite de Breslow et l'état d'ulcération des lésions (INCa, 2013). Lors du bilan d'extension globale, c'est le nombre de métastases ganglionnaires qui reste le facteur pronostique principal. On tient également compte des métastases en transit et de la présence ou non de métastases à distance. Ainsi, l'épaisseur et l'ulcération, l'atteinte des nœuds lymphatiques et la présence ou non de métastases à distance constituent trois critères qui vont déterminer le stade du mélanome (Bower et Waxman, 2010).

L'INCa définit 4 stades de mélanomes chez l'Homme :

- **Stade I** : mélanome localisé, de faible épaisseur ou non ulcéré, sans atteinte des nœuds lymphatiques, ni métastase (en transit et à distance) ;
- **Stade II** : mélanome localisé de plus grande épaisseur ou avec ulcération, sans atteinte des nœuds lymphatiques, ni métastase (en transit et à distance) ;
- **Stade III** : mélanome présentant un envahissement loco-régional (atteinte des nœuds lymphatiques, métastases en transit) quelque soit l'épaisseur tumorale ;
- **Stade IV soit 'mélanome métastatique'** : mélanome présentant des métastases à distance quelque soit l'épaisseur tumorale et l'atteinte ganglionnaire.

1.2.1.2. Le mélanome canin

Les tumeurs des mélanocytes et des mélanoblastes sont des tumeurs cutanées relativement communes dans l'espèce canine. Elles représentent 5 à 7 % des tumeurs cutanées du chien. Comme la plupart des processus tumoraux, le mélanome touchent les chiens âgés, de 9 à 11 ans environ (Marignac, 2010). Il n'y a pas de prédisposition liée au sexe, même si des études anciennes ont pu montrer une majorité de mâles porteurs de ces tumeurs. Par ailleurs, les chiens à la peau pigmentée sont plus vulnérables, comme c'est le cas dans les races suivantes : scottish terrier, airedale, boston terrier, cocker spaniel, boxer, labrador et golden retriever, setter irlandais, schauzer, caniche et chow-chow (Schultheiss, 2006). Néanmoins concernant la prédisposition raciale au sens strict, la littérature apporte des résultats divergents. Il semble que le mélanome buccal soit plus fréquent chez l'épagneul cocker spaniel, le caniche nain, le golden retriever, le labrador retriever et le chow-chow. La race peut apporter néanmoins des informations pronostiques ; par exemple, 75 % des tumeurs mélanocytaires chez le doberman, le pinscher et le schnauzer miniature sont bénignes alors que 85 % sont malignes chez le caniche nain. L'analyse épidémiologique portant sur 2 350 chiens atteints a pu montrer que le caniche est prédisposé au mélanome buccal alors que le beauceron et le schnauzer présentent plutôt des mélanomes cutanés (Gillard *et al.*, 2013).

Dans l'espèce canine, les tumeurs mélanocytaires apparaissent préférentiellement au niveau des zones velues ou dans la cavité buccale. L'association de cause à effet établie avec l'exposition aux UV chez l'Homme ne peut donc pas être acceptée d'emblée dans l'espèce canine. Les tumeurs mélanocytaires cutanées canines peuvent être aussi bien malignes que bénignes, et apparaître n'importe où sur le corps de l'animal. À la différence du mélanome cutané humain, il semble que la plupart des lésions tumorales soient intradermiques chez le chien et non épidermiques comme c'est le cas chez l'Homme (Gillard *et al.*, 2013).

Il faut bien différencier les lésions bénignes des lésions malignes ; les lésions bénignes sont des masses mieux délimitées, non adhérentes aux tissus sous jacents, bien pigmentées qui peuvent être ulcérées tout en conservant leur nature bénigne (Soyer et Doliger, 2011). Les caractéristiques des tumeurs malignes et bénignes sont bien différentes. Le mélanome se manifeste sous la forme d'une lésion unique, une plaque ou un nodule, de 0,5 à 10 cm, pigmentée ou non et fréquemment ulcérée, à l'évolution très rapide (Withrow et Vail, 2007 ; Marignac, 2010). Le Tableau 2 décrit les différents facteurs en faveur d'un mélanome chez le chien.

Tableau 2 : Éléments de différenciation entre tumeurs mélanocytaires bénignes et malignes (D'après Withrow et Vail, 2007)

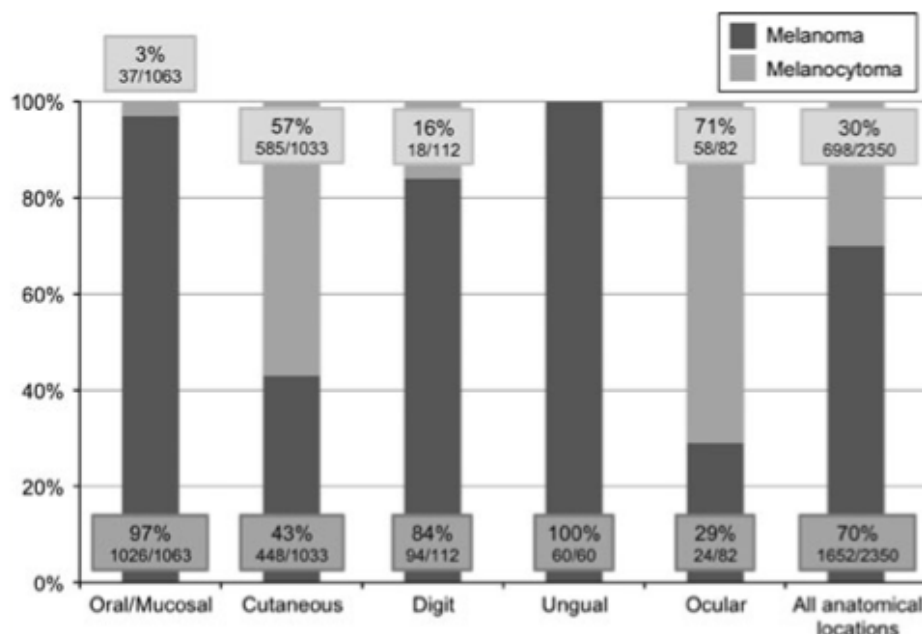
Facteurs pronostiques connus ou potentiels du mélanome chez le chien	
Facteur :	Commentaires :
Localisation	Les tumeurs sur des zones velues sont généralement bénignes alors que celles qui sont localisées au niveau des jonctions cutanéomuqueuses (exceptées les paupières) et des griffes, sont plutôt malignes, comme pour les lésions buccales (Bolon <i>et al.</i> , 1990 ; Roels <i>et al.</i> , 1999).
Histologie	Le critère histologique de malin versus bénin est très prédictible du comportement biologique tumoral. La détermination est principalement basée sur l'indice mitotique mais l'invasion lymphatique est aussi indicatrice d'une tumeur maligne (Bostock, 1986 ; Bolon <i>et al.</i> , 1990 ; Aronsohn et Carpenter, 1990 ; Millanta <i>et al.</i> , 2002 ; Smith <i>et al.</i> , 2002).
Race	Le mélanome est le plus souvent bénin chez le doberman, le pinscher et le schnauzer miniature ; la tumeur est par ailleurs plutôt maligne chez le caniche miniature (Bolon <i>et al.</i> , 1990).
Taux de prolifération cellulaire	Il a été montré que les techniques d'histochimie et d'immunohistochimie mesurant la prolifération cellulaire sont de bons facteurs pronostiques (Roels <i>et al.</i> , 1999 ; Laprie <i>et al.</i> , 2001 ; Millanta <i>et al.</i> , 2002).

On décrit plusieurs localisations chez le chien : le mélanome buccal (Figure 7), le mélanome digité avec notamment le mélanome unguéal (Figure 8), le mélanome cutané, le mélanome uvéal et le mélanome cutanéomuqueux. La majeure partie des mélanomes canins affectant la gueule et les doigts sont malins, alors que ceux qui touchent la peau et l'uvée antérieure sont pour la plupart de nature bénigne. En effet, les tumeurs qui se développent au sein des zones velues sont souvent moins agressives que celles que l'on trouve dans des zones glabres de la jonction cutanéomuqueuse ou de la cavité buccale (Tableau 2). L'analyse histologique de Gillard *et al.* (2013) portant sur 2 350 chiens a permis de corréler la distribution des tumeurs mélanocytaires malignes et bénignes et leur localisation (Figure 7).

Figure 7 : Distribution de 2 350 tumeurs mélanocytaires canines de nature bénigne / maligne en fonction de leur localisation (D'après Gillard *et al.*, 2013)

Melanoma = mélanome ; *melanocytoma* = mélanocytome ; *oral / mucosal* = oral / muqueux ; *cutaneous* = cutané ; *digit* = digité ; *ungual* = unguéal ; *ocular* = oculaire et *all anatomical locations* = tout site anatomique confondu.

On notera en particulier la prépondérance des tumeurs malignes parmi les tumeurs buccales (97 % de malignes) et digitées (84 % de malignes) dont la région unguéale (100 % de malignes).



On peut distinguer quatre monographies principales dans l'espèce canine (Soyer et Doliger, 2011) :

- **Le mélanome buccal** (Figure 8) : Il est le plus fréquemment rencontré (56 % des mélanomes canins), le plus agressif (80 % présentent des métastases au moment du diagnostic) et le plus proche du mélanome humain. Le mélanome buccal est le plus souvent de très haut grade de malignité avec un diagnostic tardif de stades cliniques avancés : du stade II caractérisé par de l'ostéolyse aux stades III (métastases ganglionnaires) ou IV (métastases à distance) ;
- **Le mélanome cutané** : Il est décrit plus rarement (11 % des mélanomes canins). Il s'avère plus difficile de déterminer son degré de malignité ; des formes bénignes et malignes sont observées dans les mêmes races (chiens à robe noire) comme les labradors, caniches, cockers, scottishs et schnauzers. Son potentiel métastatique est généralement plus faible que le mélanome buccal avec seulement 10 à 15 % de métastases, contrairement au mélanome cutané décrit chez l'Homme ;
- **Le mélanome unguéal** (Figure 9) : Il correspond à 8 % des mélanomes canins, il est principalement malin avec des métastases observées dans 58 % des cas, surtout dans les races telles que le setter irlandais et le golden retriever ;
- **Le mélanome oculaire** : Il est rare (2 % des mélanomes canins) et plus souvent de nature bénigne. Il demeure proche du mélanome oculaire humain et concerne préférentiellement le berger allemand, ainsi que le labrador et le golden retriever.

Figure 8 : Mélanome buccal au niveau de la mandibule droite chez un labrador retriever de 10 ans (D'après De Lorimier, 2013)

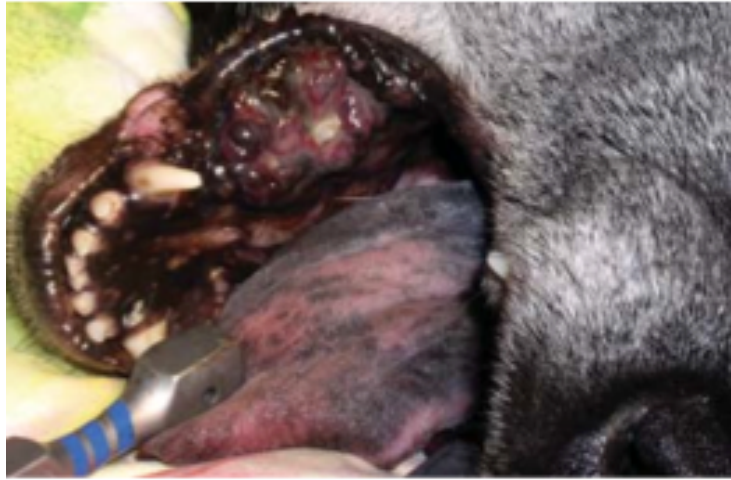


Figure 9 : Mélanome digité au niveau du doigt 4 du membre thoracique droit chez un mastiff de 7 ans (D'après De Lorimier, 2013)

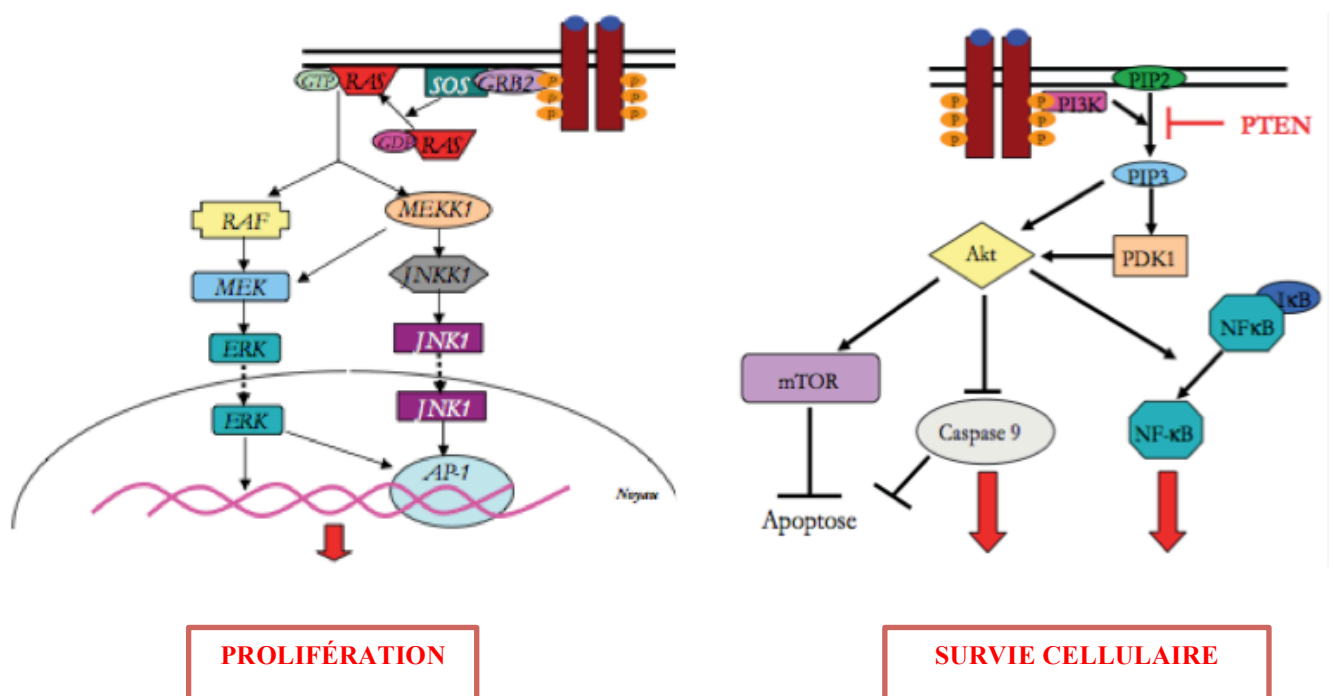


1.2.2. Étiologie du mélanome

1.2.2.1. Données génétiques chez l'Homme

L'étiopathogénie du mélanome est le sujet de nombreuses recherches qui ont en particulier incriminé les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs), dont les gènes sont fréquemment amplifiés ou mutés dans les mélanomes (Soria *et al.*, 2012). Les RTKs représentent une importante famille de récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase intra-cytoplasmique. Ils sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires. L'activation de ces récepteurs se fait par fixation du ligand induisant une dimérisation du récepteur et une autophosphorylation de résidus tyrosine. Le récepteur permet ainsi la transduction du signal via notamment deux grandes voies de signalisation : la voie des MAP kinases et la voie PI3-kinase / AKT (Monnier *et al.*, 2004). Ces deux voies de transduction conduisent à l'activation de protéines impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, l'angiogenèse, la différenciation cellulaire et la migration cellulaire (Figure 10). Les voies de signalisation des récepteurs à tyrosine kinase jouent un rôle pivot dans l'apparition de certaines tumeurs, à la suite d'une activation inadéquate de ces voies aboutissant à une prolifération anormale des cellules, puis à un processus de tumorigénèse (Monnier *et al.*, 2004).

Figure 10 : Voie de signalisation du récepteur à l'EGF (D'après Monnier *et al.*, 2004)
À gauche voie des MAP kinases et à droite la voie de PI3K / AKT / PTEN



Au bilan, différentes altérations moléculaires ont été identifiées dans les mélanomes humains (Tableau 3).

Tableau 3 : Diversités des altérations moléculaires dans les mélanomes humains (D'après Soria *et al.*, 2012)

Altérations moléculaires	Fréquence
<i>B-RAF</i> muté, <i>PTEN</i> inactivé	20 %
<i>B-RAF</i> muté, <i>AKT</i> amplifié	20 %
<i>B-RAF</i> muté sans mutation de la voie PI3K/AKT	10 %
<i>N-RAS</i> muté	15 %
<i>GAB2</i> amplifié	10 %
<i>KIT</i> muté	2 %
<i>KIT</i> et <i>CDK4</i> surexprimé	2 %
<i>CD4</i> muté	1 %
<i>B-RAF</i> / <i>N-RAS</i> / <i>KIT</i> allèles sauvages, gènes mutés non identifiés	35 %

De récentes études moléculaires (Garbe *et al.*, 2012) ont révélé l'hétérogénéité génétique du mélanome. Elles ont en effet identifié des modifications moléculaires distinctes selon la localisation de la tumeur et le facteur de risque que représentent les UV. Par exemple, il est décrit qu'une exposition intermittente aux UV est souvent associée à des mélanomes situés sur le tronc et les extrémités et portant une mutation dans le gène *B-RAF*. Une exposition chronique aux UV semble être associée aux mélanomes de la tête et du cou et est modérément liée à une mutation dans le gène *N-RAS*. Les mélanomes sans lien avec une exposition au soleil sont en général des mélanomes acraux et des muqueuses, avec une faible fréquence de mutations dans le gène *KIT*.

On sait que des mutations du gène *B-RAF* sont fréquemment observées dans les mélanomes. Environ 40 % des mélanomes présentent une mutation dans le gène *B-RAF* (Davies *et al.*, 2002) et 90 % des mutations sont observées au niveau du codon 600. La mutation V600E de *B-RAF* correspond à la substitution d'un seul acide aminé, une valine pour un acide glutamique (Rebecca *et al.*, 2012). La protéine B-RAF est une protéine à activité sérine thréonine kinase de la famille RAF qui régule les protéines MAP kinase et ER kinase. La protéine B-RAF appartient à la voie de signalisation intracellulaire du récepteur à l'EGF (pour *epithelial growth factor*) et les mutations de *B-RAF* activent la voie de signalisation de l'EGF (Figure 10).

Tout comme les mutations dans le gène *B-RAF*, les mutations dans le gène *N-RAS* sont fréquentes dans les mélanomes. Les protéines RAS sont des GTPases que l'on retrouve sur la face cytoplasmique des cellules. Elles appartiennent à la voie intracellulaire de signalisation du récepteur à l'EGF. Dans une étude comptant 677 patients, le *M. D. Anderson Cancer Center* (Houston, Texas, USA) a relevé que 47 % d'entre eux portaient une mutation dans le gène *B-RAF* et 20 % une mutation dans le gène *N-RAS* (Jakob *et al.*, 2011). Il existe des antagonistes de la protéine B-RAF. En revanche, il n'existe pas d'antagoniste de la protéine

N-RAS. Pour contrer les effets d'une mutation au locus *N-RAS*, les stratégies actuelles visent à agir de façon simultanée sur les voies MAP kinases et PI3K.

Des mutations activatrices et des amplifications du gène *KIT* ont aussi été identifiées dans les mélanomes. Une mutation de *KIT* a été observée dans 39 % des mélanomes des muqueuses, 36 % des mélanomes acraux et 28 % des mélanomes corrélés à une exposition chronique de la peau aux UV (Curtin *et al.*, 2006). Récemment, il a été montré que la protéine KIT peut être une cible thérapeutique d'intérêt : des patients portant une mutation au locus *KIT* ont présenté des réponses durables à un traitement anti-KIT (Hodi *et al.* 2008).

Des mutations dans les gènes *GNAQ* (pour *guanine nucleotide binding protein, q polypeptide*) et *GNA11* (pour *guanine nucleotide binding protein, alpha 11*) codant des sous-unités alpha de protéines G hétérotrimériques ont également été identifiées dans des mélanomes uvéaux. En effet, dans ce type de mélanomes, on n'observe pas de mutation dans les gènes *B-RAF*, *N-RAS* et *KIT*, mais des mutations activatrices dans les gènes *GNAQ* et *GNA11*. Ces mutations ont également pour effet d'activer la voie des MAP kinases. En accord avec les prédictions, les mélanomes uvéaux chez les sujets portant une mutation au locus *GNAQ* ou *GNA11* présentent une sensibilité à l'inhibition de MEK (Ambrosini et Schwartz, 2010).

Une meilleure connaissance de la voie de signalisation des MAP kinases et de la voie de signalisation PI3K / AKT a permis d'identifier des cibles thérapeutiques anticancéreuses (Quéreux, 2013). C'est le cas des inhibiteurs de B-RAF, en particulier le vemurafenib.

1.2.2.2. Données génétiques chez le chien

Les données génétiques concernant le mélanome canin sont peu nombreuses. Une étude récente sur une cohorte de 95 chiens atteints a permis d'obtenir quelques informations (Gillard *et al.*, 2013). Le but de l'étude était de comparer le mélanome de l'Homme à celui du chien, et d'identifier des similitudes et des différences entre les sous-types de mélanomes canins. Des mutations somatiques dans six des gènes fréquemment mutés dans les mélanomes humains ont été recherchées dans une série de 95 mélanomes canins. Les 6 gènes retenus étaient *B-RAF*, *N-RAS*, *PTEN*, *KIT*, *GNAQ* et *CDK4*. Ces gènes ont été séquencés dans des tissus tumoraux et sains prélevés sur 35 chiens atteints de mélanomes. Des tissus sains prélevés sur 28 chiens dépourvus de mélanome ont été utilisés comme témoins. Aucune altération des gènes *GNAQ*, *KIT*, *CDK4* et *B-RAF* n'a été trouvée dans ce premier lot de tumeurs qui comprenait 27 mélanomes buccaux et 8 mélanomes cutanés. Des variants somatiques ont été identifiés dans les gènes *N-RAS* et *PTEN* aux positions Q61 et G251, respectivement. Ces mutations correspondent à des mutations fréquentes identifiées chez l'Homme. C'est pourquoi dans un second temps, des mutations *N-RAS Q61*, *PTEN G251*, et *B-RAF V600* ont été recherchées dans 50 mélanomes buccaux et 10 mélanomes cutanés prélevés sur 60 chiens. Sur un total de 95 mélanomes (77 mélanomes buccaux et 18 mélanomes cutanés), des mutations *N-RAS Q61* ont été identifiées dans 3 mélanomes buccaux. Deux mélanomes buccaux portaient une mutation *PTEN G251*. Un mélanome buccal portait une mutation *N-RAS Q61* et une mutation *PTEN G251*. Aucune altération génétique n'a été détectée au locus *B-RAF*. Les résultats de cette étude suggèrent qu'il existe des anomalies communes aux mélanomes de l'Homme et du chien. Ce résultat préliminaire plaide en faveur de l'intérêt de la pathologie comparée des mélanomes canins et humains.

De nombreux projets de recherche en génétique existent. Le projet LUPA a été initié en 2008 par la Commission Européenne (CE) (Lequarré *et al.*, 2011). Il a été nommé LUPA en rappel de la louve qui nourrit les jumeaux fondateurs de Rome, Romulus et Rémus. Ce projet a rassemblé de 2008 à 2012 des généticiens en médecine humaine et vétérinaire, des cliniciens et anatomopathologistes français, suédois, anglais et américains. Il a regroupé 20 écoles vétérinaires et universités, réparties dans 12 pays dans le but de récolter le matériel génétique de 10 000 chiens pour une vingtaine de maladies. Le laboratoire CNRS de l'Université Rennes 1 dirigé par Catherine André (UMR 6061 – Génétique et développement, groupe « Génétique du chien ») a recherché activement l'origine génétique de différents types de mélanomes chez le chien (mélanome buccaux, cutanés, oculaires et unguéaux) (Soyer et Doliger, 2011). L'identification de l'origine génétique de mélanomes canins dans des races prédisposées au développement des mélanomes a permis de révéler des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'apparition des tumeurs qui pourrait servir la clinique du chien et de l'Homme (Gillard *et al.*, 2013).

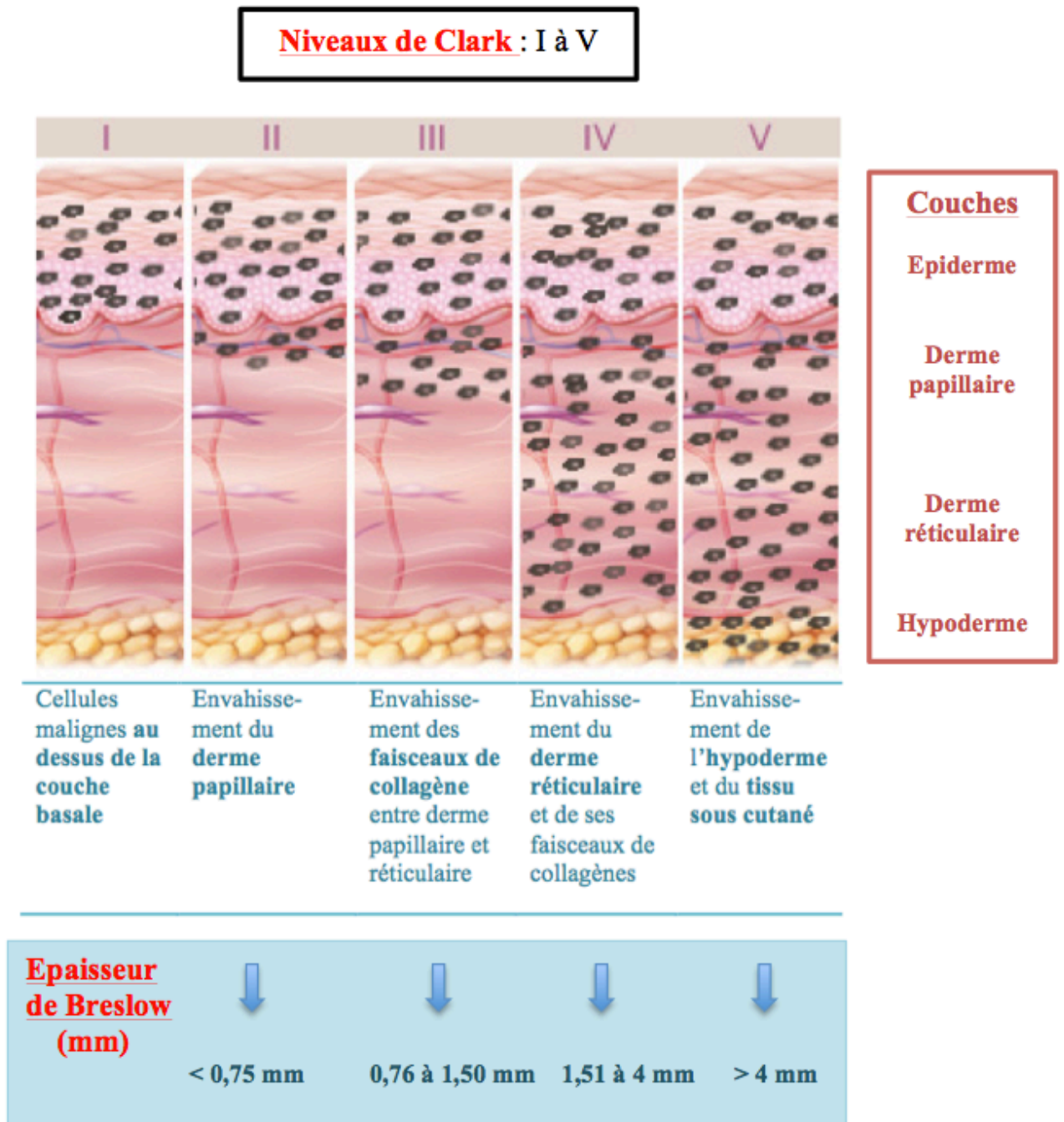
1.2.3. Outils diagnostiques disponibles

L'outil diagnostique de première intention est la cytologie : les mélanocytes sont facilement identifiables par la présence de mélanosomes pigmentés par l'eumélanine et la phaeomélanine. Les critères cytologiques orientent le plus souvent facilement vers une tumeur mélanocytaire. Le recours à l'analyse histologique permet ensuite de confirmer la suspicion de mélanome avec la précision du degré d'agressivité : l'indice mitotique, la recherche des embolus et métastases lymphatiques permettent la détermination de la nature maligne ou bénigne. L'immunomarquage précise le pronostic lorsqu'il est difficile de statuer sur le caractère malin et pour confirmer l'origine mélanocytaire de la tumeur quand la masse demeure indifférenciée (Soria *et al.*, 2012 ; INCa, 2013). En complément, un bilan d'extension globale est nécessaire (Bower et Waxman, 2010) :

- A minima, un **bilan thoracique** soit par radiographie (trois vues : une face et les deux profils), soit par tomodensitométrie ;
- Un **bilan d'extension locale** pour les mélanomes buccaux permis par tomodensitométrie afin d'objectiver une ostéolyse notamment ;
- L'examen précis des **nœuds lymphatiques environnants** (cytologie ou tomodensitométrie).

En médecine humaine, la prise de décision du traitement dépend plus précisément de l'épaisseur du mélanome et du degré d'invasion de la peau. L'épaisseur tumorale est mesurée par l'indice de Breslow en millimètre et le degré d'invasion par la méthode de Clark (niveaux I à V) (INCa, 2013 ; AIM, 2013). L'indice de Breslow et le niveau de Clark se complètent (AIM, 2013). Ce sont des facteurs pronostiques qui permettent de classer les mélanomes en plusieurs stades (Saiag *et al.*, 2002 ; INCa, 2013). Dans le niveau I de Clark, l'épiderme seulement est touché alors que le derme papillaire est affecté dans les niveaux II et III. Le niveau IV est atteint lorsque le derme réticulaire est affecté. Le niveau V est atteint lorsque l'hypoderme est affecté (Figure 11). Le diagnostic clinique précoce peut être amélioré grâce à la mise en place d'un examen clinique minutieux avec un grossissement de 10 à 20 fois de la jonction dermo-épidermique sous immersion, permis par la dermatoscopie ou la microscopie par épiluminescence (Soria *et al.*, 2012).

Figure 11 : Niveau de Clark et indice de Breslow (D'après INCa, 2013 et AIM, 2013)



2. Mélanome et thérapeutique en médecine humaine

2.1. Traitement chirurgical

Le traitement chirurgical consiste en la réalisation d'une exérèse large de la tumeur ; les marges sont choisies en fonction de l'épaisseur du mélanome (Bower et Waxman, 2010 ; INCa, 2013). La prise en charge du mélanome se fait généralement en deux temps : le mélanome est d'abord retiré, puis après obtention de l'analyse histologique (dont l'épaisseur de Breslow), la reprise de l'exérèse est effectuée avec des marges saines adaptées (Tableau 4) (Lipsker et Cribier, 2005 ; Bower et Waxman, 2010 ; INCa, 2013).

Tableau 4 : Épaisseur de Breslow et marges d'exérèse correspondantes (D'après Lipsker et Cribier, 2005 ; INCa, 2013)

Épaisseur de Breslow	Marges chirurgicales conseillées
Intra-épidermique	0,5 cm
0 à 1 mm	1 cm
1,01 à 2 mm	1 – 2 cm
2,01 à 4 mm	2 cm
> 4 mm	2 – 3 cm

2.2. Traitements adjuvants

Les traitements adjuvants après chirurgie ont pour principal objectif d'augmenter la survie par l'élimination des métastases (Soria *et al.*, 2012). Le choix de tel ou tel traitement est objectivé par un ensemble de facteurs, le principal étant le stade du mélanome (Tableau 5) (INCa, 2013). La radiothérapie, la chimiothérapie et la thérapie ciblée sont les différentes options thérapeutiques envisageables.

Tableau 5 : Options thérapeutiques possibles selon le stade du mélanome chez l'Homme (D'après INCa, 2013)

Stade	Mélanome stade I à II	Mélanome stade III	Mélanome stade IV
Traitement	○ Traitement chirurgical ○ Immunothérapie adjuvante (interféron) proposée si épaisseur > 1,5 mm	○ Traitement chirurgical de la tumeur primitive et des métastases ganglionnaires ○ Immunothérapie adjuvante (interféron) proposée ○ Radiothérapie externe ○ Chimiothérapie si tumeur inopérable	○ Traitement chirurgical (exérèse de métastases envisageable) ○ Radiothérapie externe (métastases osseuses) ○ Chimiothérapie (palliative) ○ Immunothérapie (spécifique)

2.2.1. Notion de réponse au traitement et critères d'évaluation

La méthode de référence d'évaluation des traitements anticancéreux repose sur la mesure de la taille des lésions tumorales (Fournier *et al.*, 2011). Les critères RECIST pour *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors* ont été définis en 2000 par les organismes américain, européen et canadien de recherche en cancérologie afin d'uniformiser l'évaluation des réponses aux traitements (Therasse *et al.*, 2000). Cette méthode s'applique uniquement aux tumeurs solides et tient compte du plus grand diamètre des lésions tumorales du patient.

Avant la mise en place d'un traitement, une liste exhaustive des lésions, primaires ou secondaires, est dressée. Les lésions sont ensuite divisées en deux catégories :

- **Les lésions cibles** : leur plus grand diamètre est supérieur à 10 mm et leurs limites sont assez bien définies pour que leur mesure soit considérée comme fiable. Les lésions cibles permettent de calculer la somme totale des plus grandes longueurs (SPGL) de toutes les lésions choisies. La SPGL avant le début du traitement sert de référence.
- **Les lésions non cibles** : c'est l'ensemble des lésions restantes, qui ne remplissent pas les critères des lésions cibles.

Une fois sous traitement, on effectue un suivi du patient et on cherche à déterminer la réponse globale au traitement. La réponse au traitement est définie par l'évolution de chacune des lésions pré-répertoriées. On distingue (Fournier *et al.*, 2011) :

- La réponse des lésions cibles : évaluée par le pourcentage de modification de la somme de leurs plus grandes longueurs,
 - **Réponse complète** (CR pour *complete response*) : disparition de toutes les lésions cibles.
 - **Réponse partielle** (PR pour *partial response*) : diminution d'au moins 30 % par rapport à la somme avant traitement.
 - **Maladie progressive** (PD pour *progressive disease*) : augmentation d'au moins 20 % par rapport à la plus petite somme mesurée au cours du suivi.
 - **Maladie stable** (SD pour *stable disease*) : ni CR, ni PR, ni PD.
- La réponse des lésions non cibles : CR, PD et SD évalués subjectivement,
- L'apparition de nouvelles lésions.

La réponse tumorale globale au traitement résulte de la combinaison des réponses précédentes pour l'ensemble des lésions listées (CR, PR, PD ou SD) ; c'est ce qu'on appelle réponse objective (ou réponse uniquement selon les auteurs) (Taieb *et al.*, 2009). Les critères RECIST ont été actualisés en 2009 (Eisenhauer *et al.*, 2009). Les modifications majeures concernent le nombre maximal de lésions cibles choisies qui est passé de 10 à 5 par patient, et de 5 à 2 par organe. La prise en compte des nœuds lymphatiques fait également partie de ces modifications. A la différence des lésions cibles, c'est le plus petit axe qui est ici mesuré. Un plus petit axe de 10 mm pour un nœud lymphatique est considéré comme normal ; un nœud lymphatique peut donc être choisi comme lésion cible si son plus petit axe est supérieur ou égal à 15 mm et comme lésion non cible si son plus petit axe est compris entre 10 et 15 mm. La version 1.1 des critères RECIST précise qu'une progression des lésions cibles est atteinte si la SPGL est augmentée d'au moins 20 % par rapport à la somme de référence et si cette augmentation est supérieure ou égale à 5 mm en valeur absolue.

La méthode RECIST permet la comparaison de l'efficacité des différentes molécules dans les protocoles d'essais thérapeutiques. Selon le type de traitement, les critères RECIST ont une application limitée ; les modifications de la taille des lésions peuvent être minimales voire nulles alors que la survie du patient est nettement prolongée (Hebbar *et al.*, 2009). Cette limite s'applique en particulier aux traitements en thérapie ciblée. D'autres critères d'évaluation (autre que la taille) sont donc étudiés. Certains sont basés sur un seuil de réponse différent (Thiam *et al.*, 2010). D'autres, comme les critères de Choi *et al.*, tiennent compte des modifications de la densité tumorale, indicatrice du processus de nécrose (Bruix *et al.*, 2001 ; Choi *et al.*, 2007). Choi *et al.* (2007) définissent ainsi une réponse comme une diminution de 10 % de la taille ou bien de 15 % de la densité sur des images scanner après utilisation d'un produit de contraste.

2.2.2. Radiothérapie

L'irradiation a pour but de détruire les cellules cancéreuses tout en préservant au mieux les tissus sains et les organes avoisinants (INCa, 2013). Les rayons sont émis en faisceau par un accélérateur de particules ou par une source radioactive. Le traitement d'irradiation de la tumeur nécessite cependant d'avoir bien identifié le type tumoral et réalisé un bilan d'extension afin de connaître l'extension locale ainsi que la présence d'éventuelles lésions métastatiques (INCa, 2013).

Chez l'Homme, la radiothérapie est généralement peu indiquée dans le traitement du mélanome (Bower et Waxman, 2012 ; INCa, 2013). On peut y avoir recours dans le cadre d'une radiothérapie palliative, dans le but de soulager une douleur lors de métastases osseuses (par exemple, une compression de la moelle épinière) ou encore sur les métastases cérébrales (Rate *et al.*, 1988 ; Andrews *et al.*, 2004). Il n'y a pas de rôle démontré d'une radiothérapie adjuvante dans le cadre du traitement des nœuds lymphatiques régionaux. La radiothérapie est efficace sur des métastases cérébrales petites et peu nombreuses : une amélioration des déficits neurologiques avec la radiothérapie est observée dans 50 à 75 % des cas selon les études (Rate *et al.*, 1988 ; Andrews *et al.*, 2004).

2.2.3. Chimiothérapie cytotoxique

Chez l'Homme, la chimiothérapie cytotoxique systémique (appelée chimiothérapie dans le reste du document) est proposée pour les mélanomes avancés de stades III et IV, présentant donc un envahissement locorégional et/ou des métastases à distance. La chimiothérapie permet la destruction des cellules cancéreuses en agissant sur les mécanismes de division des cellules (INCa, 2013). L'action des médicaments chimiothérapiques n'étant pas spécifique, les cellules saines comme les cellules néoplasiques vont être touchées d'où l'existence de nombreux effets secondaires lors du traitement. La dacarbazine, ou la diméthyl-triazéno-imidazole-carboxamide (DTIC), est la molécule la plus utilisée dans le traitement du mélanome (Soria *et al.*, 2012). Elle a conduit à un taux de rémission objective (RO) de l'ordre de 20 % sur les 20 dernières années. Il existe tout de même une toxicité digestive non négligeable à mettre en relation avec le métabolite actif du DTIC, le mitozolomide obtenu par transformation enzymatique dans le foie (Soria *et al.*, 2012). Il faut donc relever l'intérêt d'une nouvelle molécule de la même famille, le témozolomide, qui se transforme directement en mitozolomide, sans passage hépatique, douée d'une bonne disponibilité par absorption orale et d'une tolérance digestive satisfaisante. Des études ont d'ailleurs démontré que les taux de réponse du témozolomide et du DTIC sont égaux (16,5 % pour la réponse au témozolomide) (Soria *et al.*, 2012). La famille des nitroso-urées est aussi intéressante dans le cadre d'un protocole de chimiothérapie notamment avec la carmustine (BCNU), la lomustine (CCNU), la sémostine (méthyl-CCNU) et la fotémustine qui donnent un taux de réponse compris entre 13 et 22 %. La combinaison de ces agents chimiothérapiques n'a pas montré d'augmentation du taux de réponse dans le contexte du mélanome (Soria *et al.*, 2012).

2.2.4. Thérapie ciblée

En médecine humaine, le développement récent de thérapies moléculaires ciblées a permis une importante modification de la prise en charge des cancers tel que le mélanome (Quéreux, 2013). Après des années de résultats très décevants, deux molécules ont permis une réponse dans le mélanome métastatique : le vemurafenib (un inhibiteur de kinase, plus précisément de la protéine B-RAF) et l'ipilimumab (un anti-CTLA-4). Ces résultats ont été confirmés par les phases III objectivant une augmentation de survie des patients comparé à des patients sous chimiothérapie, traités par dacarbazine (Chapman *et al.*, 2011 ; Robert *et al.*, 2011). Les thérapies ciblées anticancéreuses diffèrent de la chimiothérapie par leur action inhibitrice beaucoup plus spécifique sur une ou plusieurs voies de signalisation ou sur des récepteurs impliqués dans la progression tumorale. On note en particulier le développement d'anticorps monoclonaux (désignés par le suffixe '-mab', pour *monoclonal antibodies*) dirigés de façon exclusive contre des protéines de structures et les inhibiteurs de la voie MAP kinases qui sont de petites molécules à activité mono- ou multi-inhibitrice de tyrosine kinases (portant le suffixe '-nib') (Sibaud *et al.*, 2012).

2.2.4.1. Immunothérapies

Le concept d'immunothérapie dans le cadre d'une thérapeutique anti-tumorale est le fait d'utiliser le système immunitaire comme cible ou outil, avec comme objectif de renverser la tendance à l'immunosuppression vers un état d'activation du système. Ceci est intéressant, d'une part, par la spécificité de la réaction immunitaire qui devrait permettre de cibler la tumeur sans endommager les tissus sains, et d'autre part, par la mémoire immunitaire qui pourrait éviter les récurrences cancéreuses et prévenir le développement de métastases. On différencie deux types d'immunothérapie : l'immunothérapie non spécifique (via des cytokines, d'agents immunostimulants) et l'immunothérapie spécifique d'antigènes tumoraux (via des anticorps monoclonaux, de vaccins, de la thérapie cellulaire via transfert de lymphocytes T).

2.2.4.1.1. Immunothérapie non spécifique

2.2.4.1.1.1. L'interféron alpha

L'interféron alpha ou (IFN- α) est la première cytokine qui a été utilisée dans le traitement du mélanome métastatique (Hebbar *et al.*, 1995). L'IFN- α possède une activité inhibitrice de la prolifération des cellules tumorales, diminue l'expression des oncogènes (*RAS*, *MYC*) et accroît la présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes en augmentant l'expression membranaire des molécules HLA de classe I : c'est l'action directe de la cytokine. L'IFN- α est également à l'origine d'une immunomodulation par activation des lymphocytes T (LT), des cellules Natural Killer (NK) et des monocytes (Hebbar *et al.*, 1995). On peut utiliser au moins deux types d'interféron α recombinants : l'IFN- α -2a (ROFÉRON A®, laboratoires Roche) et l'IFN- α -2b (INTRON A®, laboratoires Schering).

Des effets secondaires sont fréquents : syndrome fébrile avec myalgie, complications hématologiques, hépatiques et rénales peuvent aboutir à des diminutions de dose. Un autre effet secondaire majeur de l'IFN- α est la dépression du sujet traité, avec des symptômes plus sévères lors de fortes doses et de traitements de longue durée (Friebe *et al.*, 2010). Ceci s'explique par le mécanisme suivant : l'IFN- α -2b active l'indoléamine-2,3-dioxygénase

(IDO), une enzyme qui métabolise le tryptophane, un précurseur de la sérotonine, le neurotransmetteur le plus fréquemment impliqué dans les syndromes de dépression, diminuant ainsi considérablement la quantité de sérotonine synthétisée. Des traitements préventifs et concomitants sont mis en place lors des thérapies avec l'interféron afin de traiter le syndrome. On peut utiliser par exemple des SSRIs (pour *selective serotonin re-uptake inhibitors*) pour réduire l'incidence et la sévérité des symptômes de dépression (Musselman *et al.*, 2001).

L'IFN- α utilisé seul dans le traitement du mélanome métastatique permet l'obtention d'un taux de réponse de 3 à 23 % seulement, avec une durée de réponse médiane de 4 mois (Agarwala *et al.*, 1994). Les réponses sont plus fréquentes en présence de métastases cutanées, ganglionnaires ou pulmonaires. Il est indispensable de mettre en place un traitement prolongé, car certains délais de réponses sont supérieurs à 3 mois. Il n'y a pas de réel bénéfice en termes de survie objectivé ; dans 5 % des cas une formation d'anticorps anti-IFN est induite sans répercussion thérapeutique certaine.

L'association de la chimiothérapie à l'IFN- α a été le sujet de l'étude de phase II de Hersey P *et al.* en 1991. L'association thérapeutique de la dacarbazine à l'IFN- α sur 44 patients a obtenu 30 % de réponses, suggérant un effet additif des deux molécules. Cependant, d'autres études (Sertoli *et al.*, 1992 ; Thomson *et al.*, 1992) n'ont pas confirmé ce résultat.

2.2.4.1.1.2. L'interleukine 2

L'interleukine 2 est une glycoprotéine produite par les lymphocytes T CD4 (LT4) (Hebbar *et al.*, 1995). Dans le modèle murin, cela correspond à la sous-population TH1 qui intervient dans l'initiation de la réponse immunitaire cellulaire et qui est également responsable de la production d'interféron gamma, contrairement à la sous-population TH2 à l'origine de la réponse anti-tumorale et donc de la sécrétion d'IL4, IL5 et IL10. Les deux sous-populations cellulaires exercent un rétrocontrôle mutuel négatif (Hebbar *et al.*, 1995).

L'IL2 permet d'activer des lymphocytes T cytotoxiques en stimulant leur pouvoir cytotoxique, la production d'IFN gamma, d'IL2 et l'expression des récepteurs de l'IL2 ou CD25, mettant ainsi en place une boucle d'auto-amplification (Hebbar *et al.*, 1995). Les récepteurs de l'IL2 peuvent être constitués d'une, deux ou trois chaînes soit α , β γ , ou α β γ , correspondant à des affinités différentes pour l'IL2, respectivement faible, moyenne ou haute. Par exemple, les LT expriment les récepteurs de haute affinité. L'expression de ces récepteurs nécessite au préalable l'activation lymphocytaire par contact avec l'antigène (Hebbar *et al.*, 1995).

L'IL2 induit aussi (Oppenheim *et al.*, 1994) :

- l'activation des cellules Natural Killer (NK) donc leur prolifération, leur cytotoxicité directe et dépendante des anticorps (ADCC). Le récepteur des cellules NK est cependant d'affinité moyenne ; son activation nécessite des concentrations d'IL2 cent fois plus élevées que pour les récepteurs de haute affinité ;
- l'activation des lymphocytes B (LB) donc leur prolifération et leur production d'anticorps ;
- l'activation des macrophages donc leur pouvoir phagocytaire, la sécrétion de TNF- α et d'IL1.

Les effets secondaires de l'IL2 sont l'hypotension et l'oligurie dans le cadre du syndrome de fuite vasculaire dit VLS (pour *Vascular Leak Syndrome*), suite aux dommages sur les cellules endothéliales (Cotran *et al.*, 1988 ; Irwan *et al.*, 2009). Il semble que le traitement par l'IL2 soit à l'origine d'une augmentation de monoxyde d'azote (NO), suite à l'activation par les cytokines de la synthétase du NO (Hibbs *et al.*, 1992 ; Palmer *et al.*, 1992). Les sujets traités par l'IL2 nécessitent une surveillance vasculaire par mesure de leur pression sanguine, et un suivi de leur fonction rénale (Chelsea et Armstrong, 2014).

En médecine humaine, l'IL2 est utilisée seule ou en association avec des cellules particulières, les cellules LAK (pour *lymphokine-activated killer*) (Rosenberg *et al.*, 1993 ; Hebbar *et al.*, 1995). Il est également possible de combiner l'IL2 avec de l'IFN- α , une chimiothérapie, des TIL (pour *tumor-infiltrating lymphocytes*). L'utilisation de l'IL2 seule ou associée à l'IFN- α ou à la chimiothérapie est en général décevante (Hebbar *et al.*, 1995). On s'oriente actuellement vers des approches plus spécifiques qui font intervenir la réponse immunitaire de l'hôte et donc vers des méthodes qui tirent parti des TIL, de la thérapie génique ou encore de l'immunothérapie active avec la vaccination (Hebbar *et al.*, 1995). Les TIL sont isolés du stroma tumoral après exérèse chirurgicale, cultivés 4 à 6 semaines en présence d'IL2, avant d'être ré-administrés par voie systémique afin qu'ils rejoignent les différents sites tumoraux où ils peuvent exercer une cytotoxicité spécifique d'antigène acquise et restreinte par HLA (Hebbar *et al.*, 1995). Chez la souris, les TIL sont significativement plus efficace que les cellules LAK (Hersey, 1993).

2.2.4.1.2. Immunothérapie spécifique

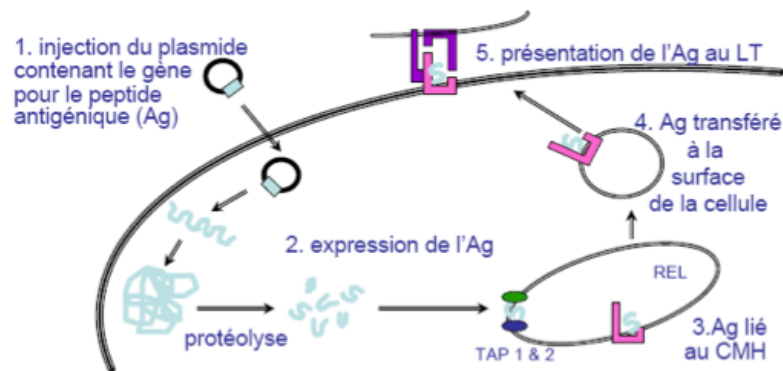
2.2.4.1.2.1. Vaccination génétique : l'immunothérapie active

La vaccination anticancéreuse n'est pas une thérapie récente ; les premières tentatives d'immunothérapie active datent des années 1970 avec le vaccin bilié de Calmette et Guérin (BCG) pour traiter le mélanome (Morton *et al.*, 1974).

Le principe de la vaccination génétique repose sur l'injection d'un plasmide bactérien contenant l'ADN d'intérêt. Après administration par voie intradermique ou intramusculaire, le plasmide recombinant est intégré aux cellules qui vont transcrire puis traduire l'antigène. Les protéines produites subissent ensuite le processus de dégradation, aboutissant à l'expression de certaines portions d'épitopes à la surface de la cellule, contre lesquelles le système immunitaire va initier une réaction immunitaire spécifique via les cellules présentatrices d'antigène (CPA) (Bower et Waxman, 2010). La Figure 12 schématise le principe de la vaccination anti-tumorale.

Figure 12 : Principe de la vaccination anti-tumorale (D'après Campagne, 2010)

Ag = Antigène ; *REL* = Réticulum endoplasmique lisse ; *TAP* = *Transporter associated with antigen processing* ; *CMH* = *Complexe majeur d'histocompatibilité* ; *LT* = lymphocyte T.



On peut utiliser des oncolysats, des gangliosides, des anticorps anti-idiotypes, les gènes codant les protéines MAGE (pour *melanoma associated antigen*) (Hebbar *et al.*, 1995).

Les oncolysats ont fait l'objet de plusieurs essais cliniques dans le cadre du traitement de mélanomes métastatiques ; ils sont constitués de cellules tumorales autologues, allogéniques ou en lignée, lysées par des ultrasons ou un agent viral (Hebbar *et al.*, 1995).

Les gangliosides sont des glycolipides acides dont les chaînes oligosaccharidiques se terminent par des résidus d'acides sialiques dérivés d'oses avec une fonction acide carboxylique (Raisonnier, 2009). Ils sont constitutifs des membranes des cellules du système nerveux. Leur nomenclature se définit par deux lettres et un chiffre : la première lettre est un G, correspondant à ganglioside ; la deuxième lettre peut être M, D, T ou Q selon qu'il existe respectivement 1, 2, 3 ou 4 résidus d'acide sialique dans l'oligosaccharide ; et enfin, le chiffre est 3, 2 ou 1 selon qu'il y a respectivement 2, 3 ou 4 résidus d'oses dans la chaîne à l'exception des acides sialiques (Raisonnier, 2009). Un essai randomisé en double aveugle sur des mélanomes métastatiques de stade III a comparé la durée de survie de patients traités par le ganglioside GM2 associé au BCG et au cyclophosphamide avec celle de patients n'ayant pas reçu le ganglioside (Livingston, 1993). Les résultats n'ont pas montré de différence significative en termes de durée de survie mais des essais de vaccination avec les gangliosides GD2 et GD3 restent envisageables.

Des anticorps anti-idiotypes sont également à l'essai sur des mélanomes métastatiques. Dans la relation anticorps-antigène, le déterminant antigénique est reconnu par l'anticorps spécifique au niveau du paratope, qui est lui-même constitué d'une structure antigénique propre appelé idiotype (Hebbar *et al.*, 1995). L'idiotype permet d'obtenir des anticorps anti-idiotypes, qui représentent l'image interne du déterminant antigénique initial et vont pouvoir mimer la structure tridimensionnelle de l'antigène initial. Un essai clinique reposant sur

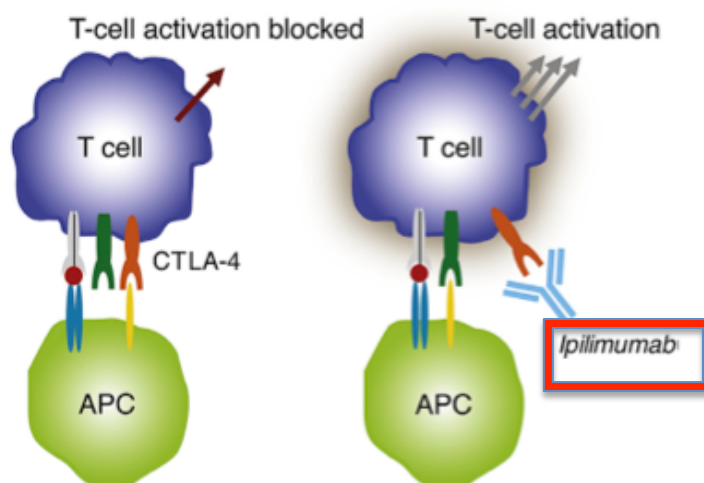
l'hypothèse qu'il devrait être possible d'immuniser un sujet vis-à-vis d'un antigène tumoral à l'aide d'anticorps anti-idiotypes, plus particulièrement en utilisant des anti-idiotypes mimant les épitopes d'antigènes de haut poids moléculaire provenant de mélanomes (des HMW-MAA, pour *High Molecular Weight - Melanoma Associated Antigen*) a été effectué il y a de nombreuses années (Ferrone, 1993). La cohorte utilisée comportait 21 patients. Seize d'entre eux ont développé des anticorps anti-idiotypes HMW-MAA et 4 réponses ont été observées (Ferrone, 1993).

Les gènes *MAGE* codent des antigènes exprimés par les cellules du mélanome et reconnus de façon spécifique par des lymphocytes T cytotoxiques (Van der Bruggen et al., 1991 ; Goulie et Van Pel, 1993). Ces gènes forment une famille d'au moins 12 membres, dont les plus étudiés sont *MAGE-1* et *MAGE-3* ; ils se localisent sur le bras long du chromosome X. Ils ne sont pas exprimés par les tissus sains, à l'exception du testicule (Hebbar et al., 1995). Cependant *MAGE-1* et *MAGE-3* ne sont exprimés respectivement que par 40 et 85 % des mélanomes. Par conséquent, cette approche, et particulièrement celle qui implique le gène *MAGE-1*, ne peut pas s'appliquer à tous les patients (Hebbar et al., 1995). Par ailleurs, des gènes codant des antigènes plus fréquemment exprimés dans les mélanomes ont été identifiés, comme celui codant la tyrosinase. Des stratégies basées sur leur ciblage pourraient représenter un bénéfice. Cependant, il faut noter que certains effets indésirables sont suspectés, tels que des lésions testiculaires suite à une vaccination par les gènes *MAGE* ou encore l'apparition de vitiligo voire des lésions choroïdiennes associées à une vaccination par le gène de la tyrosinase (Hebbar et al., 1995).

2.2.4.1.2.2. Anti-CTLA-4 : l'ipilimumab

L'ipilimumab est un anticorps monoclonal humain dirigé contre la protéine CTLA-4 (pour *cytotoxic T lymphocytes-associated antigen 4*) (Soria et al., 2012). La protéine CTLA-4 est exprimée à la surface des lymphocytes T. Son rôle est de réguler à la baisse leur activation initiale (Lacouture et al., 2014). Ainsi, les anticorps anti-CTLA-4 permettent de promouvoir une activité immunitaire T plus efficace contre la tumeur (Figure 13).

Figure 13 : Mécanisme d'action de l'ipilimumab (D'après Lacouture et al., 2014)
APC = CPA ; T-cell = Lymphocyte T ; T-cell activation = activation des lymphocytes T.



Une amélioration de la survie globale des patients atteints d'un mélanome de stade IV traités par l'ipilimumab a été montrée (Hodi *et al.*, 2010 ; Robert *et al.*, 2011) et la molécule a été approuvée aux Etats-Unis par la FDA (pour *Food and Drug Administration*) pour le mélanome de stade IV (le mélanome métastatique) en monothérapie à la dose de 3 mg/kg (Yervoy®, BMS®) toutes les 3 semaines pendant 4 cycles. Nous pouvons illustrer l'efficacité encourageante de l'ipilimumab à travers une publication présentant le cas d'un patient avec un mélanome métastatique dont une lésion cutanée au niveau du membre thoracique droit (Addeo et Rinaldi, 2013). Le patient était un homme de type caucasien de 65 ans dont le mélanome a été diagnostiqué en avril 2011, qui a été traité dans un premier temps par la dacarbazine (850 mg/m² toutes les 3 semaines pendant 3 cycles) puis dans un second temps avec l'ipilimumab (3 mg/kg toutes les 3 semaines pendant 4 cycles). La réponse clinique a été complète avec une totale régression des métastases cutanées à l'issue du traitement. Au moment de la publication, soit 9 mois après la fin du traitement, le sujet était toujours en complète rémission.

Une étude randomisée en double aveugle (essai clinique de phase II) effectuée en 2010 dans 66 centres sur 12 pays a permis de rassembler 217 patients atteints de mélanomes de stade III (inopérable) à IV (Wolchok *et al.*, 2010). L'essai a porté sur l'efficacité de l'ipilimumab en fonction de la dose administrée qui était 0,3 ou 3 ou 10 mg/kg toutes les 3 semaines pendant 4 cycles d'induction, puis tous les 3 mois. Les résultats ont conclu à une efficacité de l'ipilimumab dépendante de la dose avec des taux de réponses significativement différents, et en particulier nul pour la dose de 0,3 mg/kg ; les taux étaient de 4,2 % pour 3 mg/kg et de 11,1 % pour 10 mg/kg.

Un autre essai clinique de phase III a porté sur 502 patients présentant un mélanome métastatique sans aucun traitement initié (Robert *et al.*, 2011). Deux cohortes ont été constituées : la première a reçu de l'ipilimumab à 10 mg/kg et de la dacarbazine à 850 mg/m², alors que la seconde a reçu de la dacarbazine à la même dose, associée à un placebo. Les deux molécules ont été données aux semaines 1, 4, 7 et 10 puis la dacarbazine seule toutes les 3 semaines jusqu'à la semaine 22 de l'essai. Les patients stables et/ou présentant une réponse objective au traitement et/ou pas d'effet secondaire sévère ont continué à recevoir l'ipilimumab ou le placebo toutes les 12 semaines. Les résultats de l'étude ont montré une différence significative de durée de survie globale entre les deux cohortes. En effet, le groupe ayant reçu la dacarbazine et l'ipilimumab a obtenu une durée de survie globale de 11,2 mois contre 9,1 mois pour celui non traité avec l'ipilimumab, avec un taux de survie à 1, 2 et 3 ans nettement amélioré (Tableau 6).

Tableau 6 : Taux de survie à 1, 2 et 3 ans selon les cohortes A et B (D'après Robert *et al.*, 2011)

%	Taux de survie à <u>1 an</u>	Taux de survie à <u>2 ans</u>	Taux de survie à <u>3 ans</u>
Cohorte A : « ipilimumab + dacarbazine »	47,3	28,5	20,8
Cohorte B : « placebo + dacarbazine »	36,3	17,9	12,2

Les effets secondaires décrits lors de l'essai étaient de grade 3 à 4, et apparaissaient respectivement chez 56,3 et 27,5 % ($P < 0,001$) des patients pour la cohorte A et B respectivement. Aucune perforation gastro-intestinale, ni décès directement lié à la prise des molécules, n'a été rapporté. Les conclusions de l'étude montrent que l'ipilimumab à la dose de 10 mg/kg en association avec la dacarbazine, comparé à la prise de dacarbazine seule, améliore significativement la durée de survie des patients atteints d'un mélanome de stade IV non traité au préalable. Les effets secondaires observés avec l'ipilimumab étaient ceux attendus, conformément aux études pré-existantes et notamment le taux de troubles gastro-intestinaux était plus faible que celui attendu.

En général, les effets secondaires consécutifs à la prise de l'ipilimumab sont d'ordre immunologique et concernent prioritairement la peau et le tube digestif, mais également le foie, le système endocrinien, rénal ou oculaire (Weber *et al.*, 2009). On peut citer par exemple des hépatites, thyroïdites, colites ou perforations digestives (Boasberg *et al.*, 2010). On les désigne sous l'acronyme IRAE (pour *immune related adverse events*). Ils peuvent être sévères (Robert *et al.*, 2009). Dans le contexte du traitement par l'ipilimumab, l'atteinte cutanée atteint plus de 40 % des patients (Robert *et al.*, 2010 ; Hodi *et al.*, 2011). Il apparaît sous la forme d'éruptions maculo-papuleuses diffuses d'intensité modérée, fréquemment prurigineuses et débutant 1 à 2 semaines après le début du traitement. On décrit plus rarement des réactions vitiligoïdes, qui peuvent se localiser préférentiellement autour des métastases cutanées, ainsi que des dépigmentations de cheveux ou poils et des pelades (Di Giacomo *et al.*, 2010 ; Robert *et al.* 2010).

L'ipilimumab présente un intérêt particulier dans le contexte de métastases cérébrales. L'étude de Margolin *et al.* (2012) sur 72 patients divisés en 2 cohortes, la cohorte A sans symptôme neurologique associé et la cohorte B manifestant des signes neurologiques, a permis d'objectiver une certaine activité chez les patients asymptomatiques avec des

métastases cérébrales de petite taille. Les effets indésirables rapportés étaient similaires à ceux observés dans les autres investigations concernant l'ipilimumab.

2.2.4.1.2.3. Anti-PD-1

Les anti-PD-1 sont des anticorps monoclonaux entièrement humains qui ciblent un inhibiteur exprimé sur des lymphocytes T activés appelés PD-1, pour *program death-1*. En 2012, une étude a rapporté des résultats prometteurs avec un anti PD-1 : le nivolumab (Topalian *et al.*, 2012). Les données correspondantes ont été actualisées à l'occasion du congrès de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) en Juin 2013 (Sznol *et al.*, 2013). L'étude comptait 107 patients atteint d'un mélanome de stade IV, qui n'ont pas répondu aux traitements systémiques standards. Le traitement était administré par voie intraveineuse, toutes les deux semaines selon 5 doses : 0,1 ; 0,3 ; 1 ; 3 et 10 mg/kg. La réponse au traitement, la durée de survie globale et la sécurité sur le long terme ont été rapportées. Les résultats montrent un taux de réponse global de 31 %, toutes doses confondues. Le taux de réponse maximal était de 41 % pour la dose de 3 mg/kg, la dose actuellement retenue pour les essais de phase III en cours. La durée de survie globale s'est élevée à 16,8 mois toutes doses confondues, et à 20,3 mois pour la dose de 3 mg/kg. Quarante quatre et 40 % des patients étaient vivants respectivement 2 et 3 ans après l'initiation du traitement. De plus, 97 % des patients ont estimé leur score ECOG (pour *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*) comme étant inférieur ou égal à 1. Le score ECOG est une méthode de notation qui mesure la progression de la maladie chez un patient et les conséquences sur sa vie quotidienne sur une échelle de 0 à 5 (Tableau 7). Des effets secondaires ont été observés chez 82 % des patients. La fatigue, une lymphopénie étaient les plus fréquents. On a noté la présence d'effets secondaires de grade 3 et 4 chez 21 % des patients. Les conclusions de l'étude montrent que le nivolumab a permis une augmentation de la durée de survie et du taux de réponse, avec une toxicité acceptable chez des patients atteints d'un mélanome avancé, pré-traités avec des traitements systémiques standards.

Tableau 7 : Notation Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG) (D'après Bower et Waxman, 2010)

Note 0	Patient pleinement actif, autonome
Note 1	Patient ambulatoire, activité légèrement restreinte
Note 2	Patient ambulatoire, activité restreinte, moins de 50 % de la journée alité
Note 3	Patient peu autonome, plus de 50 % de la journée alité
Note 4	Patient complètement handicapé
Note 5	Décès

Une autre molécule a fait l'objet de publications importantes : un anticorps monoclonal humanisé IgG4 ciblant PD-1, le lambrolizumab (Hamid *et al.*, 2013). L'étude incluait 135 patients atteint d'un mélanome de stade IV, dont 54 % présentant une métastase viscérale, 19 % portant une mutation dans le gène *B-RAF*, 27 % ayant un taux élevé de LDH et 9 % une suspicion de métastase cérébrale. Le traitement a été effectué selon une cohorte 'initiale' et parfois 'additionnelle' avec des doses variables : dans la cohorte initiale à la dose de 10 mg/kg toutes les 2 semaines, et dans la cohorte additionnelle 10 mg/kg ou 2 mg/kg toutes les 3

semaines. Le taux de réponse confirmée a atteint 38 % toutes doses confondues et le plus élevé était égal à 52 % pour la dose de 10 mg/kg toutes les 2 semaines. Il n'y a pas eu de différence entre les sujets préalablement traités par l'ipilimumab et les autres. Concernant les effets secondaires, leur fréquence d'apparition n'a pas été plus élevée que chez les sujets traités à l'ipilimumab. Sur un total de 135 patients, 79 % ayant reçu au moins une dose de lamprolizumab, ont présenté des effets indésirables mais de grade inférieur à 3 dans 95 % des cas. Ces effets secondaires étaient plus fréquents chez les patients traités toutes les 2 semaines, comparés à ceux traités toutes les 3 semaines ; fatigue, hyperthermie et myalgies ont été rapportées.

En résumé, les anti PD-1 sont très prometteurs dans le cadre du traitement des mélanomes de stade IV avec un taux de réponse élevé allant de 31 à 52 %, et un délai de réponse plus court qu'avec un anti-CTLA-4 tel que l'ipilimumab (Topalian *et al.*, 2012 ; Sznol *et al.*, 2013 ; Hamid *et al.*, 2013).

2.2.4.1.2.4. Anti-PDL-1

Les anti-PDL-1 sont des anticorps monoclonaux dirigés contre un ligand de PD-1. Un tel anticorps a fait l'objet d'un essai clinique de phase I (Brahmer *et al.*, 2012) montrant une réponse objective de 17 % sur un total de 52 patients atteints de mélanome métastatique. L'étude a révélé une meilleure tolérance au traitement qu'avec l'ipilimumab, avec seulement 5 % des sujets présentant un effet secondaire de grade supérieur ou égal à 3.

2.2.4.2. Inhibiteurs de la voie des MAP kinases

2.2.4.2.1. Les inhibiteurs de B-RAF

2.2.4.2.1.1. Généralités

Le vemurafenib et le dabrafenib sont deux inhibiteurs de B-RAF qui ont fait l'objet de multiples études dans lesquelles il a clairement été montré que le taux de réponse dans le cadre d'un mélanome métastatique était important ainsi que la durée de survie augmentée en comparaison avec une chimiothérapie conventionnelle reposant sur la dacarbazine. Le vemurafenib (ou encore PLX 4032 ou RG7204) est un inhibiteur de B-RAF, plus précisément des mutations *B-RAF* V600E (50 % des mutations dans le gène *B-RAF*) (Eggermont *et al.*, 2011 ; Robert *et al.*, 2011). Le Tableau 8 présente différentes mutations dans le gène *B-RAF*, leur incidence et la substitution d'acides aminés correspondante.

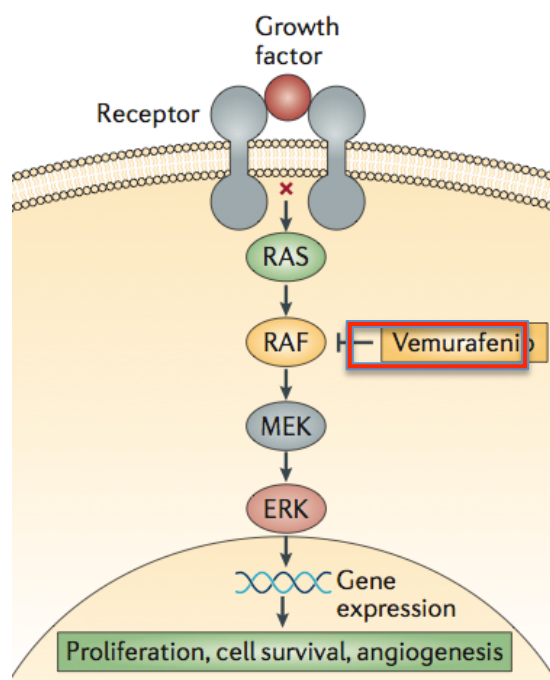
Tableau 8 : Mutations de *B-RAF* connues, incidence et substitution correspondantes (D'après Jordan et Kelly, 2012)

Nom de la mutation B-RAF (incidence)	Substitution
B-RAF V600E (75 – 90 %)	Un acide glutamique (E) à la place d'une valine (V) codon 600
B-RAF V600K (5 – 6 %)	Une lysine (K) à la place d'une valine (V) codon 600
<i>B-RAF</i> V600R (< 5 %)	Une arginine (R) à la place d'une valine (V) codon 600
<i>B-RAF</i> V600G (pas de donnée)	Une glycine (G) à la place d'une valine (V) codon 600
<i>B-RAF</i> V600D (< 5 %)	Un acide aspartique (D) à la place d'une valine (V) codon 600
<i>B-RAF</i> V600M (pas de donnée)	Une méthionine (M) à la place d'une valine (V) codon 600
Autres mutations dans le gène <i>B-RAF</i> (différentes de celles observées au codon 600)	R461I ; I462S ; G463E ; G465A ; G465V ; G468A ; G468E ; N580S ; E585K ; D593V ; F594L ; G595R ; L596V ; T589I ; V599D ; V599E ; V599K ; V599R ; K600E ; A727V

Le vemurafenib agit de façon sélective sur la sérine-thréonine kinase B-RAF contrairement aux premières molécules à l'essai tel que le sorafenib qui possède une action inhibitrice multi-kinases (Figure 14) (Smalley, 2010). En effet, le sorafenib inhibe la prolifération tumorale en ciblant plusieurs kinases dont les récepteurs du PDGF (PDGFR) et ceux du VEGF (VEGFR) ; il a une action inhibitrice sur B-RAF mais également sur FLT3 et sur KIT (Mangana *et al.*, 2012). Un troisième inhibiteur de B-RAF est en cours de développement : le LGX 818. Une étude de phase I d'escalade de doses a été présentée à l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) (Dummer *et al.*, 2013), avec comme atouts, une tolérance a priori satisfaisante ainsi qu'un taux de réponse élevé en particulier chez les sujets naïfs ; ces résultats devront être confirmés par les études de phases II et III.

Figure 14 : Mécanisme d'action du vemurafenib (D'après Flaherty *et al.*, 2011)

Growth factor = facteur de croissance ; *Receptor* = récepteur ; *Gene expression* = expression génétique ; *cell survival* = survie cellulaire ; *angiogenesis* = angiogénèse.



Le vemurafenib permet d'inhiber la voie RAS – RAF – MEK – ERK, initialement activée par la mutation du gène *B-RAF*.

Un essai clinique de phase I a inclus 49 patients avec un diagnostic de mélanome à un stade avancé, porteurs d'un allèle muté *B-RAF* V600E ou d'allèles sauvages (Flaherty *et al.*, 2011). Parmi les sujets, 6 présentaient également d'autres tumeurs métastatiques, d'origine thyroïdienne notamment. Les résultats de l'essai en phase I ont montré un taux de réponse globale de 81 %, restreint au mélanome dû à une mutation *B-RAF* V600E. Ceci a permis la mise en place d'un essai de phase II, nommée BRIM2 pour '*B-RAF In Melanoma 2*', qui a testé l'efficacité et la sécurité du vemurafenib à 960 mg deux fois par jour chez 132 patients portant un allèle *B-RAF* V600E ayant reçu au moins un premier traitement (Sosman *et al.*, 2012). Le taux de réponse global a été déterminé par un comité indépendant pour plus d'impartialité. Après un suivi sur 12,9 mois, un taux de réponse globale de 53 % a été observé dont 6 % de réponse complète et 47 % de réponse partielle. La durée de survie globale a été évaluée à 15,9 mois. La durée de réponse médiane a été de 6,7 mois et la durée de survie médiane sans progression de la tumeur atteignait 6,8 mois.

La phase III de l'essai, dit BRIM3, a ensuite comparé le vemurafenib et la dacarbazine sur 675 patients mutés pour *B-RAF*, présentant un mélanome métastatique ou inopérable (Chapman *et al.*, 2011 ; Chapman *et al.* 2012). Le statut de la mutation a été déterminé à l'aide du test « Cobas® 4800 BRAF V600 mutation » (Roche molecular systems, Inc.) et tous les patients, excepté 20 d'entre eux, présentaient une mutation V600E. Les sujets ont été divisés en 2 cohortes : les cohortes A et B qui ont reçu respectivement 960 mg de vemurafenib deux fois par jour par voie orale et 1000 mg/m² de surface corporelle de dacarbazine toutes les 3 semaines par voie intraveineuse. Les critères principaux de l'étude étaient la durée de survie globale et la durée de survie sans progression tumorale. Les critères secondaires d'évaluation étaient le taux de réponse global, la durée de réponse et l'innocuité

du traitement. Le Tableau 9 rassemble l'ensemble des caractéristiques propres aux 2 cohortes et leurs résultats.

Tableau 9 : Caractéristiques des 2 cohortes et résultats de l'étude B-Raf In Melanoma 3 (BRIM 3) (D'après Chapman *et al.*, 2011 ; Chapman *et al.*, 2012)

LDH = lactate déshydrogénase.

	Cohorte A 'vemurafenib' N = 337	Cohorte B 'dacarbazine' N = 338
Age (médiane)	N = 56	N = 52
Type caucasien	N = 333	N = 338
Genre masculin	N = 200	N = 181
Extension de la maladie : M1c : métastases viscérales avec taux de LDH normal, ou autres métastases avec taux de LDH élevé	N = 221	N = 220
M1b : métastases pulmonaires avec taux de LDH normal	N = 62	N = 65
M1a : métastases à distance, à localisation cutanée, subcutanée ou dans les nœuds lymphatiques avec un taux de LDH normal	N = 34	N = 40
Inopérable IIIc : mélanome métastatique avec au moins atteinte de 3 nœuds lymphatiques	N = 20	N = 13
Taux de réponse globale	48 %	5 %
Réponse complète	N = 2	N = 0
Durée de survie sans progression tumorale (médiane)	5,3 mois	1,6 mois
Survie globale à 6 mois	84 %	64 %

Au bilan, les critères principaux, avec une survie globale à 6 mois de traitement égale à 84 % pour la cohorte A versus 64 % pour la cohorte B et l'estimation médiane de la durée de survie sans progression atteignant respectivement 5,3 mois versus 1,6 mois, ont été remplis et étaient en faveur du vemurafenib. La plupart des patients appartenant à la cohorte A présentaient une diminution de la taille de la tumeur avec un taux de réponse global de 48 %. Deux patients présentaient une réponse complète au traitement. Parmi les patients non mutés pour *BRAF V600E* de la cohorte A, une mutation *V600K* a été identifiée pour 10 d'entre eux dont 4 qui ont montré une réponse partielle au traitement, ce qui suggère une efficacité avérée au sein de ce sous-groupe. En comparaison, la cohorte B atteignait seulement 5 % de taux de réponse

globale et aucune réponse complète n'a été observée. Le délai de réponse au traitement mettait en avant également le vemurafenib avec respectivement 1,45 versus 2,47 mois pour les cohortes A et B. En s'appuyant sur ces résultats, les agences européenne et américaine (FDA et EMA pour *European Medicines Agency*) ont approuvé l'utilisation du vemurafenib avec le test « Cobas® 4800 BRAF V600 mutation » dans le traitement du mélanome métastatique ou inopérable aux USA (2011) et en Europe (2012). Une mise à jour de la durée de survie concernant cette étude (BRIM 3) a été présentée à l'occasion du congrès de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) en 2012, soulignant une augmentation continue de la durée de survie avec le vemurafenib (Chapman *et al.*, 2012). En effet, avec un suivi de 10,5 mois pour le groupe vemurafenib et 8,4 mois pour celui de la dacarbazine, la durée de survie atteignait respectivement de 13,2 et 9,6 mois, associée à un taux de survie global à 1 an de 55 % pour le vemurafenib et 43 % pour la dacarbazine.

Par ailleurs, une étude pré-clinique a mis en évidence que l'utilisation des inhibiteurs de la voie MAP kinase, via les inhibiteurs de B-RAF, augmentait également la capacité des TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*) à reconnaître les cellules tumorales in vitro, ce qui suggère la possibilité d'une action synergique et complémentaire permise par le traitement séquentiel du vemurafenib et des TIL (Donia *et al.*, 2012).

2.2.4.2.1.2. Effets indésirables et échappement tumoral

Une des préoccupations majeures concernant ces molécules est l'existence d'effets indésirables à localisation cutanée. Le vemurafenib peut également causer des arthralgies et des signes généraux comme la fatigue. En ce qui concerne la peau, une photosensibilité liée aux UVA caractérisée par l'apparition d'érythème pendant l'exposition, persistant pendant plusieurs jours, et la survenue de verrues voire de carcinomes épidermoïdes cutanés sont les principaux effets secondaires du traitement. Les carcinomes épidermoïdes sont le plus souvent bien différenciés, de type kérato-acanthome et peuvent survenir de façon éruptive, multifocale, classiquement après 8 semaines de traitement mais parfois même avant, voire quelques semaines après l'arrêt du traitement. La photosensibilisation est proche de l'aspect clinique original lié aux érythroporphyrines avec une élévation objective des porphyrines érythrocytaires chez les patients traités par vemurafenib (Gelot *et al.*, 2013). Concernant les verrues et les carcinomes épidermoïdes, il semble y avoir un bénéfice à l'utilisation de l'acitrétine orale en prévention (Anforth *et al.*, 2013). Les carcinomes induits sont à traiter par exérèse chirurgicale en priorité et ne justifient généralement pas l'arrêt prématuré du vemurafenib (Flaherty *et al.*, 2010). Les inhibiteurs de B-RAF ont également la capacité à favoriser le développement de naevi éruptifs dont il faut bien évidemment réaliser un suivi d'évolution. Une surveillance dermatologique doit donc être systématique lors d'un traitement au vemurafenib, avec a minima des bilan pré- et post-thérapeutiques.

L'autre préoccupation actuelle vis à vis des inhibiteurs de B-RAF est l'échappement tumoral après 6 à 8 mois de traitement. Il semble que la plupart des sujets finissent par acquérir une résistance permettant une reprise de la progression tumorale ; cette résistance est liée à une activation de la voie des MAP kinases via d'autres gènes tels que *N-RAS*, *MEK*, *ERK* ou d'autres voies de signalisation comme la voie PI3K / AKT (Nazarian *et al.*, 2010). Des recherches sur les mécanismes de résistance sont en cours.

2.2.4.2.1.3. Inhibiteurs de B-RAF et métastases cérébrales

A plusieurs reprises, l'action des inhibiteurs de B-RAF chez des patients présentant des métastases cérébrales a été démontrée. Long *et al.* (2012) ont effectué une étude ouverte multicentrique portant sur un effectif total de 172 patients, porteurs de métastases cérébrales asymptomatiques (Long *et al.*, 2012). La cohorte A comprenait 89 sujets chez lesquels aucun traitement antérieur n'avait été réalisé. La cohorte B comptait 83 sujets ayant subi un traitement local par radiothérapie ou chirurgie. Sur les 172 patients, 139 portaient une mutation *V600E* avérée et 33 une mutation *V600K*. Le traitement administré était le dabrafenib à la dose suivante : 150 mg, deux fois par jour, jusqu'à progression. On s'intéressait alors au taux de réponse des métastases intracrâniennes ; parmi les sujets porteurs de la mutation *V600E*, il atteignait 39 % dans la cohorte A et 31 % dans la cohorte B. Concernant les porteurs de la mutation *V600K*, il a été observé 7 % de taux de réponse dans la cohorte A et 22 % dans la cohorte B. Pour les porteurs de la mutation *V600E*, les résultats ont montré une survie sans progression de 16 semaines dans les deux cohortes, et une survie globale de respectivement 33 et 31 semaines dans les cohortes A et B. Des effets secondaires ont été rapportés pour 82 % des patients de grade supérieur à 3 pour 22 % d'entre eux. De plus, 6 % ont développé un carcinome épidermoïde cutané.

Dummer *et al.* (2012) se sont intéressés à l'effet du vemurafenib chez 23 sujets atteints de métastases cérébrales symptomatiques, alors en échec des traitements précédents. Parmi les 23 patients, 19 ont été évaluables et seulement 3 ont manifesté une réponse partielle cérébrale. La survie globale s'est élevée à 5 mois.

En conclusion, les inhibiteurs de B-RAF ont une action sur les métastases cérébrales, symptomatiques ou non, avec traitement préalable ou non. Le dabrafenib n'est pas supérieur au vemurafenib, même si Mittapalli *et al.* ont publié en 2013 une étude préclinique objectivant des concentrations cérébrales en dabrafenib plus élevées, chez la souris, qu'avec le vemurafenib.

2.2.4.2.2. Les inhibiteurs de MEK

2.2.4.2.2.1. Généralités

La classe thérapeutique des inhibiteurs de MEK est aujourd'hui représentée par le selumetinib. MEK ou MAPK /ERK kinase (pour *mitogen activated protein kinases 1 and 2*) est une enzyme clef de la voie de signalisation intracellulaire RAS /RAF /MEK /ERK primordiale pour le contrôle de la survie, la prolifération et l'apoptose. Le selumetinib est un inhibiteur non compétitif de seconde génération sélectif de MEK 1 et 2.

La principale toxicité du selumetinib correspondait aux manifestations dermatologiques qui sont fréquentes chez les sujets traités, avec plus de 85 % des patients touchés (Bekaii-saab *et al.*, 2011). Ces manifestations cutanées sont majoritairement des éruptions acnéiformes, des paronychies, une xérose, un prurit, des fissures digitales et des anomalies du follicule pileux. Les éruptions acnéiformes sont décrites chez plus de 75 % des sujets (Schad *et al.*, 2010). Le selumetinib peut également être à l'origine de cellulites aseptiques, érypéloïdes, et d'œdèmes périphériques ou à localisation faciale (Thomas *et al.*, 2010).

Robert *et al.* (2013) ont effectué une étude de phase II randomisée en double aveugle pour comparer d'une part l'effet de l'association des inhibiteurs de MEK avec la chimiothérapie (sélumétinib-dacarbazine) sur 45 sujets et d'autre part l'association placebo-chimiothérapie (dacarbazine) sur 46 sujets mutés pour *B-RAF* en première ligne de traitement. Les résultats n'ont pas démontré de différence en termes de survie globale mais une augmentation significative de la survie sans récurrence pour l'association sélumétinib-dacarbazine comparé au lot placebo-dacarbazine avec respectivement 5,6 mois et 3 mois de survie (Robert *et al.*, 2013).

Le tramétinib est un second inhibiteur de MEK 1 et MEK 2 qui a fait l'objet d'un essai clinique de phase III en 2012 dans le mélanome métastatique. Flaherty *et al.* (2012) ont voulu mettre en parallèle l'action de la dacarbazine à celle du tramétinib, les résultats ont été en faveur d'une augmentation de survie par le tramétinib. En 2013, une nouvelle étude de phase II a d'ailleurs comparé les effets du tramétinib en monothérapie chez 40 sujets mutés pour *B-RAF*, précédemment traités par inhibiteurs de B-RAF et chez 57 sujets mutés pour *B-RAF* naïfs (Kim *et al.*, 2013). Dans la première cohorte, 28 % ont obtenu une stabilisation et il n'y a pas eu de réponse objective. Dans la seconde cohorte des sujets naïfs, il a été observé 25 % de réponses objectives et 51 % de stabilisations. La médiane de survie sans récurrence a été estimée à 1,8 mois pour la première cohorte et à 4 mois pour la seconde.

2.2.4.2.2.2. Inhibiteurs de MEK et mélanome choroïdien

Carvajal *et al.* (2013) ont de plus présenté leurs résultats au congrès de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) en Juin 2013 sur le mélanome choroïdien, plus rare chez l'Homme mais de pronostic très sombre. Les données génétiques relatives au mélanome choroïdien sont en faveur d'une majorité de mutations dans les gènes *GNAQ* et *GNA11* capables d'induire une activation de la voie des MAP kinases. L'objectif de l'étude était de comparer l'action du selumétinib avec celle de la chimiothérapie (témozolomide ou dacarbazine) chez 98 sujets atteints. Deux cohortes ont été constituées : la première pour le selumétinib comprenait 48 patients et la seconde pour la chimiothérapie 50 patients. Pour la cohorte chimiothérapie, 45 patients ont reçu du témozolomide, 4 de la dacarbazine et 1 n'a reçu aucune molécule. En cas de progression sous chimiothérapie, un basculement vers la cohorte selumétinib était possible, ce fut le cas pour 40 patients sur les 49 de la cohorte. Le taux de réponse s'est élevé à 15 % dans la cohorte selumétinib contre 0 % pour la cohorte chimiothérapie. La survie sans progression n'était que de 7 semaines avec la chimiothérapie contre 15,9 semaines avec la selumétinib. Les effets secondaires rapportés ont été majoritairement de grade 1 à 2 ; 87 % étaient des éruptions cutanées, 40 % des œdèmes, et 49 % une élévation des créatines phosphokinases (CPK). L'utilisation de selumétinib dans le cadre d'un mélanome choroïdien est donc plutôt prometteuse, avec des résultats très encourageants.

2.2.4.2.3. Combinaison d'inhibiteurs de B-RAF et de MEK

Comme vu précédemment, les inhibiteurs de B-RAF induisent des mécanismes de résistance qui causent un échappement tumoral au traitement. En 2012, Flaherty *et al.* ont voulu étudier la combinaison des deux inhibiteurs, le dabrafénib comme inhibiteur de B-RAF et le tramétinib comme inhibiteur de MEK. La publication est composée de 3 parties : A, B et C. Les conditions d'inclusion dans l'étude ouverte étaient la présence d'une mutation *V600E* ou *V600K*. Dans un premier temps, une étude d'interaction médicamenteuse (Partie A) a été entreprise chez 8 patients. Dans un second temps, la toxicité et l'innocuité des molécules (Partie B) ont été testées avec une escalade de doses du dabrafénib avec le tramétinib, incluant 77 patients n'ayant jamais reçu d'inhibiteurs de B-RAF et 26 patients en échec d'inhibiteurs de B-RAF. L'étude de phase II randomisée à 3 bras (Partie C) a fait suite à ces deux temps préliminaires avec 3 cohortes de 54 patients recevant les traitements suivants :

- Combinaison 150 / 1 : 150 mg de dabrafénib deux fois par jour combiné à 1 mg de tramétinib une fois par jour,
- Combinaison 150 / 2 (association des doses recommandées en monothérapie pour chaque molécule) : 150 mg de dabrafénib deux fois par jour combiné à 2 mg de tramétinib une fois par jour,
- Monothérapie : 150 mg de dabrafénib deux fois par jour, seulement.

Quelques effets secondaires limitant la dose seulement ont été observés dans la partie B avec la combinaison 150 / 2. À propos de la partie C, la durée de survie sans progression de la tumeur a été de 9,4 mois pour la combinaison 150 / 2 contre 5,8 mois pour la monothérapie. Le taux de réponse partielle à complète avec la combinaison du dabrafénib avec le tramétinib atteignait 76 % alors qu'il n'était que de 54 % avec la monothérapie. De plus, les carcinomes épidermoïdes, liés à l'utilisation du vemurafenib, apparaissaient avec une fréquence de 19 % pour la monothérapie et seulement de 7 % pour la combinaison 150 / 2. Ces données mettent en avant l'intérêt d'une association entre des inhibiteurs de B-RAF et de MEK, qui alors combinés, se complètent et permettent l'obtention de résultats plutôt encourageants, sans amplification des effets secondaires.

2.2.4.3. Combinaison des deux stratégies : immunothérapie et inhibiteur de la voie MAP kinase

L'inhibiteur de B-RAF comme l'anti-CTLA-4 ayant montré des résultats encourageants en termes de taux de réponse et de durée de survie dans le mélanome métastatique, différents chercheurs ont trouvé logique d'essayer de les combiner. Le Tableau 10 récapitule et compare les principales caractéristiques des deux molécules.

Tableau 10 : Caractéristiques du vemurafenib et de l'ipilimumab (D'après Chapman, 2011)

	Vemurafenib	Ipilimumab
Mécanisme d'action	Bloque l'effet des mutations <i>B-RAF V600E</i>	Active les lymphocytes T contre le mélanome
Indications	Mélanome qui doit présenter une mutation <i>B-RAF V600E</i>	Tout mélanome, mélanome uvéal inclu.
Contre-indications	Pas de mutation <i>B-RAF</i> (Allèles <i>B-RAF</i> sauvages)	Maladies auto-immunes
Taux de réponse objectif (critère RECIST)	50 %	12 % mais effet à long terme durable souvent observé
Délai de réponse	Rapide	Généralement 12 à 20 semaines
Toxicités	Eruptions cutanées, arthralgies, fatigue, tumeurs cutanés (autre que mélanome), photosensibilisation...	Colite auto-immune, dermatite, hépatite, hypophysite, pancréatite, thyroïdite...

En effet, le vemurafenib a prouvé son action anti-tumorale en augmentant clairement le taux de réponse ainsi que la durée de survie globale, en comparaison avec le traitement par chimiothérapie (par la dacarbazine). Son délai de réponse est assez court, en moyenne quelques jours à quelques semaines après le début du traitement. Il présente néanmoins des résistances, des toxicités à localisation cutanée en particulier et provoque l'apparition de cancers cutanés (carcinomes épidermoïdes) et d'une photosensibilisation sévère (Chapman, 2011).

Concernant l'ipilimumab, des essais cliniques ont démontré la supériorité de son efficacité face à d'autres molécules immuno-stimulatrices ou à un placebo. Même si le taux de réponse à l'ipilimumab semble faible, la réponse apparaît plus durable que chez les patients traités avec le vemurafenib. Le point négatif de l'ipilimumab est que plusieurs mois peuvent être

nécessaires pour observer une réponse, ce qui compromet le choix d'une monothérapie chez des sujets symptomatiques (Chapman, 2011).

Le vemurafenib et l'ipilimumab apparaissent comme deux agents thérapeutiques du mélanome qui pourraient donner des résultats très prometteurs une fois combinés (Banaszynski et Kolesar, 2013). Cependant, même si cette combinaison peut sembler adéquate, on ne peut exclure une efficacité moindre qu'avec les molécules administrées séparément (Chapman, 2011). Le vemurafenib pourrait affecter la fonction des lymphocytes T et minimiser ainsi l'effet de l'ipilimumab. De plus, certaines toxicités associées pourraient être amplifiées (éruptions cutanées, élévation des enzymes hépatiques), ce qui pourrait limiter l'administration simultanée des deux médicaments. Une utilisation concomitante du vemurafenib et de l'ipilimumab a permis d'évaluer l'hépatotoxicité globale du traitement lors d'une étude de phase I comprenant 2 cohortes, A et B (Ribas *et al.* 2013). La cohorte A comprenait 6 patients qui ont reçu les 2 molécules selon la dose définie par l'autorisation de mise sur le marché (AMM) soit 1 mois avec 960 mg de vemurafenib seul deux fois par jour puis s'ajoutait l'ipilimumab à 3 mg/kg/j en intraveineuse toutes les 3 semaines pendant 4 cycles, tout en maintenant le traitement au vemurafenib. La cohorte B comptait 4 patients qui ont pris conjointement le vemurafenib et l'ipilimumab. Le vemurafenib a été administré à une dose réduite comparée à la cohorte A soit à 720 mg deux fois par jour alors que l'ipilimumab est à la même dose. Les résultats ont montré que l'utilisation du vemurafenib combiné à l'ipilimumab était responsable d'une augmentation des transaminases. En effet, au sein de la cohorte A, 4 patients ont développé une élévation de grade 3 environ 2 à 5 semaines après la première dose d'ipilimumab. En ce qui concerne la cohorte B, 2 élévations des transaminases de grade 3 et une de grade 2 ont été observées dans les 3 semaines suivant la première dose d'ipilimumab. Les effets hépatiques secondaires ont été asymptomatiques et traités par l'arrêt du traitement ou par une corticothérapie orale.

Au final, hormis un éventuel effet antagoniste des deux molécules utilisées conjointement et une toxicité notamment hépatique à surveiller, la combinaison de l'ipilimumab et du vemurafenib pourrait également se révéler ne pas être plus efficace que deux monothérapies en alternance. Des essais cliniques sont absolument nécessaires afin d'obtenir des réponses.

Des travaux ont été menés sur l'espèce murine en 2012 (Koya *et al.*, 2012). Le but de l'étude était de tester la combinaison du vemurafenib avec l'immunothérapie sur un modèle de mélanome chez la souris. Le mélanome murin a été créé à l'image du mélanome chez l'Homme porteur d'une mutation *B-RAF V600E*. Des lignées de souris portant un allèle muté *B-RAF V600E* ont été fabriquées, et nommées SM1. Des cellules de souris SM1 ont été ensuite exposées au vemurafenib *in vitro* et *in vivo*. L'utilisation du vemurafenib a ensuite été combinée à l'immunothérapie par transfert adoptif que l'on appelle aussi ACT (pour *adoptive cell transfer*). Le principe de l'immunothérapie adoptive est d'administrer au sujet une source de lymphocytes T, souvent de nature autologue, reconnaissant un antigène exprimé par les cellules tumorales à éliminer. Dans ce cas, le transfert adoptif a été réalisé avec des lymphocytes génétiquement modifiés exprimant des récepteurs reconnaissant l'ovalbumine de poulet SM1-OVA, ou avec des lymphocytes transgéniques Pmel-1 TCR reconnaissant la protéine gp100 endogène exprimée par les cellules SM1. Il n'y a pas eu d'effet antagoniste entre les deux traitements. En effet, l'analyse des lymphocytes T n'a pas révélé d'altération significative causée par le vemurafenib. De plus, le vemurafenib a amplifié les signaux de la voie des MAP kinases, l'activité cytotoxique *in vivo* et la sécrétion intra tumorale de cytokines élaborée par le transfert des LT modifiés. La combinaison du traitement au vemurafenib avec l'immunothérapie adoptive a montré un taux de réponse anti-tumorale

supérieur, comparé aux réponses observées pour chaque monothérapie. Les conclusions de l'étude, utilisant la combinaison d'une thérapie ciblée contre B-RAF et de l'immunothérapie sur un modèle dérivé de mélanome dans l'espèce murine, est en faveur d'un essai de ce plan thérapeutique chez des patients porteurs de la mutation *B-RAF V600* atteints d'un mélanome métastatique (Koya *et al.*, 2012).

Comme nous l'avons vu précédemment, la thérapie ciblée renvoie à un ensemble de moyens thérapeutiques riches et encourageants. En tant qu'inhibiteur de la voie des MAP kinases au niveau de B-RAF, le vemurafenib se distingue dans la lutte contre le mélanome en médecine humaine. Pendant longtemps, des traitements systémiques pour des stades avancés de mélanomes se trouvaient être non seulement lourds mais inefficaces ou ayant des effets toxiques importants. L'emploi du vemurafenib dans le mélanome a prouvé son efficacité sur les mélanomes associées à la mutation *B-RAF V600E* qui représente au moins 50% des cas et a permis d'ouvrir un pan de recherches vers des thérapies moléculaires ciblées et une médecine personnalisée. L'utilisation combinée de l'interleukine 2 à haute dose, de l'ipilimumab et du vemurafenib est d'ailleurs recommandée par le *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) pour les patients atteints d'un mélanome avancé métastatique. La limite principale de cette approche reste l'interleukine 2 à haute dose car elle peut causer une toxicité sévère et nécessiter une hospitalisation dans une unité de soins intensifs. Malgré ses effets toxiques, certains patients peuvent recevoir l'IL-2 s'ils présentent un bon état général et s'ils ont accès à un centre hospitalier qui administre cette cytokine. Concernant le vemurafenib et l'ipilimumab, ils prolongent tous les deux la durée de survie des sujets traités mais la supériorité de l'un sur l'autre n'a pas été démontrée. Les chercheurs se tournent maintenant sur la pertinence de la combinaison du vemurafenib et de l'ipilimumab mais également sur les possibilités d'action contre la résistance au vemurafenib. L'utilisation concomitante d'inhibiteurs de B-RAF et de MEK avec le dabrafenib (nouvel inhibiteur de B-RAF oral) et le tramétinib (inhibiteur de MEK) fait d'ailleurs l'objet de recherches dont les résultats sont attendus.

3. Mélanome canin et thérapeutique : des nouvelles perspectives de traitements

3.1. Traitements actuels

3.1.1. Traitement chirurgical

En médecine vétérinaire, la chirurgie est le traitement de choix (Soyer et Doliger, 2011). L'exérèse chirurgicale est appliquée dans les mêmes circonstances qu'en médecine humaine, excepté qu'elle se fait de façon systématique avec un centimètre de marge saine si la localisation anatomique le permet. Un bilan d'imagerie avancée (par tomодensitométrie) peut s'avérer nécessaire afin d'objectiver un processus d'ostéolyse associé, ce qui est très fréquent. La chirurgie peut être très radicale avec par exemple une mandibulectomie ou une maxillectomie en cas de mélanome buccal avec ostéolyse associée (Soyer et Doliger, 2011). La chirurgie des métastases connue en médecine humaine est peu pratiquée chez l'animal mais demeure tout de même intéressante lors de tumeur à évolution lente ; ce n'est pas le cas du mélanome.

3.1.2. Traitements adjuvants disponibles

3.1.2.1. Radiothérapie

La radiothérapie après chirurgie est conseillée avec des doses assez élevées (50 à 60 grays). Elle est indispensable lors d'une exérèse en marges non saines. L'indication peut aussi être palliative, en stabilisant la croissance tumorale (effet antalgique et anti-inflammatoire) ou encore pour les métastases cérébrales non opérables. La radiothérapie améliore le contrôle de la tumeur localement mais n'empêche pas le développement des métastases à distance chez les animaux. La radiothérapie externe est un traitement local ou logo-régional, qui nécessite de nombreuses anesthésies ; elle peut être corporelle ou hémi-corporelle chez l'Homme, mais elle n'est pas réalisée ainsi chez l'animal (Soyer et Doliger, 2011). Son utilisation seule est en général plutôt décevante (Doliger, 2003).

La motivation des propriétaires est absolument nécessaire étant donné la disponibilité géographique des traitements réalisables dans un petit nombre de centres en France et selon des protocoles de radiothérapie qui comprennent souvent plusieurs séances par semaine. Des possibilités d'hospitalisations spéciales peuvent être proposées aux propriétaires lorsque leur animal est engagé dans un protocole d'irradiation (Soyer et Doliger, 2011).

3.1.2.2. Chimiothérapie

Les arrêtés du 18 juin et du 29 octobre 2009 ont permis aux vétérinaires de retrouver l'accès légal aux molécules anticancéreuses, avec une nouvelle liste de médicaments utilisés suivant le principe de la cascade, parmi lesquels 10 molécules ont une action antitumorale (Soyer et Doliger, 2011). Les molécules de chimiothérapie sont soumises à des règles d'approvisionnement spécifiques ; certaines molécules sont accessibles en officine, comme la

vincristine, la vinblastine et la L-asparaginase, alors que les autres sont à retirer directement auprès des laboratoires comme la lomustine ou le carboplatine notamment.

Chez le chien, les mélanomes sont réputés être peu chimiosensibles. L'utilisation adjuvante de la chimiothérapie reste donc très controversée (Doliger, 2003). Les molécules qui ont été testées dans ce contexte, et en particulier pour des mélanomes buccaux, sont la dacarbazine, le carboplatine, la doxorubicine et la mitoxantrone mais en général, les taux de réponses ont été très faibles et les durées de réponses trop courtes. L'utilisation de l'adriamycine est décrite mais avec son efficacité est discutée (Soyer et Doliger, 2011).

Avant d'envisager un protocole de chimiothérapie, le propriétaire doit donner son consentement éclairé au vétérinaire praticien. Il est essentiel d'expliquer qu'il s'agit d'un traitement cytotoxique, nécessitant des règles d'utilisations particulières et appropriées. Les conséquences pour l'animal, l'entourage (femmes enceintes et enfants) et l'environnement doivent être explicitées aux propriétaires, tout comme les modalités d'administration du traitement (Soyer et Doliger, 2011). En effet, un tel traitement n'est possible que dans un centre de chimiothérapie et nécessite une hospitalisation d'en moyenne 24 heures. Ce protocole requiert une pièce dédiée, au moins temporairement, des systèmes clos, des seringues verrouillées, le port de protections individuelles (blouses, gants, masques et lunettes) et un système de recueil des déjections et des excréta en vue de leur incinération. A la sortie de l'animal, une surveillance rigoureuse doit être mise en place par les propriétaires, d'une durée variable selon la molécule anticancéreuse utilisée. C'est le rôle du vétérinaire d'expliquer la conduite à tenir pendant cette période de surveillance. Les principales recommandations aux propriétaires sont décrites dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Recommandations aux propriétaires lors de la période de surveillance accrue (D'après Soyer et Doliger, 2011)

	Chez le chien	Chez le chat
Recommandations	- Diluer les urines, - Retirer les selles à l'aide de gants et d'un sac et les jeter dans les toilettes, - Les gants et le premier sac utilisés sont à placer dans un second sac fermé à jeter à la poubelle.	- Interdire les sorties, - Nettoyer la litière à l'eau de javel à l'aide de gants, - Evacuer les excréta dans les toilettes, - Les gants utilisés et le reste de la litière sont à placer dans un sac fermé puis mis à la poubelle.

En cancérologie vétérinaire, il faut garder à l'esprit que l'objectif est de prolonger l'espérance de vie sans dégrader la qualité de vie de l'animal. Des études estiment que 5 à 40 % des animaux traités manifestent les effets d'une toxicité d'intensité souvent modérée ce qui signe une différence importante avec la médecine humaine (Soyer et Doliger, 2011). Les doses et la fréquence d'administration doivent être déterminées parfois au détriment d'une efficacité maximale afin de permettre une toxicité tolérable.

3.1.2.3. Immunothérapie spécifique active : la vaccination

La chimiothérapie étant décevante, des méthodes alternatives comme l'immunothérapie offrent de nouvelles possibilités de traitements du mélanome. En médecine vétérinaire, l'exploitation clinique des cytokines, par exemple celle de l'interleukine 2 ou de l'interféron- α , est parfois envisagée mais elle est à l'origine d'effets secondaires importants. L'immunothérapie spécifique active se démarque avec une récente avancée thérapeutique vétérinaire : la vaccination anti-tumorale (Soyer et Doliger, 2011).

Un vaccin thérapeutique a été développé. Il est composé d'un plasmide portant une séquence d'ADN codant la tyrosinase humaine. Il a été développé aux Etats Unis pour l'indication du mélanome buccal canin comme « vaccin anti-tumoral » par les laboratoires Merial (vaccin ONCEPT®). En effet, les tyrosinases humaine et canine sont deux enzymes présentant une similitude de 87 %. Le vaccin s'administre par voie intra-musculaire ; les myocytes canins transfectés produisent la tyrosinase humaine, reconnue étrangère par le système immunitaire du chien et à l'origine d'une réponse humorale via des anticorps anti-tyrosinase. Les anticorps produits vont également reconnaître la tyrosinase canine, en particulier celle qui exprimée par les mélanocytes tumoraux, car ceux-ci sont plus immunogènes que les mélanocytes sains (Soyer et Doliger, 2011).

Une étude sur 58 chiens présentant un mélanome buccal de stades II et III, ayant subi au préalable une exérèse chirurgicale, a été effectuée (Grosenbaugh *et al.*, 2011). Les chiens ont reçu 4 injections initiales puis un rappel à 6 mois. La durée de survie des chiens vaccinés a été comparée à celle d'une cohorte de 53 chiens témoins. La durée de survie des chiens témoins a été déterminée à l'aide de leur historique et de la méthode de Kaplan Meier. La méthode de Kaplan Meier permet d'estimer la survie d'un individu pour une maladie donnée d'après des données de survie pré-définies. Les résultats ont montré que le vaccin anti-tumoral augmentait significativement la durée de survie des animaux vaccinés. Il semble que le traitement soit plus efficace sur les chiens de stade II comparé à ceux de stade III ; ces derniers présentent des durées de survie significativement plus courtes. La durée de survie médiane des chiens vaccinés n'a pas pu être déterminée car moins de 50 % d'entre eux sont morts de la maladie avant la fin de la période d'observation (Grosenbaugh *et al.*, 2011). Les effets post-vaccinaux observés étaient locaux et minimes, avec majoritairement une douleur légère au point d'injection, une tuméfaction ou un hématome local (Grosenbaugh *et al.*, 2011). Les conclusions de l'étude montrent l'efficacité et la sécurité du vaccin recombinant en tant que traitement adjuvant du mélanome canin buccal.

3.2. Perspectives thérapeutiques : intérêt de la thérapie ciblée

La thérapie ciblée est aujourd'hui pratiquée en médecine vétérinaire. On peut donner l'exemple de deux molécules disponibles sur le marché, pour le moment indiquées pour le mastocytome canin de haut grade associé à une mutation du récepteur à activité tyrosine kinase KIT : le masitinib (Masivet®) et le tocéranib (Palladia®) produits respectivement par les laboratoires ABSciences (2009) et Pfizer (2010). Une étude randomisée en double aveugle portant sur 202 chiens atteints d'un mastocytome de grade II à III a été effectuée (Hahn *et al.*, 2008). Les animaux de l'essai ont reçu du masitinib à 12,5 mg/kg/jour par voie orale ou bien le placebo. Le masitinib a montré une durée de survie sans progression tumorale globale de 118 jours versus 75 jours pour le placebo. La durée de survie sans progression tumorale a même atteint 253 jours pour les chiens dont le masitinib correspondait à la première ligne de traitement. Le traitement a été généralement bien toléré avec des effets secondaires de grade 1 à 2 ; les diarrhées et vomissements ont été les effets les plus observés (Hahn *et al.*, 2008).

Concernant les médicaments tels que l'ipilimumab ou le vemurafenib utilisés chez l'Homme pour le mélanome, ils ne sont pas encore employés dans le cadre du traitement du mélanome canin. Pourtant le chien est une espèce fréquemment utilisée pour les essais thérapeutiques des molécules destinées à la pharmacopée humaine. La thérapie ciblée s'imposerait donc comme une voie de traitement anticancéreux qu'il resterait tout à fait possible d'appliquer secondairement au modèle canin.

Le facteur limitant la mise en application de ces traitements novateurs demeure le manque de données génétiques sur le mélanome canin. Cette limitation est vouée à disparaître avec le développement d'une carte génétique des maladies héréditaires et des gènes de prédisposition aux maladies du chien, comme en a témoigné l'existence du projet européen LUPA, et d'autres projets de par le monde. La connaissance de l'origine génétique des mélanomes canins permettra de hiérarchiser l'intérêt d'une molécule par rapport à une autre. Les conclusions de l'analyse génétique de Gillard *et al.* (2013) sont en défaveur de l'existence d'une fréquence élevée des mutations dans le gène *B-RAF* dans les mélanomes canins contrairement à ce qui est observé chez l'Homme. Les données actuelles suggèrent l'existence dans les mélanomes canins de mutations dans les gènes *N-RAS* et *PTEN*. On peut donc penser que s'il n'y a pas d'altération dans le gène *B-RAF*, le vemurafenib, qui est un inhibiteur spécifique de l'isoforme B-RAF V600E ne présentera pas d'intérêt pour traiter le mélanome canin. Pourtant, on peut également se dire qu'étant donnée la position en amont de la protéine RAS par rapport à la protéine B-RAF dans la voie de signalisation, une mutation dans le gène *N-RAS* entraînera également une activation de la voie qui sera atténuée voire bloquée par un inhibiteur classique de B-RAF comme le dabrafenib. Ainsi, en attendant les conclusions des analyses génétiques en cours, il serait intéressant de tester les effets d'inhibiteurs de B-RAF dans le traitement du mélanome canin. L'ensemble des effets secondaires associés à l'administration des inhibiteurs de B-RAF reste un frein à l'acceptation du traitement en médecine vétérinaire. Comme nous l'avons dit précédemment, l'objectif en cancérologie animale est d'augmenter sensiblement l'espérance de vie de l'animal tout en maintenant la toxicité sous un seuil tolérable, parfois au détriment d'une efficacité maximale, permettant à l'animal de bénéficier d'une qualité de vie supérieure. Les effets indésirables des inhibiteurs de B-RAF tels que les éruptions cutanées, les arthralgies, la fatigue, les tumeurs cutanées de type carcinome épidermoïde, et la photosensibilisation seront à prendre en compte et à expliciter formellement lors de la prise de décision du traitement avec les propriétaires.

Concernant l'ipilimumab qui est un anticorps monoclonal humain, l'emploi de ce groupe de molécule poserait a priori problème. En effet, l'usage de ce type d'anticorps nécessite que la séquence de l'épitope reconnue par l'anticorps soit strictement la même chez le chien et chez l'Homme, ce qui n'est pas évident. Telle quelle, l'injection d'ipilimumab chez le chien serait très probablement à l'origine d'une réponse immunitaire importante, rendant inefficace toute injection ultérieure. Il faut ajouter à cela le délai de réponse assez long de la molécule, en moyenne 12 à 20 semaines chez l'Homme, qui est très peu avantageux et applicable en médecine vétérinaire. De même, comme pour les inhibiteurs de B-Raf, les effets secondaires de l'ipilimumab (colite auto-immune, dermatite, hépatite, hypophysite, pancréatite, thyroïdite) pourraient être responsables d'une qualité de vie inacceptable pour les propriétaires de l'animal traité. Ces points rendent l'utilisation des anticorps monoclonaux humains, comme l'ipilimumab, a priori limitée en oncologie vétérinaire. L'application de l'immunothérapie n'est pas totalement à exclure chez le chien, comme en témoigne l'étude de Koya *et al.* (2012). Koya *et al.* avait travaillé sur le mélanome et plus précisément sur l'intérêt de la combinaison du traitement par le vemurafenib et d'une immunothérapie par transfert adoptif chez des lignées de souris porteuses d'une mutation *B-Raf V600E*. L'immunothérapie adoptive correspond au transfert d'une source autologue de lymphocytes T dirigés contre les cellules tumorales ; les résultats avaient montré un taux de réponses anti-tumorales supérieur avec la combinaison du vemurafenib et de l'immunothérapie, par rapport aux monothérapies respectives (Koya *et al.*, 2012). Les conclusions de l'étude étaient donc en faveur de l'ajout de l'immunothérapie au traitement initial par les inhibiteurs de la voie des MAP kinases.

Par ailleurs, le coût d'un traitement combiné d'inhibiteurs de la voie des MAP kinases et d'immunothérapie peut être un obstacle rédhibitoire à l'essai thérapeutique. En médecine humaine, il faut par exemple compter, pour un patient de poids moyen, 42 000 euros pour 6 mois de traitement par le vemurafenib et 90 000 pour 4 cycles de traitement par l'ipilimumab (Clinique Saint-Jean l'Ermitage, 2014). En effet, le prix du traitement serait sans doute trop élevé pour une bonne partie de la clientèle. On est là un cas de figure très similaire à l'usage de l'interféron en oncologie vétérinaire. C'est pourquoi des dispositions sont prises : l'interféron est proposé en tenant compte méticuleusement du profil des propriétaires et du cas de l'animal. L'interféron a ainsi pu faire ses preuves dans des maladies telles que la parvovirose canine. Il n'est donc pas aberrant de penser qu'il pourrait en être de même avec le traitement par les inhibiteurs de la voie des MAP kinases combinés à l'immunothérapie. Au vu des résultats pertinents des essais cliniques entrepris chez l'Homme, la thérapie ciblée représente une voie thérapeutique à fort potentiel en oncologie vétérinaire (Koya *et al.*, 2012).

CONCLUSION

Chez l'Homme, le mélanome est bien connu pour être un cancer très agressif, à fort potentiel métastatique. Il est assez fréquent avec environ 100 à 132 000 nouveaux cas rapportés dans le monde par an. Le but de notre étude bibliographique était de comparer le mélanome de l'Homme avec le mélanome qui affecte le Chien. Les mélanomes possèdent de nombreuses similitudes chez l'Homme et le chien. La grande différence réside dans les sites anatomiques d'apparition des tumeurs (Withrow et Vail, 2007 ; Bower et Waxman, 2010). Chez l'Homme, la peau est très généralement le site de la tumeur primaire et les mélanomes cutanés constituent l'immense majorité des tumeurs (Bower et Waxman, 2010). Chez le chien, les mélanomes apparaissent fréquemment sur les muqueuses, en particulier buccales (Withrow et Vail, 2007 ; Marignac, 2010).

La quantité des connaissances sur la génétique du mélanome chez l'Homme et chez le chien est très différente. Les données génétiques en médecine humaine sont bien plus riches (Soria *et al.*, 2012). Des altérations génétiques ont été identifiées dans les mélanomes de l'Homme, comme les mutations dans le gène *B-RAF* présentes dans environ 50 % des mélanomes cutanés (Davies *et al.*, 2002). Ces informations sont fondamentales pour la recherche de nouveaux traitements et cela explique en partie le faible nombre d'options thérapeutiques disponibles aujourd'hui en oncologie vétérinaire pour soigner le mélanome canin. De nombreux projets internationaux ont pour objectif de caractériser les altérations génétiques des mélanocytes tumoraux. Les résultats de ces projets permettront à la médecine vétérinaire de rattraper son retard et permettront de traiter le mélanome du chien comme celui de l'Homme. En attendant, plusieurs analyses génétiques suggèrent que les mutations du gène *B-RAF* ne sont pas aussi fréquentes dans les mélanomes canins que dans les tumeurs humaines. En revanche, des mutations dans les gènes *N-RAS* et *PTEN* ont bien été identifiées dans les mélanomes canins (Gillard *et al.*, 2013).

En médecine humaine, le traitement du mélanome passe par un temps chirurgical consistant en l'exérèse du mélanome avec des marges le plus saines possibles (Soria *et al.*, 2012 ; INCa, 2013). La radiothérapie et la chimiothérapie font partie des options thérapeutiques largement utilisées (Soria *et al.*, 2012 ; INCa, 2013). Les recherches actuelles se tournent plutôt vers de nouvelles perspectives de traitements, en particulier la thérapie ciblée (Quéreux, 2013 ; INCa, 2013). La thérapie ciblée, avec l'immunothérapie et l'inhibition de la voie des MAP kinases, a suscité un grand intérêt car de multiples essais cliniques visant à comparer l'efficacité de la chimiothérapie avec celle de la thérapie ciblée ont donné des résultats très encourageants (Soria *et al.*, 2012 ; Flaherty *et al.*, 2012 ; INCa, 2013). Cela a été en particulier le cas des anticorps monoclonaux comme les anti-CTLA-4 avec l'ipilimumab et celui des inhibiteurs de la protéine B-RAF avec le vemurafenib, un inhibiteur spécifique de l'isoforme BRAF V600E (Quéreux, 2013). Les résultats suggèrent d'utiliser ces molécules qui augmentent l'espérance de vie des patients traités. Elles pourraient être utilisées seules, ou de façon combinée (Flaherty *et al.*, 2012). L'échappement tumoral observé lorsque les inhibiteurs de B-RAF sont utilisés et les effets secondaires du vemurafenib et de l'ipilimumab sont au centre des préoccupations des cliniciens (Nazarian *et al.*, 2010 ; Chapman, 2011). Des études de toxicité et d'innocuité sont encore nécessaires avant d'élargir l'utilisation de ces molécules.

En médecine vétérinaire, le traitement du mélanome canin se résume principalement à une exérèse chirurgicale (Soyer et Doliger, 2011). La radiothérapie post-chirurgicale est vivement conseillée mais n'a pas montré de résultats tellement pertinents (Soyer et Doliger, 2011). En

ce qui concerne la chimiothérapie, le mélanome canin étant peu chimio-sensible, elle s'avère être souvent décevante (Soyer et Doliger, 2011). L'une des avancées thérapeutiques vétérinaires a été l'application directe de l'immunothérapie active spécifique : la vaccination anticancéreuse (Soyer et Doliger, 2011). Le vaccin ONCEPT des laboratoires MERIAL augmenterait de plusieurs mois l'espérance de vie des chiens vaccinés (Grosenbaugh *et al.*, 2011). Le traitement du mélanome chez le chien est bien plus limité que chez l'Homme. La cancérologie vétérinaire devra donc tirer parti de la médecine humaine ; en particulier lorsque des essais cliniques montreront des résultats encourageants, en particulier en thérapie ciblée, comme l'illustrent les exemples des inhibiteurs de la voie des MAP kinases et de l'immunothérapie.

L'utilisation de ces molécules chez le chien est délicate et le manque de données génétiques dans l'espèce canine ne nous permet pas d'anticiper de façon certaine leur intérêt dans le traitement du mélanome canin. Par ailleurs, les effets secondaires des inhibiteurs de la voie des MAP kinases, comme les inhibiteurs de B-RAF, bien décrits chez l'Homme ne conviennent pas forcément aux grands principes de la cancérologie vétérinaire, qui privilégie une qualité de vie acceptable au détriment d'une efficacité maximale. De même, l'immunothérapie via l'utilisation des anticorps monoclonaux humains, tels que l'ipilimumab qui donnent des résultats très encourageants en médecine humaine, serait a priori non pertinent chez le chien. Cependant, les thérapies ciblées ouvrent sur diverses classes de molécules et offrent un grand potentiel de recherche de traitements pour le mélanome canin.

En parallèle, il serait intéressant d'évaluer la demande de traitement du mélanome en clientèle vétérinaire. L'aspect financier est un facteur déterminant pour les propriétaires et un tel traitement serait sans doute très onéreux, comme c'est le cas pour un traitement par l'interféron alpha. Il pourrait être judicieux de concevoir au préalable une étude sur la demande des vétérinaires et de leur clientèle, basée sur l'envoi d'un questionnaire aux différents centres d'oncologie français. Une étude comme celle-ci nous permettrait de savoir s'il existe une demande de nouvelles thérapies. Les questions-types pourraient être les suivantes :

- Combien de cas de mélanome canin rencontrez-vous par an ?
- Quels traitements réalisez-vous ? Radiothérapie ? Chimiothérapie ? Vaccination anti-tumorale ?
- Quels sont le taux de réponse et la durée de survie associés à ce traitement ?
- Y a-t-il une demande d'un traitement novateur de la part des propriétaires ?
- Les propriétaires vous semblent-ils motivés pour se lancer dans un traitement novateur, donc potentiellement onéreux et cela même si des effets secondaires de grade important sont associés à la prise du traitement ?

Au final, comprendre les bases génétiques du mélanome chez le chien représente un enjeu clef pour pouvoir appliquer chez les animaux les thérapies actuellement développées en cancérologie humaine. La thérapie ciblée ouvre sur de nouvelles options thérapeutiques pour le mélanome très intéressantes en médecine humaine et vétérinaire.

BIBLIOGRAPHIE

ADDEO A, RINALDI CR. Treatment with ipilimumab : a case report of complete response in a metastatic malignant melanoma patient. *Case Rep Oncol*, 2013, **6**, 285-288.

AGARWALA SS, KIRKWOOD JM. Interferons in the therapy of solid tumors. *Oncology*, 1994, **51**, 129-136.

AIM, AIM at Melanoma [en ligne]. Mise à jour le 11/05/13. [www.aimatmelanoma.org] (Consulté le 19/05/13).

AMBROSINI G, SCHWARTZ GK. The MEK inhibitor AZD244 (selumetinib) is active in GNAQ mutant ocular melanoma cells. In : Proceedings of the 101st Annual Meeting of the American Association of Cancer research. Washington DC, April 17-21, 2010, abstract 5035.

ANDREWS DW, SCOTT CB, SPERDUTO PW, FLANDERS AE, GASPAR LE, SCHELL MC, *et al.* Whole brain radiation therapy with or without stereotactic radiosurgery boost for patients with one to three brain metastases : phase III results of the RTOG 9508 randomised trial. *Lancet*, 2004, **363**, 1665-1672.

ANFORTH R, BLUMETTI TC, CLEMENTS A, KEFFORD R, LONG GV, FERNANDEZ-PENAS P. Systemic retinoids for the chemoprevention of cutaneous squamous cell carcinoma and verrucal keratosis in a cohort of patients on BRAF inhibitors. *Br J Dermatol*, 2013, **169**, 1310-1313.

ARONSOHN MG, CARPENTER JL. Distal extremity melanocytic nevi and malignant melanomas in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*, 1990, **26**, 605-612.

BANASZYNSKI M, KOLESAR JM. Vemurafenib and ipilimumab : new agents for metastatic melanoma. *Am J Health Syst Pharm*, 2013, **70**, 1205-1210.

BEKAI-SAAB T, PHELPS MA, LI X, SAJI M, GOFF L, SAE WOOK KAUH J, *et al.* Multi-institutional phase II of selumetinib in patients with metastatic biliary cancers. *J Clin Oncol*, 2011, **29**, 2357-2363.

BERTOLOTTO C, BUSCA R, BALLOTTI R, ORTONNE JP. L'AMP cyclique est un régulateur de la pigmentation de la peau. *Med sci*, 2001, **17**, 177-185.

BOASBERG P, HAMID O, O'DAY S. Ipilimumab : unleashing the power of the immune system through CTLA-4 blockage. *Semin Oncol*, 2010, **37**, 672-704.

BOLON B, CALDERWOOD MAYS MB, HALL BJ. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic effect. *Vet Pathol*, 1990, **27**, 96-102.

BOSTOCK DE. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *Br Vet J*, 1986, **142**, 1-19.

BOWER M, WAXMAN J. *Oncology*. 2nd Ed. Wiley-Blackwell, Oxford, 2010, 285 p.

BRAHMER JR, TYKODI SS, CHOW LQ, HWU WJ, TOPALIAN SL, HWU P, *et al.* Safety and activity of anti-PDL-1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*, 2012, **366**, 2455-2465.

BRUIX J, SHERMAN M, LLOVET JM, BEAUGRAND M, LENCIONI R, BURROUGHS AK, *et al.* Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol*, 2001, **35**, 421-430.

CAMPAGNE C. Expression de la protéine adaptatrice RACK1 dans les tumeurs mélanocytaires du chien et du cheval. Thèse Méd Vét, Alfort, 2010.

CARVAJAL R, SOSMAN JA, QUEVEDO F, MILHEM MM, JOSHUA AM, KUDCHADKAR RR, *et al.* Phase II study of selumetinib versus temozolomide in gnaq / Gna11 mutant uveal melanoma. *J Clin Oncol*, 2013, **31**, abstract 9003.

CASTIN GE, HEARING VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*, 2007, **21**, 976-989.

CEDEF, Collège des Enseignants en Dermatologie de France [en ligne]. Mise à jour le 11/05/13. [cedef.org] (Consulté le 17/05/13).

CHAPMAN PB, HAUSCHILD A, LARKIN JMG, ROBERT C, HAANEN JB, RIBAS A, *et al.* Updated overall survival results from BRIM 3, a phase III, randomised, open-label, multicentre trial comparing BRAF inhibitor vemurafenib with dacarbazine (DTIC) in previously untreated patients with BRAF V600E mutated melanoma. *J Clin Oncol*, 2012, **30**, abstract 8502.

CHAPMAN PB, HAUSCHILD A, ROBERT C, HAANEN JB, ASCIERTO P, LARKIN J, *et al.*, Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*, 2011, **364**, 2507-2516.

CHAPMAN PB. Vemurafenib and ipilimumab to be tried together. *The melanoma letter*, 2011, **29**, 5.

CHELSEA MA, ARMSTRONG AW. Severe adverse events from the treatment of advanced melanoma : a systemic review of severe side effects associated with ipilimumab, vemurafenib, interfero alpha-2b, dacarbazine and interleukin-2. *J Dermatol Treatment*, 2014, **25**, 401-408.

CHOI H, CHARNSANGAVEJ C, FARIA SC, MACAPINLAC HA, BURGESS MA, PATEL SR *et al.* Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. *J Clin Oncol*, 2007, **25**, 1753-1759.

Clinique Saint-Jean l'Ermitage, clinique du cancer [en ligne]. Mise à jour le 15/03/14. [<http://www.clinique-saint-jean-ermitage.fr>] (Consulté le 11/10/14).

COTRAN RS, POBER JS, GIMBRONE MA, SPRINGER TA, WIEBKE EA, GASPARI AA *et al.* Endothelial activation during interleukine-2 immunotherapy. A possible mechanism for the vascular leak syndrome. *J Immunol*, 1988, **140**, 1883-1888.

CURTIN JA, BUSAM K, PINKEL D, BASTIAN BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*, 2006, **24**, 4340-4346.

DAVIES H, BIGNELL GR, COX C, STEPHENS P, EDKINS S, CLEGG S, *et al*. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 2002, **417**, 949-954.

DELEVOYE C, GIORDANO F, VAN NIEL G, RAPOSO G. La biogenèse des mélanosomes : l'échiquier de la pigmentation. *Med Sci Paris*, 2011, **27**, 153-162.

DE LORIMIER LP. Le mélanome malin chez le chien. *Veterinariarius*, 2013, **29**, 36.

DELTA E. Données actuelles du syndrome uvéodermatologique du chien, équivalent au syndrome de VKH de l'homme. Thèse Méd Vét, Lyon, 2009.

DI GIACOMO AM, BAGIOLI M, MAIO M. The emerging toxicity profiles of anti – CTLA-4 antibodies across clinical indications. *Semin Oncol*, 2010, **37**, 499-507.

DOLIGER S. *VADE-MECUM de Cancérologie Vétérinaire*. 1^{ère} Ed. Editions MED'COM, Paris, 2003, 224 p.

DONIA M, FAGONE P, NICOLETTI F, ANDERSEN RS, HOGDALL E, STRATEN PT, *et al*. BRAF inhibition improves tumor recognition by the immune system : potential implications for combinatorial therapies against melanoma involving adoptive T cell transfer. *Oncoimmunology*, 2012, **1**, 1476-1483.

DUMMER R, ROBERT C, NYAKAS M, McARTHUR GA, KUDCHADKAR RR, GOMEZ-ROCA C, *et al*. Initial results from a phase I, open label, dose escalation study of the oral BRAF inhibitor LGX818 in patients with BRAF V600 mutant advanced or metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 2013, **31**, abstract 9028.

DUMMER R. Open label pilot study of vemurafenib in previously treated metastatic melanoma patients with symptomatic brain metastases. *Ann Oncol*, 2012, **23**, 361-375.

EGGERMONT AM, ROBERT C. New drugs in melanoma : it's a whole new world. *Eur J Cancer*, 2011, **47**, 2150-3007.

EISENHAEUER EA, THERASSE P, BOGAERTS J, SCHWARTZ LH, SARGENT D, FORD R, *et al*. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 2009, **45**, 228-247.

FERRONE S. Human tumor-associated antigen mimicry by anti-idiotypic antibodies : immunogenicity and clinical trials in patients with solid tumors. *Ann NY Acad Sci*, 1993, **690**, 214-224.

FLAHERTY KT, INFANTE JR, DAUD A, GONZALEZ R, KEFFORD RF, SOSMAN J, *et al*. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*, 2012, **367**, 1694-1703.

FLAHERTY KT, PUZANOV I, KIM KB, RIBAS A, McARTHUR G, SOSMAN JA, *et al*. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 2011, **363**, 809-819.

FLAHERTY KT, ROBERT C, HERSEY P, NATHAN P, GARBE C, MILHEM M, *et al.* Improved survival with MEK inhibition in B-RAF mutated melanoma. *N Engl J Med*, 2012, **367**, 107-114.

FLAHERTY KT, YASOTHAN U, KIRKPATRICK P. Vemurafenib. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, **10**, 811-902.

FONTENAY E. Les hypo-pigmentations cutanées chez les carnivores domestiques. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 2007, 157 p.

FOURNIER LS, THIAM R, FRIJA G. RECIST 1.1 : Mode d'emploi. *Cancero dig*, 2011, **3**, 27-28.

FREEDBERG IM, EISEN AZ, WOLFF K, FITZPATRICK TB *et al.* *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine – Vol 1*. McGraw-Hill, New york, 1999, 2408 p.

FRIEBE A, HORN M, SCHMIDT F, JANSSEN G, SCHMID-WENDTNER MH, VOLKENANDT M, *et al.* Dose dependent development of depressive symptoms during adjuvant interferon alpha treatment of patients with malignant melanoma. *Psychosomatics*, 2010, **51**, 466-473.

GARBE C, PERIS K, HAUSCHILD A, SAIAG P, MIDDLETON M, SPATZ A, *et al.* Diagnosis and treatment of melanoma, European consensus-based interdisciplinary guideline. *European Journal of Cancer*, 2012, **48**, 2375-2390.

GELOT P, DUTARTRE H, KHAMMARI A, BOISROBERT A, SCHMITT C, DEYBACH JC, *et al.* Vemurafenib : an unusual UVA induced photosensitivity. *Exp Dermatol*, 2013, **22**, 297-308.

GILLARD M, CADIEU E, DE BRITO C, ABADIE J, VERGIER B, DEVAUCHELLE P, *et al.* Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2013, **27**, 90-102.

GOULIE PG, VAN PEL A. Defined antigens recognized by T lymphocytes on human tumors. *Current Opin Oncol*, 1993, **5**, 1043-1048.

GROSENBAUGH DA, LEARD AT, BERGMAN PJ, KLEIN MK, MELEO K, SUSANECK S, *et al.* Safety and efficacy of xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *Am J Vet Res*, 2011, **72**, 1631-1638.

GUAGUERE E, ALHAIDARI Z. Troubles de la pigmentation mélanique. In: Encyclopédie vétérinaire - Dermatologie. Elsevier, Paris, 1992, **2**, 2600, 1-8.

HAHN KA, OGILVIE G, RUSK T, DEVAUCHELLE P, LEBLANC A, LEGENDRE A *et al.* Masitinib is safe and effective for the treatment of canine mast cell tumors. *J Vet Intern Med*, 2008, **22**, 1301-1309.

HAMID O, ROBERT C, DAUD A, HODI FS, HWU WJ, KEFFORD R, *et al.* Safety and tumor response with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med*, 2013, **369**, 133-144.

HEBBAR M, PRUVOT FR, ROMANO O, TRIBOULET JP, DE GRAMONT A. Integration of neoadjuvant and adjuvant chemotherapy in patients with resectable liver metastases from colorectal cancer. *Cancer Treat Rev*, 2009, **35**, 668-675.

HEBBAR M, VANLEMMENS L, LECOMTE S, BONNETERRE J. Immunothérapie du mélanome malin. Nouvelles perspectives. *Rev Méd Int*, 1995, **16**, 260-270.

HERSEY P, McLEOD GRC, THOMSON DB. Treatment of advanced malignant melanoma with recombinant interferon alpha-2a in combination with DTIC : long term follow up of two phase II studies. *Br J Haematol*, 1991, **79**, 60-66.

HERSEY P. Cellular therapy. *Current Opin Oncol*, 1993, **5**, 1049-1054.

HIBBS JB, WESTENFELDER C, TAINTOR R, VAVRIN Z, KABLITZ C, BARANOWSKI RL *et al.* Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest*, 1992, **89**, 867-877.

HODI FS, FRIENDLANDER P, CORLESS CL, HEINRICH MC, MAC RAE S, KRUSE A, *et al.* Major response to imatinib mesylate in KIT – mutated melanoma. *J Clin Oncol*, 2008, **26**, 2046-2051.

HODI FS, O'DAY SJ, McDERMOTT DF, WEBER RW, SOSMAN JA, HAANEN JB, *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 2010, **363**, 711-723.

INCa, Institut National du Cancer, Agence nationale sanitaire et scientifique en cancérologie [en ligne]. Mise à jour le 11/05/13. [www.e-cancer.fr] (Consulté le 17/05/13).

IRWAN YY, FENG Y, GACH HM, SYMANOWSKI JT, MCGREGOR JR, VENI G *et al.* Quantitative analysis of cytokine-induced vascular toxicity and vascular leak in the mouse brain. *J Immunol Methods*, 2009, **349**, 45-55.

JAKOB JA, BASSETT RL, LAZAR AJ, ALVARADO GC, ROHLFS ML, RICHARD J, *et al.* Clinical characteristics and outcomes associated with *B-RAF* and *NRAS* mutations in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 2011, **29**, abstract 8500.

JORDAN EJ, KELLY CM. Vemurafenib for the treatment of melanoma. *Expert Opin Pharmacother*, 2012, **13**, 2533-2543.

KIM KB, KEFFORD R, PAVLICK AC, INFANTE JR, RIBAS A, SOSMAN JA, *et al.* Phase II study of the MEK 1 / MEK 2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic B-RAF mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a B-RAF inhibitor. *J Clin Oncol*, 2013, **31**, 482-489.

KOYA R, MOK S, OTTE N, BLACKETOR KJ, BEGONYA CA, TUMEH PC, *et al.* BRAF inhibitor vemurafenib improves the anti tumor activity of adoptive cell immunotherapy. *Cancer res*, 2012, **72**, 3928-3937.

LACOUTURE ME, WOLCHOK JD, YOSIPOVITCH G, KAHLER KC, BUSAM KJ, HAUSCHILD A. Ipilimumab in patients with cancer and the management of dermatologic adverse events. *J Am Acad Dermatol*, 2014, **71**, 161-169.

LAENNEC RTH. Sur les mélanoses. *Bulletin de la Faculté de Médecine de Paris*, 1806, **1**, 24-26.

LANCASTER HO. Some geographical aspects of the mortality from melanoma in Europeans. *Med J Aust*, 1956, **43**, 1082-1087.

LAPRIE C, ABADIE J, AMARDEIL H, NET JL, LAGADIC M, DELVERDIER M. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Vet Dermatol*, 2001, **12**, 139-147.

LEQUARRE AS, ANDERSSON L, ANDRE C, FREDHOLM M, HITTE C, LEEB T *et al.* LUPA : A European initiative taking advantage of the canine genome architecture for unravelling complex disorders in both humans and dogs. *The Vet Journal*, 2011, **189**, 155-159.

LIPSKER P, CRIBIER P. *Mélanome : épidémiologie, diagnostic, critères cliniques et histopathologiques du pronostic, évolution et dépistage*. Polycopié, Faculté de médecine de Strasbourg, Unité de cancérologie et oncohématologie, 2005, 27 p.

LIVINGSTON PO. Approches to augmenting the IgG antibody response to melanoma ganglioside vaccines. *Ann NY Acad Sci*, 1993, **690**, 204-213.

LONG GV, TREFZER U, DAVIES MA, KEFFORD RF, ASCIERTO PA, CHAPMAN PB, *et al.* Dabrafenib in patients with val600glu or val600Lys BRAF mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK MB) : a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 2012, **13**, 1087-1095.

MANGANA J, LEVESQUE MP, KARPOVA MB, DUMMER R. Sorafenib in melanoma. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, **21**, 557-568.

MARGOLIN K, ERNSTOFF MS, HAMID O, LAWRENCE D, McDERMOTT D, PUZANOV I, *et al.* Ipilimumab in patients with melanoma and brain metastases : an open label phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 2012, **13**, 459-465.

MARIGNAC G. *Notes de cours*. Polycopié, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité d'enseignement de dermatologie, 2010, 252 p.

MILLANTA F, FRATINI F, CORAZZA M, CASTAGNARO M, ZAPPULLI V, POLI A. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumors : correlation with histological parameters, location and clinical behaviour. *Res Vet Sci*, 2002, **73**, 45-51.

MILLER WH, GRIFFIN CE, CAMPBELL KL. Structure and function of the skin. In : *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*. Saunders-Elsevier, Philadelphia, 2012, 1-56.

MITTAPALLI RK, VAIDHYANATHAN S, DUDEK AZ, ELMQUIST WF. Mechanisms limiting distribution of the threonine-protein kinase BRAF (V600E) inhibitor dabrafenib to the brain : implications for the treatment of melanoma brain metastases. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, **344**, 655-664.

MONNIER L, MILANO G, PENAULT-ILORCA F, MERLIN JL. Ciblage des récepteurs tyrosine kinase membranaires : y a – t – il de la résistance dans l’HER ? *Bull Cancer*, 2004, **91**, 685-694.

MORTON DL, EILBER FR, HOLMES EC, HUNT JS, KETCHAM AS, SILVERSTEIN MJ *et al.* BCG immunotherapy of malignant melanoma : summary of a seven years experience. *Ann Surg*, 1974, **180**, 635-641.

MUSSELMAN DL, LAWSON DH, GUMNICK JF, MANATUNGA AK, PENNA S, GOODKIN RS, *et al.* Paroxetine for the prevention of depression induced by high dose interferon alpha. *N Engl J Med*, 2001, **344**, 961-966.

NAZARIAN R, SHI H, WANG Q, KONG X, KOYA RC, LEE H, *et al.* Melanomas acquire resistance to B-RAF (V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*, 2010, **468**, 973-977.

OPPENHEIM MH, LOTZE MT. Interleukin-2 : solid – tumor therapy. *Oncology*, 1994, **51**, 154-169.

PALMER RM, BRIDGE L, FOXWELL NA, MONCADA S. The role of nitric oxide in endothelial cell damage and its inhibition by glucocorticoids. *J Pharmacol*, 1992, **105**, 11-12.

QUÉREUX C. Quoi de neuf en cancérologie cutanée ? *Ann Dermatol Venereol*, 2013, **140**, 283-292.

RAISONNIER A. *Structures biologiques*. Polycopié. Faculté de médecine de Paris - Pierre et Marie Curie, Unité de biochimie, 2009, 169 p.

RAMOS J. *Types histologiques des tumeurs humaines*. Polycopié, Faculté de médecine Montpellier-Nîmes, Unité d’anatomie pathologique, 2007, 57 p.

RATE WR, SOLIN LJ, TURRISI AT. Palliative radiotherapy for metastatic malignant melanoma : brain metastases, bone metastases, and spinal cord compression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1988, **15**, 859-864.

REBECCA VW, SONDAK VK, SMALLEY KSM. A brief history of melanoma : from mummies to mutations. *Melanoma Res*, 2012, **22**, 114-122.

RIBAS A, HODI FS, CALLAHAN M, KONTO C, WOLCHOK JD. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N Engl J Med*, 2013, **368**, 1365-1366.

ROBERT C, DUMMER R, GUTZMER R, LORIGANP, KIM KB, NYAKAS M *et al.* Selumetinib plus dacarbazine versus placebo plus dacarbazine as first line treatment for B-Raf mutant metastatic melanoma : a phase 2 double blind randomised study. *Lancet Oncol*, 2013, **14**, 733-740.

ROBERT C, GHIRINGHELLI F. What is the role of cytotoxic T lymphocyte – associated antigen 4 blockage in patients with metastatic melanoma ? *Oncologist*, 2009, **14**, 848-861.

ROBERT C, THOMAS L, BONDARENKO I, O'DAY S, WEBER J, GARBE C, *et al.* Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 2011, **364**, 2517-2526.

ROBERT C. Manifestations dermatologiques des anticorps anti-CTLA-4. In : SIBAUD V, ROBERT C. Manifestations cutanées des thérapies ciblées anticancéreuse : une nouvelle dermatologie. Toulouse : Privat, 2010, 89-94.

ROELS S, TILMANT K, DUCATELLE R. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumors in cats and dogs. *J Comp Pathol*, 1999, **121**, 13-24.

ROSENBERG SA, LOTZE MT, YANG JC. Prospective randomized trial of high dose interleukine 2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1993, **85**, 622-632.

SAIAG P, GROB JJ, GROSSHANS E. Epithelial and melanotic skin tumors – Melanomas. *Ann Dermatol Venereol*, 2002, **129**, 143-148.

SCHAD K, BAUMANN CONZETT K, ZIPSER MC, ENDERLIN V, KALMA-RASHEV J, FRENCH LE, *et al.* Mitogen activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition results in biphasic alteration of epidermal homeostasis with keratinocytic apoptosis and pigmentation disorders. *Clin Cancer Res*, 2010, **16**, 1058-1064.

SCHULTHEISS PC. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. *J Vet Diagn Invest*, 2006, **18**, 422-425.

SERTOLI MR, QUEIROLO P, BAJETTA E, NEGRETTI E, CALABRESI F, BARDUAGNI L, *et al.* Dacarbazine (DTIC) with or without recombinant interferon alpha-2a at different dosages in the treatment of stage IV melanoma patients : preliminary results of a randomised trial. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 1992, **11**, 345.

SIBAUD V, DELORD JP, CHEVREAU C, GANGLOFF D, GARRIDO-STOWHAS I. Toxicité dermatologique des nouvelles thérapies ciblées anticancéreuses utilisées en oncodermatologie. *Ann Chir Plast Esth*, 2012, **57**, 106-113.

SLOMINSKI A., TOBIN D.J., SHIBAHARA S., WORTSMAN J. Melanin pigmentation in Mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev*, 2004, **84**, 1155-1228.

SMALLEY KSM. PLX-4032, a small molecule B-RAF inhibitor for the potential treatment of malignant melanoma. *Current Opin Invest Drugs*, 2010, **11**, 699-706.

SMITH SH, GOLDSCHMIDT MH, McMANUS PM. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol*, 2002, **39**, 651-678.

SORIA JC, VIGNOT S, MASSARD C, MIR O. *Cours de chimiothérapie antitumorale et traitement médical du cancer, XXVII^e cours de l'Institut de cancérologie Gustave-Roussy*. 1^{ère} Ed. Editions John Libbey Eurotext, Paris, 2012, 486 p.

SOSMAN JA, KIM KB, SCHUCHTER L, GONZALEZ R, PAVLICK AC, WEBER J, *et al.* Survival in BRAF V600 mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med*, 2012, **366**, 707-714.

SOYER C, DOLIGER S. *VADE-MECUM de Cancérologie Vétérinaire*. 2^e Ed. Editions MED'COM, Paris, 2011, 320 p.

SZNOL M, KLUGER HM, HODI FS, McDERMOTT DF, CARVAJAL RD, LAWRENCE DP, *et al.* Survival and long term follow up of safety and response in patients with advanced melanoma in a phase I trial of nivolumab. *J Clin Oncol*, 2013, **31**, abstract 9006.

TAIEB S, PENEL N, BONODEAU F, CEUGNART L. Nouvelle version des critères RECIST : aspects pratiques et limites de l'imagerie morphologique. *J Radiol*, 2009, **90**, 1210-1211.

THERASSE P, ARBUCK SG, EISENHAUER EA, WANDERS J, KAPLAN RS, RUBINSTEIN L, *et al.* New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst*, 2000, **92**, 205-216.

THIAM R, FOURNIER LS, TRINQUART L. Optimizing the size variation threshold for the CT evaluation of response in metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *Ann Oncol*, 2010, **21**, 936-941.

THOMAS M, ROBERT C. Dermatologic manifestations of MEK inhibitors. In : SIBAUD V, ROBERT C. Cutaneous side effects induced by targeted anticancer therapies : a new dermatology. Toulouse : Privat, 2010, 71-82.

THOMSON D, ADENA M, McLEOD GRC, HERSEY P, GILL P, COATES A, *et al.* Interferons alpha-2a (IFN) does not improve response or survival when added to dacarbazine (DTIC) in metastatic melanoma : results of a multi-institutional Australian randomised trial QMP8704. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 1992, **11**, 343.

TOPALIAN SL, HODI FS, BRAHMER JR, GETTINGER SN, SMITH DC, McDERMOTT DF, *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 2012, **366**, 2443-2454.

TRINQUIER I. La pigmentation mélanique cutanée chez le chien et le chat. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Université Paul-Sabatier, Toulouse, 1990, 111 p.

URTEAGA O, PACK G. On the antiquity of melanoma. *Cancer*, 1966, **19**, 607 – 610.

VAN DER BRUGGEN P, TRAVERSARI C, CHOMEZ P. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 1991, **254**, 1643-1647.

WEBER J, THOMPSON JA, HAMID O, MINOR D, AMIN A, RON I, *et al.* A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase II study comparing the tolerability and efficacy of ipilimumab administered with or without prophylactic budesonide in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Clin Cancer Res*, 2009, **15**, 5591-6008.

WEINER L, HAN R, SCICCHITANO BM, LI J, HASEGAWA K, GROSSI M, *et al.* Dedicated epithelial recipient cells determine pigmentation patterns. *Cell*, 2007, **130**, 932–942.

WITHROW SJ, VAIL DM. (2007) *Small Animal Clinical Oncology*. 4th Ed., Saunders-Elsevier, Philadelphia, 2007, 823 p.

WOLCHOK JD, NEYNS B, LINETTE G, NEGRIER S, LUTZKY J, THOMAS L, *et al.* Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma : a randomised, double-blind, multicentre, phase 2 dose-rangind study. *Lancet Oncol*, 2010, **11**, 155-164.

TRAITEMENT DU MÉLANOME PAR LE VEMURAFENIB ASSOCIÉ À L'IPILIMUMAB : INTÉRÊT CHEZ LE CHIEN ?

BALANGER Marie

RÉSUMÉ :

Le mélanome est un cancer très agressif à fort potentiel métastatique chez l'Homme, le plus souvent à localisation cutanée. Cette entité pathologique affecte également l'espèce canine surtout au niveau des muqueuses, en particulier buccales. Dans un premier temps, les aspects génétiques, histologiques et cliniques du mélanome chez l'Homme et chez le chien sont présentés et comparés. Les données génétiques en médecine humaine mettent en avant l'importance des mutations du gène *B-RAF* alors que les études en cancérologie vétérinaire ont plutôt révélé la présence de mutations *N-RAS* et *PTEN*. Les différents axes de traitement existants en médecine humaine sont ensuite exposés : traitement chirurgical et adjuvants, avec les options disponibles telles que la radiothérapie, la chimiothérapie et la thérapie ciblée. Concernant la thérapie ciblée, les recherches ont mis en avant l'intérêt de l'utilisation de l'immunothérapie et des inhibiteurs de la voie des MAP kinases pour traiter le mélanome. L'ipilimumab (un anticorps monoclonal anti-CTLA-4 humain) et le vemurafenib (un inhibiteur de B-RAF pour la mutation *B-RAF V600E*) se distinguent par leurs résultats très encourageants chez l'Homme. Les traitements effectués en cancérologie vétérinaire comme l'exérèse chirurgicale, associée ou non à la radiothérapie et/ou à la chimiothérapie traditionnelles sont décrits dans la dernière partie. L'utilisation de l'immunothérapie active spécifique à travers la vaccination anticancéreuse est l'une des récentes avancées thérapeutiques vétérinaires, qui permettrait une augmentation de la durée de survie de quelques mois d'après les études. Enfin, les perspectives de nouveaux traitements plus efficaces chez le chien sont abordées, en questionnant l'intérêt de l'emploi des thérapies ciblées, comme l'ipilimumab et le vemurafenib, sur le mélanome canin. L'application de ces molécules est très délicate chez le chien. D'une part, les mutations génétiques en cause dans le mélanome canin sont différentes et les effets secondaires des inhibiteurs de B-RAF ne sont pas négligeables, ce qui déroge aux principes de la cancérologie vétérinaire. D'autre part, les anticorps monoclonaux, comme l'ipilimumab, sont a priori difficilement utilisables chez le chien car ce sont des anticorps humains. Utilisés tels quels, il se pourrait qu'ils soient non seulement inefficaces mais aussi à l'origine d'une réponse immunitaire importante lors d'injections ultérieures. Cependant, les thérapies ciblées regroupent de nombreuses classes de molécules ; l'utilisation des inhibiteurs de la voie des MAP kinases n'est pas à exclure dans l'immédiat, tout comme les possibilités d'immunothérapies. L'immunothérapie spécifique active avec la vaccination et l'immunothérapie adoptive sont par exemple des thérapies envisageables. En médecine humaine comme vétérinaire, les thérapies ciblées offrent de nouvelles options thérapeutiques très intéressantes.

**Mots clefs : MÉLANOME / CANCEROLOGIE / CHIMIOOTHERAPIE / CARNIVORE
/ CHIEN / HOMME.**

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Pr. Panthier Jean-Jacques

Assesseur : Dr. Pilot-Storck Fanny

TREATMENT OF MELANOMA WITH VEMURAFENIB ASSOCIATED WITH IPILIMUMAB : ANY DOG INTEREST ?

BALANGER Marie

ABSTRACT :

Melanoma is a really aggressive cancer with high metastatic potential in humans, the most often with cutaneous sites. This pathological entity also affects canine species, especially in the oral cavity. First, genetic, histological and clinical aspects of human melanoma are presented and compared to the canine's. Different mutations have been detected : *B-RAF* mutations in most of human melanomas but *N-RAS* and *PTEN* mutations in canine melanomas. Then, different treatment options for humans are explained : surgery, adjuvant treatments like radiotherapy, chemotherapy and targeted therapy. Research on targeted therapy underlined the interest of immunotherapy and MAP kinases inhibitors ; ipilimumab (monoclonal human antibody anti –CTLA-4) and vemurafenib (B-RAF V600E inhibitor) have shown encouraging results in human melanoma. Eventually, available therapies in veterinary oncology are described such as surgical removal, associated with radiotherapy or chemotherapy. The use of specific active immunotherapy with antitumoral vaccination represents one of the most recent therapeutic veterinary breakthrough which, according to trials, may increase survival time by months. Finally, the prospects of more efficient treatments in canine melanomas are discussed, particularly the benefit of using ipilimumab and vemurafenib in canine species. The use of those medications are quite delicate in canine species. First, canine mutations are different from human's and we obviously cannot ignore B-RAF inhibitors side effects as they do not fit to veterinary cancerology principles. Then, monoclonal antibodies, such as ipilimumab, are difficult to apply in canine melanomas because of their human nature. Human monoclonal antibodies may be inefficient in canine species and may also cause a huge immune response after one injection. Nevertheless, there are lots of molecules in targeted therapy ; the use of MAP kinases inhibitors is still envisaged, as other immunotherapies. For example, specific active immunotherapy with vaccination and adoptive immunotherapy are some possibilities to explore in canine melanomas. In human and veterinary medicine, targeted therapies can offer a whole new world of melanomas treatment options.

Keywords : MELANOMA / CANCEROLOGY / CHEMOTHERAPY / CARNIVORE / DOG / HUMAN.

Jury :

President : Pr.

Supervisor : Pr. Panthier Jean-Jacques

Assessor : Dr. Pilot-Storck Fanny