



HAL
open science

Développement d'un modèle tumoral en trois dimensions : outil pour la recherche contre le mélanome

Florian Lombart

► **To cite this version:**

Florian Lombart. Développement d'un modèle tumoral en trois dimensions : outil pour la recherche contre le mélanome. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01293027

HAL Id: dumas-01293027

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01293027v1>

Submitted on 24 Mar 2016

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

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

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE
FACULTE DE MEDECINE D'AMIENS

Année 2015

n°2015 - 165

**DEVELOPPEMENT D'UN MODELE TUMORAL EN TROIS DIMENSIONS :
OUTIL POUR LA RECHERCHE CONTRE LE MELANOME**

THESE POUR LE DIPLÔME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Le 1^{er} décembre 2015

Par

Florian LOMBART

Membres du Jury :

Président du Jury : Madame le Professeur Catherine LOK

Directeurs de thèse : Monsieur le Docteur Jean-Philippe ARNAULT
Madame le Professeur Muriel VAYSSADE

Assesseurs : Monsieur le Professeur Henri SEVESTRE
Monsieur le Professeur Bruno CHAUFFERT
Monsieur le Professeur Antoine GALMICHE

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE
FACULTE DE MEDECINE D'AMIENS

Année 2015

n°2015 - 165

**DEVELOPPEMENT D'UN MODELE TUMORAL EN TROIS DIMENSIONS :
OUTIL POUR LA RECHERCHE CONTRE LE MELANOME**

THESE POUR LE DIPLÔME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Le 1^{er} décembre 2015

Par

Florian LOMBART

Membres du Jury :

Président du Jury : Madame le Professeur Catherine LOK

Directeurs de thèse : Monsieur le Docteur Jean-Philippe ARNAULT
Madame le Professeur Muriel VAYSSADE

Assesseurs : Monsieur le Professeur Henri SEVESTRE
Monsieur le Professeur Bruno CHAUFFERT
Monsieur le Professeur Antoine GALMICHE

A mon Maître et Présidente du Jury

Madame le Professeur Catherine LOK

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Dermatologie - Vénérologie)

Assesseur du 3^{ème} cycle

Chef du Service de Dermatologie

Chef du Pôle des 5 Sens

Vous me faites l'honneur de présider ce jury.

Je vous remercie pour votre accueil au sein du service et pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de mon internat.

Merci également de m'avoir permis de réaliser ce travail.

A mon Maître,

Monsieur le Professeur Henri SEVESTRE

Professeur d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques à l'UFR de Médecine d'Amiens

Chef du Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU d'Amiens Picardie

Adjoint au chef de l'Oncopôle

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse.

Je vous remercie pour votre accueil et votre disponibilité au cours de mon master 1 et de

l'aide que vous et votre service m'avez apportée au cours de ce travail.

A mon Maître,

Monsieur le Professeur Bruno CHAUFFERT

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Oncologie médicale)

Responsable du service d'Oncologie médicale

Oncopôle

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse.

Recevez ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A mon Maître,

Monsieur Le Professeur Antoine GALMICHE

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Centre de biologie humaine - Biologie spécialisée

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse.

Je vous remercie pour le matériel que vous avez pu me fournir pour mener à bien ce travail.

Recevez ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de ma profonde estime.

A mon Maître et Directeur de Thèse,

Monsieur Le Docteur Jean Philippe ARNAULT

Praticien Hospitalier (Dermatologie - Vénérologie)

Merci d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse.

Tu aimes transmettre tes connaissances.

J'ai beaucoup progressé en dermatologie grâce à toi.

J'espère continuer à apprendre à tes côtés au cours de ma carrière.

A mon Maître et Directeur de Thèse,

Madame le Professeur Muriel VAYSSADE

Co-responsable de l'équipe « Cellules Biomatériaux Bioréacteurs »

Université de technologie de Compiègne

Tu m'as fait le plaisir et l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de thèse.

Je te remercie pour ton accueil au sein du laboratoire et pour ta disponibilité.

J'ai pu découvrir et apprécier le domaine de la recherche grâce à toi.

Merci pour tes conseils toujours très avisés.

A mes Maîtres d'internat,

Monsieur le **Docteur Guillaume CHABY**, Monsieur le **Docteur Ali DADBAN**, Madame le **Docteur Anne CAUDRON**, Madame le **Docteur Angel CLABAUT**, Madame le **Docteur Fanny BRIGANT**, Madame le **Docteur Florie DHAILLE**, Madame le **Docteur Caroline TRIBOUT**, Madame le **Docteur Esther CARMI**, Madame le **Docteur Laetitia BEGUIN** et toute l'équipe du service de dermatologie du CHU d'Amiens.

J'ai beaucoup appris à vos côtés tout au long de mon internat et je vous en remercie. J'espère pouvoir encore profiter de vos expériences respectives.

Monsieur le **Professeur Pascal JOLY**, Monsieur le **Professeur Philippe MUsETTE**, Monsieur le **Docteur Xavier BALGUERIE**, Madame le **Docteur Anne Bénédicte DUVAL**, Madame le **Docteur Sophie DUVERT**, Madame le **Docteur Florence TETART**, Madame le **Docteur Priscille CARVALHO**, Madame le **Docteur Claire BOULARD**, Madame le **Docteur Noémie LITROWSKI** et toute l'équipe du service de dermatologie du CHU de Rouen.

Mes six mois d'inter-CHU m'ont beaucoup fait progresser. Merci pour votre accueil.

Madame le **Docteur Dominique MERRIEN** et tout le service de MIPI du CH de Compiègne.

Monsieur le **Professeur Patrice FARDELLONE**, Monsieur le **Docteur Franck GRADOS**, Monsieur le **Docteur Julien PACCOU** et toute l'équipe du service de rhumatologie du CHU d'Amiens.

Mes stages hors-dermatologie ont été très enrichissants. Merci.

Je dédie cette thèse,

A Joséphine,

Voilà 4 ans que tu partages ma vie. Tu es mon équilibre et ma raison d'être. Je t'aime.

A mes parents,

Je ne serais jamais arrivé jusque-là sans vous. Votre soutien sans faille et le dévouement pour vos enfants vous honore. Je suis fier d'être votre fils. Je vous aime.

A mes frères Aldric et Gautier et ma sœur Aline,

Nous avons partagé de très bons moments pendant notre enfance. Chacun a maintenant trouvé son chemin et je suis fier de vos réussites. Même si les moments que nous partageons aujourd'hui se font plus rares, ils sont toujours aussi plaisants.

A ma tante Bibiche,

C'est toi qui m'as donné l'envie de devenir médecin. Ta passion pour ton métier fait de toi un exemple à suivre. Merci pour tes conseils et ton soutien.

A ma cousine Mélyne,

Tu m'as précédé de quelques années et tu as su me donner l'impulsion nécessaire à la réussite de mes études. Merci pour tes conseils et ton soutien.

A papi et mamie « près ». A papi et mamie « loin », partis trop tôt,

Papi Fernand, tu es le seul présent aujourd'hui. J'espère pouvoir partager encore beaucoup de bons moments avec toi. Je suis fier d'être ton petit fils. Mamie nous a quittés, mais je me souviendrai toujours des moments que nous avons partagés avec elle.

A Christophe, mon ami,

Quand je retrace mes études, tu es omniprésent. Tu as été là à chaque instant qu'il soit bon ou mauvais, de notre première année à aujourd'hui. Tu m'as écouté, conseillé et soutenu. Notre amicale rivalité nous a permis d'aller chercher le meilleur en nous. Je suis admiratif de l'homme et de l'excellent médecin que tu es. Nous partagerons encore, j'en suis sûr, des moments inoubliables. Notre amitié m'est très chère.

A mes oncles et tantes. A mes cousins et cousines,

Les repas de famille qui nous réunissent sont des moments chaleureux que j'apprécie tout particulièrement. Mon enfance n'aurait pas été aussi joyeuse sans vous.

A Audrey, Yoann, Marion, Guillaume, Victoria, Romaric, Marion, Aurélie, Edouard, Francis, Sophie,

Nous avons partagé tant de bons moments ensemble. J'espère que les meilleurs restent à venir.

A Adélaïde, Agathe, Pauline, Clémence, Pascaline, Adèle, Isabelle et leur moitié,

Je garde d'agréables souvenirs de nos années d'études, de nos soirées et de nos vacances. Les années passent et nous nous éloignons progressivement. Mais chaque retrouvaille est toujours un plaisir.

A Sébastien, Fabien et leur moitié,

Le semestre passé en votre compagnie a été un pur bonheur. Je savoure chacune de nos retrouvailles.

A mes co-internes Juliette, Audrey, Lilia, Anne-Sophie, Maëlle, Thomas, Fanny et tous les autres,

J'ai appris à aimer la dermatologie et la médecine en générale en votre compagnie. J'espère pouvoir continuer à partager avec vous.

A l'équipe du laboratoire de BMBI de l'UTC pour leur accueil chaleureux et leur disponibilité tout au long de mon stage de master 2. L'esprit d'équipe et l'ambiance toujours agréable qui règnent dans le laboratoire m'ont permis de travailler dans un environnement serein et d'apprécier cette immersion dans le monde de la recherche. Je remercie particulièrement Christophe, Pascal, Vanessa, Jean Luc, Kamelia, Biao, Olfat et Kayla.

Un merci tout particulier à **Claire** pour sa relecture.

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES :

2D : Deux dimensions

3D : Trois dimensions

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ATCC : American Type Culture Collection

ATU : Autorisation temporaire d'utilisation

CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Dimethyl sulfoxyde

DNase : désoxyribonucléase

EdU : 5-éthynyl-2'-deoxyuridine

EMEM : Eagle's Minimum Essential Medium

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HDFn : Human Dermal Fibroblasts, neonatal

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

INCa : Institut national du cancer

MAP Kinases : Mitogen-Activated Protein Kinases

MEC : Matrice extracellulaire

MTS : (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium)

OCT : Optimal Cutting Temperature

PD1 : Programmed cell death 1

PD-L1 : Programmed death-ligand 1

PET : Polyéthylène téréphthalate

RGP : Phase de croissance radiale

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SVF : Sérum de veau fœtal

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

UV : Ultraviolet

VGP : Phase de croissance verticale

TABLE DES MATIERES :

I) INTRODUCTION	p 14
1) Généralités	p 14
2) Principales étapes de la mélanomagénèse	p 14
3) La voie des MAP Kinases (Mitogen-Activated Protein Kinases)	p 15
4) Prise en charge thérapeutique du mélanome	p 16
5) Etat de l'art : les modèles d'études des mélanomes	p 18
a. Modèles d'études <i>in vitro</i>	p 18
i. Modèles 2D	p 18
ii. Modèles 3D	p 19
iii. Cultures d'explants	p 19
iv. Ingénierie tissulaire	p 20
b. Modèles d'études <i>in vivo</i> : modèles expérimentaux murins	p 20
6) Objectifs de l'étude	p 21
II) MATERIEL ET METHODES	p 22
1) Lignées cellulaires et réactifs utilisés	p 22
2) Evaluation de la viabilité cellulaire	p 22
a. Numération cellulaire et test au bleu trypan	p 22
b. Test au MTS	p 23
3) Constitution d'un équivalent de derme	p 23
4) Culture des cellules SK-MEL-28 sur les équivalents de derme	p 25
5) Caractérisation histologique des modèles	p 25
6) Test EdU Click-iT	p 25
7) Test TUNEL Click-iT	p 26
8) Evaluation de l'effet du vémurafénib sur le modèle « derme + mélanocytes »	p 26
9) Tests statistiques	p 27
III) RESULTATS	p 28
1) Tests 2D des lignées cellulaires établies de mélanome métastatique	p 28
a. Prolifération et viabilité cellulaire des cellules SK-MEL-3 et SK-MEL-28 cultivées en 2D et traitées par vémurafénib	p 28
b. Activité métabolique sous vémurafénib (test au MTS)	p 31

c.	Synthèse des résultats 2D	p 31
2)	Développement et caractérisation du modèle 3D	p 32
a.	Développement du modèle de derme	p 32
b.	Caractérisation du modèle « derme + mélanocytes »	p 33
i.	Coloration hématoxyline-éosine	p 33
ii.	Evaluation de la prolifération cellulaire	p 36
iii.	Evaluation de l'apoptose	p 37
3)	Traitement des modèles 3D par vémurafénib	p 38
a.	Evaluation de la prolifération	p 38
b.	Numération cellulaire après traitement par collagénase	p 39
c.	Evaluation de l'apoptose	p 40
4)	Synthèse des résultats 3D	p 40
5)	Effet du vémurafénib sur la lignée HDFn	p 42
IV)	DISCUSSION	p 43
1)	Effet du vémurafénib sur les lignées SK-MEL-3 et SK-MEL-28 en 2D	p 43
2)	Développement et caractérisation du modèle 3D « derme + mélanocytes »	p 43
3)	Traitement du modèle 3D par vémurafénib	p 44
4)	Intérêts et limites de ce type de modèle 3D	p 45
V)	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	p 48
VI)	BIBLIOGRAPHIE	p 49

I) INTRODUCTION

1) Généralités

Le mélanome est un cancer à haut potentiel métastatique, dont l'incidence est en augmentation dans la plupart des pays Occidentaux [1]. D'après les données de l'INCa, en France, le nombre de nouveaux cas de mélanome en 2012 était estimé à 11 176, et le nombre de décès à 1 672 (www.e-cancer.fr).

Le mélanome se développe à partir des mélanocytes, qui sont essentiellement localisés dans la peau, où ils jouent un rôle déterminant dans sa pigmentation et dans la protection des kératinocytes contre les rayons UV. Les mélanocytes sont situés dans la couche basale de l'épiderme, au contact des kératinocytes (Figure 1) [2].

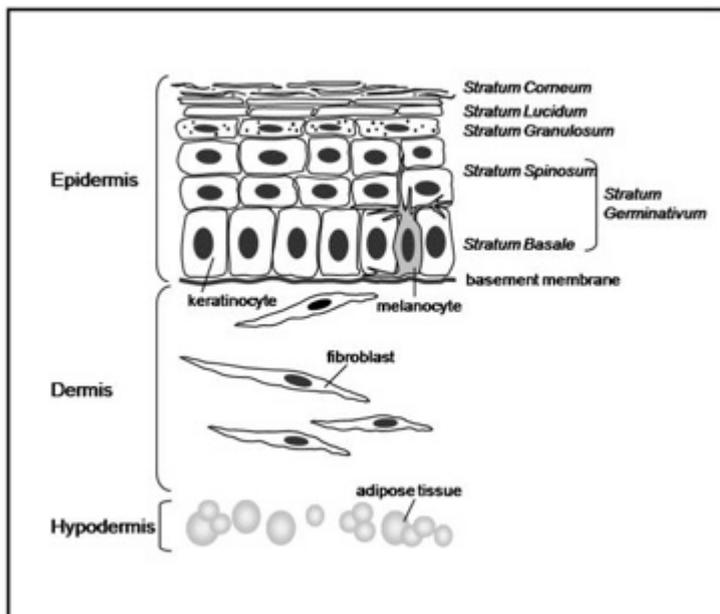


Figure 1 : Schéma simplifié de la peau humaine (d'après Brohem *et al.* 2011 [2]) :

L'épiderme est essentiellement constitué de kératinocytes organisés en plusieurs couches (basale, spineuse, granuleuse, cornée) et de mélanocytes (couche basale). Une membrane basale sépare l'épiderme du derme, lui-même constitué de fibres de collagènes, d'élastine, de protéoglycanes et de fibroblastes. L'hypoderme est constitué de tissu adipeux.

2) Principales étapes de la mélanomagénèse

Selon le modèle linéaire classique, la mélanomagénèse se caractérise par plusieurs étapes (Figure 2) [3] :

- Prolifération d'un mélanocyte donnant un nævus bénin ou dysplasique (la grande majorité ne dégénère jamais).
- Phase de croissance radiale : prolifération des mélanocytes au sein de l'épiderme.
- Phase de croissance verticale : les cellules acquièrent des capacités d'invasion.

Rupture de la membrane basale et invasion du derme.

- Phase métastatique par dissémination via le réseau lymphatique et sanguin.

L'initiation et la progression de la mélanomagenèse sont liées à l'apparition successive de différentes mutations (B-Raf, N-Ras, PTEN, ...) conférant aux mélanocytes des capacités de prolifération, de résistance à l'apoptose et d'invasion.

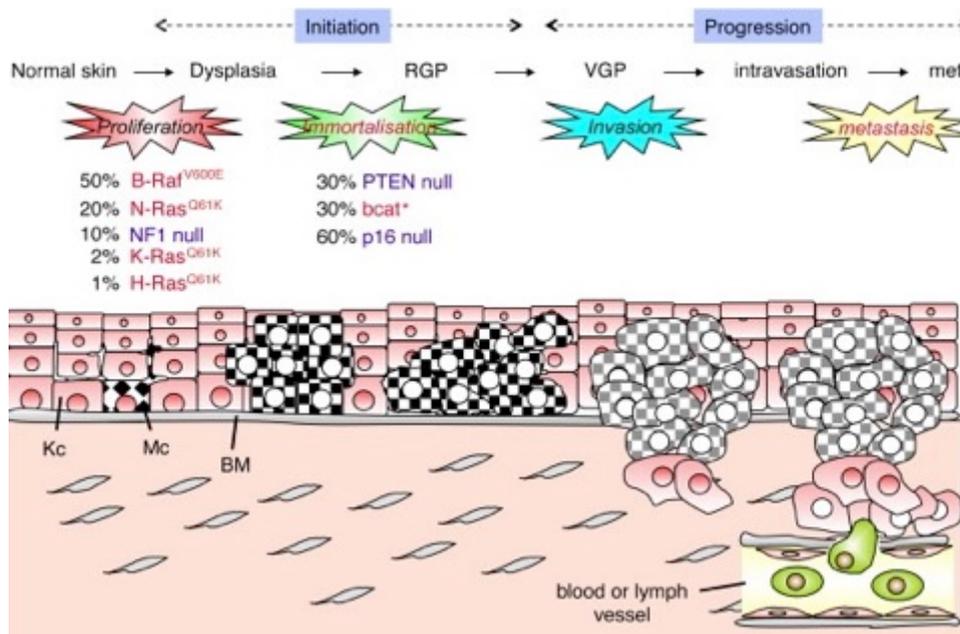


Figure 2 : Représentation schématique du processus multi-étapes de la mélanomagenèse (d'après Conde-Perez and Larue, 2014 [3]).

La mélanomagenèse est composée de deux phases principales : l'initiation et la progression. Durant l'initiation, des protéines mutées (B-Raf, N-Ras, ...) favorisent la prolifération cellulaire. Au cours de la progression du mélanome, l'invasion résulte d'une transition pseudo-épithélio-mésenchymateuse, de modifications dans les adhésions cellules-cellules, de la dégradation de la matrice extracellulaire, aboutissant à un phénotype métastatique.

RGP : phase de croissance radiale. VGP : phase de croissance verticale. met : métastase. Kc : kératinocyte. Mc : mélanocyte. BM : membrane basale.

3) La voie des MAP Kinases (Mitogen-Activated Protein Kinases)

La voie des MAP kinases est la principale voie altérée dans le mélanome et l'une des principales cibles thérapeutiques actuelles [4].

En effet, une activation aberrante de cette voie, résultant de différentes mutations, est présente dans plus de 80 % des mélanomes [5]. La mutation de *BRAF* est la plus fréquente (environ 50 % des cas), et correspond le plus souvent à la substitution d'une valine par un acide glutamique en position 600 (mutation V600E), conduisant à l'activation constitutive de la

protéine BRAF dont l'activité kinase est jusqu'à 500 fois supérieure à celle de la forme sauvage [6]. Cette activation va ainsi favoriser la prolifération cellulaire et la survie des cellules tumorales [7] (Figure 3). Ceci explique l'intérêt d'avoir développé des inhibiteurs de BRAF et de MEK dans la prise en charge du mélanome métastatique.

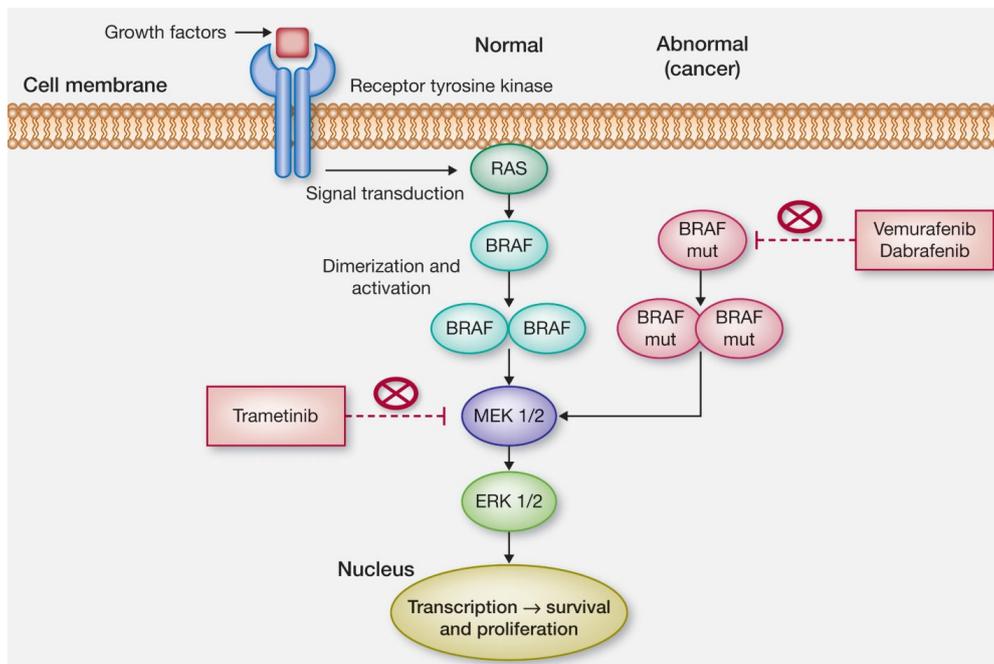


Figure 3 : La voie des MAP Kinases (d'après Ilieva *et al.* 2014 [7]).

La fixation de ligands (facteurs de croissance notamment) sur des récepteurs (à activité tyrosine kinase par exemple) entraîne une activation de la voie. Après dimérisation, les récepteurs recrutent et activent la GTPase RAS. RAS favorise la dimérisation et l'activation des protéines kinases de la famille RAF (ARAF, BRAF et CRAF). La protéine RAF phosphoryle MEK, qui à son tour phosphoryle et active ERK, déclenchant ainsi la transcription de gènes impliqués dans la régulation positive du cycle cellulaire. Dans certains cancers comme le mélanome, des mutations de *BRAF* entraînent une activation constitutive de la kinase BRAF. Cette activation favorise ainsi la survie et la prolifération cellulaire. Les inhibiteurs de BRAF (vémurafénib et dabrafénib) et de MEK (tramétinib) sont des thérapies ciblées pouvant être utilisées pour réguler cette voie en cas de mutation.

4) Prise en charge thérapeutique du mélanome

En l'absence de métastase, ou en présence de métastases résécables, le traitement de première intention est la chirurgie [8].

La prise en charge du mélanome métastatique reposait, encore récemment, sur l'administration de chimiothérapie cytostatique (dacarbazine et fotémustine), avec un faible

taux de réponse [9]. Depuis 2010, deux voies thérapeutiques prometteuses ont émergé : l'immunothérapie (anti-CTLA-4 et anti-PD1) et les thérapies ciblées (inhibiteurs de BRAF et de MEK).

Le vémurafénib, inhibiteur compétitif de la kinase BRAF, est la première molécule de thérapie ciblée à avoir montré une efficacité sur la survie globale et sans progression des patients atteints de mélanome métastatique *BRAF* muté en comparaison à la dacarbazine [10]. Elle a longtemps été la seule thérapie ciblée disponible.

Depuis quelques années, le développement et la mise à disposition de plusieurs molécules ont constamment fait évoluer les recommandations de prise en charge. Le choix du traitement se fait néanmoins toujours en fonction du statut de *BRAF* (sauvage ou muté), au mieux déterminé sur l'analyse d'une métastase. En l'absence de mutation *BRAF*, les anti-PD1 (nivolumab et pembrolizumab) sont actuellement proposés en première ligne [11, 12]. L'AMM vient de leur être accordée (septembre 2015). Lorsque *BRAF* est muté en position V600, les inhibiteurs de BRAF et de MEK, sont prescrits en association (vémurafénib + cobimétinib ou dabrafénib + tramétinib), actuellement en ATU de cohorte [13, 14]. Toutes ces molécules ont montré une amélioration de la survie globale et sans progression. L'ipilimumab, immunothérapie anti-CTLA-4, et les chimiothérapies n'ont plus qu'une place palliative en x^{ème} ligne. L'intérêt de l'association anti PD1 + anti CTLA-4 est à l'étude.

Il n'est pas possible pour le moment, malgré les analyses tendant à personnaliser les prescriptions, de prédire la réponse d'un patient aux traitements. Les analyses de BRAF, NRAS et KIT sont proposées en routine et celle de ALK, MET, ROS1 et ROS1 dans les essais de l'INCa (www.e-cancer.fr). L'expression de PD-L1 en immunohistochimie est encore en cours d'évaluation. La survenue d'effets secondaires, parfois grave, n'est pas non plus prévisible. La prise de vémurafénib se complique par exemple de nausées, diarrhées, myalgies, arthralgies, photosensibilité, rashes cutanés et favorise la survenue de kérato-acanthomes et de carcinomes épidermoïdes cutanés [10].

Par conséquent, il apparaît nécessaire de développer de nouveaux marqueurs robustes permettant de prédire la réponse aux traitements. Des modèles tissulaires, basés sur les cellules cancéreuses des patients et prenant en compte la complexité physiologique des tumeurs (la sensibilité des cellules tumorales dépendant grandement du microenvironnement tumoral), pourraient être utilisés afin de tester *in vitro* l'efficacité des traitements. De tels modèles pourraient par ailleurs aider au développement de nouveaux traitements.

5) Etat de l'art : les modèles d'études des mélanomes

a. Modèles d'études *in vitro*

Ils ont permis de mieux comprendre la physiopathologie des différents cancers, dont le mélanome, et de tester l'efficacité des molécules utilisées en thérapeutique.

i. Modèles 2D

Il existe actuellement plus de 5000 lignées cellulaires de mélanome (humaines et murines) dont environ 200 lignées humaines très bien caractérisées (aberrations et expressions géniques, propriétés biologiques, etc.) [15]. Ces lignées vont présenter différentes caractéristiques en fonction de la tumeur d'origine [16] : phase de croissance horizontale = RGP (WM35, SBCL2, etc.), phase de croissance verticale = VGP (WM115, WM793, WM278, etc.) et phase métastatique (SK-MEL-3, SK-MEL-28, etc.). Ces lignées de mélanome sont classiquement cultivées sur des dispositifs de culture en polystyrène traité, matériau favorable à l'adhésion et à l'étalement cellulaire : les cellules sont alors organisées sous la forme d'une monocouche (culture deux dimensions, 2D). La culture *in vitro* en 2D est largement exploitée en raison de sa facilité d'utilisation et de la possibilité de moduler aisément l'expression de protéines, permettant ainsi d'en identifier précisément les fonctions biologiques.

Cependant, l'expansion de ces cellules *in vitro* (et donc les « passages » nécessaires) est susceptible de conduire à une sélection phénotypique de cellules moins représentatives des cellules primaires du patient. Par ailleurs, dans ces modèles de cellules en monocouche, il n'existe pas de microenvironnement tumoral et l'absence totale d'organisation tridimensionnelle (3D) des cellules ne permet pas l'établissement d'interactions entre cellules et avec la matrice extracellulaire (MEC). Pour pallier ce défaut d'organisation cellulaire, différents modèles de culture 3D ont été développés [17].

ii. Modèles 3D

- **Agrégats ou sphéroïdes de cellules** [18]. Il s'agit de structures obtenues le plus souvent en utilisant des supports de culture empêchant l'adhésion et l'étalement des cellules. Dans cette configuration, les interactions cellulaires sont favorisées comme au sein d'une

tumeur. Ces modèles ont notamment été exploités pour comprendre les mécanismes régulant l'anoïkis (forme d'apoptose qui résulte de la perte d'interaction entre cellules) et/ou l'échappement à l'anoïkis de cellules métastatiques [19, 20], ainsi que pour tester l'action de molécules anti-cancéreuses [21]. En effet, en configuration 3D, la plupart des cellules tumorales deviennent plus résistantes aux agents de chimiothérapie que lorsque ces mêmes cellules sont cultivées en monocouche [22], la sensibilité des cellules dépendant fortement des interactions cellulaires. Les sphéroïdes sont maintenant largement exploités, en complément de la culture 2D traditionnelle, en particulier lors des étapes de criblage de nouvelles molécules thérapeutiques [23]. Ces modèles simples à réaliser restent cependant limités dans leur représentativité d'une tumeur *in vivo*, notamment en raison de l'absence de matrice extracellulaire.

- **Cultures 3D en gel de collagène.** Ce modèle consiste à inclure les cellules tumorales dans un gel de protéines de la matrice extracellulaire (collagène le plus souvent) [22, 24]. Dans cette configuration, les interactions établies entre les cellules et les protéines matricielles aboutissent à l'activation de voies de signalisation (intégrines, FAK, Akt, MAPK, ...) favorisant la survie des cellules cancéreuses et par conséquent la résistance aux molécules thérapeutiques.
- **Cocultures en 3D.** Il s'agit ici de mimer le microenvironnement tumoral en cultivant plusieurs populations cellulaires dans un gel de collagène [24]. Concernant les mélanomes, il a récemment été montré que des fibroblastes en gel de collagène cultivés avec des cellules de mélanome protègent les cellules tumorales de l'action cytotoxique de la doxorubicine [25].

iii. Cultures d'explants

Prélevés sur des patients, ils sont une alternative pour l'analyse des mélanomes. L'atout principal de ces modèles réside dans la présence de plusieurs populations de cellules et le maintien de l'architecture tridimensionnelle existante au sein de la tumeur. Cependant, ces cultures ne peuvent être maintenues que pendant un temps restreint (quelques jours), limitant ainsi leur utilisation [26].

iv. Ingénierie tissulaire

Les progrès réalisés ces dernières décennies dans le domaine de l'ingénierie tissulaire permettent d'envisager de créer de nouveaux modèles *in vitro*, spécifiquement dédiés à l'étude des tumeurs. Les scientifiques de différents secteurs (cancérologie, pharmacologie, ...) sont particulièrement intéressés par la mise au point de ces nouveaux modèles, complémentaires de ceux déjà existants [24, 26-28].

Les équivalents de peau humaine (derme + épiderme) sont tout particulièrement pressentis comme base de développement de nouveaux modèles *in vitro* pertinents pour l'étude des mélanomes. Plusieurs équipes ont travaillé sur le sujet et ont pu montrer des différences dans le comportement des lignées de mélanome en fonction de leur stade évolutif : les cellules en phase RGP restaient localisées dans l'épiderme, celles en phase VGP envahissaient le derme et celles en phase métastatique envahissaient le derme en formant des métastases [29, 30] (Figure 4).

Les équivalents de peau humaine pourraient ainsi à terme servir de support au développement de la thérapie personnalisée.

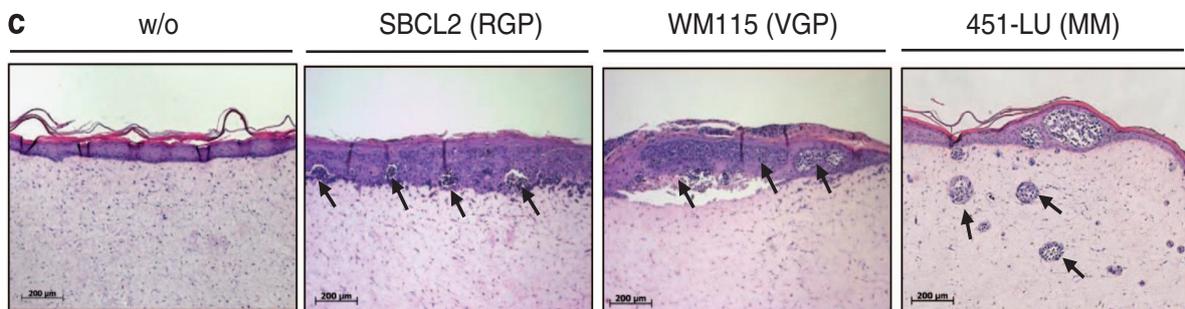


Figure 4 : Localisation des cellules de mélanome en fonction de leurs grades (RGP, VGP, métastatique) dans les équivalents de peau humaine (Vörsmann *et al.* 2013 [30]).
w/o : absence de mélanocyte. Coloration hématoxyline/éosine. Barre = 200 µm.

b. Modèles d'études *in vivo* : modèles expérimentaux murins

Ils ont également été développés pour l'étude du mélanome : souris mutées (gènes *BRAF*, *PTEN*, ...) [3] ou xéno greffées [31]. Ces modèles sont considérés comme plus pertinents que les lignées humaines et ont été largement exploités pour l'étude des mélanomes. Les modèles murins sont par ailleurs essentiels lors des tests précliniques de nouvelles molécules. Cependant, ces modèles présentent des limites. Tout d'abord leur coût qui est plus élevé que

pour les modèles précédents. Ensuite, la peau de souris est structurellement différente de la peau humaine. En effet, les follicules pileux sont plus nombreux dans la peau de souris et l'épiderme murin est typiquement composé de 3 couches de kératinocytes contre 6 à 10 pour la peau humaine [2]. Enfin, le fait de travailler sur l'animal peut conduire à des considérations éthiques motivant l'utilisation d'autres modèles.

6) Objectifs de l'étude

Ce travail visait à développer et caractériser un modèle de derme *in vitro* incluant des cellules de mélanome et d'évaluer la réponse des cellules tumorales à une molécule de thérapie ciblée, le vémurafénib.

Le travail s'est divisé en plusieurs étapes :

- Mise en culture et traitement de lignées cellulaires établies de mélanome métastatique en 2D.
- Développement et caractérisation d'équivalents de derme *in vitro*.
- Complexification du modèle de derme par l'ajout des lignées cellulaires de mélanome préalablement testées.
- Caractérisation et traitement de ces nouveaux modèles 3D.

L'objectif à moyen terme est de proposer un nouveau modèle qui pourrait servir au développement de la thérapie personnalisée et au développement de nouvelles thérapeutiques.

II) MATERIEL ET METHODES

1) Lignées cellulaires et réactifs utilisés

Deux lignées établies de mélanome métastatique avec une mutation BRAF V600E ont été utilisées. La lignée SK-MEL-3, décrite comme résistante au vémurafénib [32], originaire de l'American Type Culture Collection (ATCC), a été fournie par le Professeur Galmiche du laboratoire de biochimie du CHU d'Amiens. Elle a été cultivée dans du RPMI 1640 contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1 % de L-Glutamine et 1 % de streptomycine / pénicilline (l'ensemble provenant de chez Gibco®).

La lignée SK-MEL-28, décrite comme sensible au vémurafénib [32], a été obtenue auprès de l'ATCC. Elle a été cultivée dans du EMEM contenant 10 % de SVF, 1 % de L-Glutamine et 1 % de streptomycine / pénicilline (Gibco®).

Les cellules utilisées pour les modèles de dermes sont des fibroblastes humains (Human Dermal Fibroblasts, neonatal : HDFn) provenant de la société Life Technologie®. Elles ont été cultivées dans du DMEM (Gibco®), contenant 10 % de SVF (Hyclone®), 1 % de L-Glutamine (Gibco®), 1 % d'HEPES (Gibco®) et 1 % de streptomycine / pénicilline (Gibco®).

Toutes les cellules ont été cultivées à 37°C dans une étuve sous atmosphère humide enrichie de 5 % de CO₂.

Le vémurafénib (dissout dans du DMSO à la concentration de 10 mM et conservé à - 20°C) a été fourni par le Professeur Galmiche.

2) Evaluation de la viabilité cellulaire

a. Numération cellulaire et test au bleu trypan

Les lignées cellulaires de mélanome ont étéensemencées dans des plaques 24 puits Falcon®, à la densité de 1.10^4 cellules par puits, soit environ 5700 cellules par cm², dans 1 mL de milieu de culture. A 24 heures, le milieu de culture a été remplacé par 1 mL du même milieu de culture contenant différentes concentrations de vémurafénib (0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM). Deux puits contenant la même concentration en DMSO que les puits les plus concentrés en traitement ont servi de témoins.

Quarante-huit heures après l'ajout du vémurafénib, la viabilité cellulaire a été évaluée après numération des cellules en présence de bleu trypan (permettant le décompte des cellules mortes) et l'indice de prolifération a été calculé.

- Pourcentage de viabilité cellulaire : $(\text{Nombre de cellules vivantes} / \text{Nombre de cellules totales (vivantes + mortes)}) \times 100$.
- Indice de prolifération au temps t : $\text{Nombre de cellules vivantes au temps t} / \text{Nombre de cellulesensemencées}$.

Trois expériences indépendantes en duplicate ont été réalisées pour chacune des lignées.

b. Test au MTS

Afin d'estimer l'activité métabolique des cellules sous vémurafénib, elles ont étéensemencées et traitées comme précédemment. Après 48 heures de traitement, les cellules ont été mises en contact avec 200 μL de réactif à base de tétrazolium pendant 2 heures : test au MTS (CellTiter 96[®] AQueous One Solution, Promega[®]).

Le MTS est un test colorimétrique contenant un dérivé tétrazolium (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tétrazolium), qui est réduit en formazan par la succinate-déshydrogénase mitochondriale. La formation de formazan a été quantifiée en mesurant la densité optique à 490 nm, à l'aide d'un lecteur de plaque (BioRad 680). Cela permet d'estimer indirectement l'activité métabolique des cellules. Un puits contenant du milieu de culture sans cellule a permis de soustraire la densité optique du milieu. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité métabolique de base des cellules non traitées (fixée arbitrairement à 100 %).

Trois expériences indépendantes en duplicate ont été réalisées pour chacune des lignées.

3) Constitution d'un équivalent de derme

Les équivalents de derme ont été initialement réalisés dans des inserts de culture avec membrane en polycarbonate en boîtes de 6 puits (Nunc[®], Polycarbonate Membrane Inserts in Multidishes). Du fait de problèmes techniques, ces inserts ont été par la suite abandonnés au profit d'inserts avec membrane en PET (Polyéthylène téréphtalate) transparent Falcon[®] pour plaque 6 puits. Le protocole de Carlson *et al.* [33] a servi de référence pour la fabrication des équivalents de derme. Il consiste à déposer dans les inserts une préparation de collagène acellulaire qui se gélifie, puis de la recouvrir d'une préparation de collagène contenant des

fibroblastes, qui va à son tour se gélifier. Le collagène acellulaire permet de former une base d'ancrage limitant la contraction du collagène cellulaire liée à la différenciation transitoire des fibroblastes en myo-fibroblastes (Figure 5).

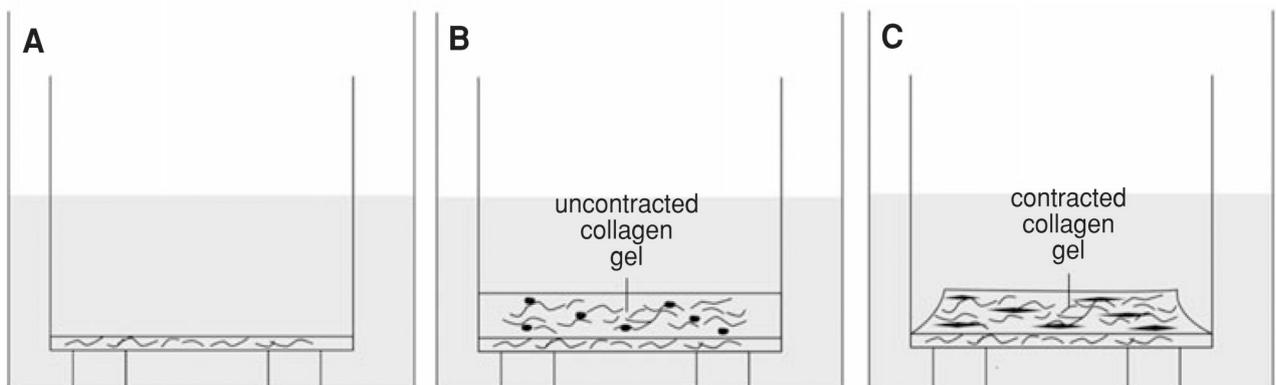


Figure 5 : Etapes pour l'obtention d'un équivalent de derme (Carlson *et al.* 2008 [33]). (A) Une fine couche de collagène acellulaire est appliquée dans les inserts. **(B)** Elle va fournir un ancrage pour le collagène cellulaire contenant les fibroblastes humains. **(C)** L'ensemble est immergé 7 jours dans du milieu de culture. Les fibroblastes vont remodeler le collagène, provoquant une contraction du gel qui est cependant limitée par la présence du collagène acellulaire.

Différentes concentrations de collagène (1 et 1,5 mg/mL) et de cellules (1.10^5 , 2.10^5 et 3.10^5 /mL) ont été testées afin d'obtenir des équivalents de derme histologiquement proches d'un derme humain (concentration cellulaire moyenne avec aplatissement des fibroblastes et horizontalisation des fibres de collagène). Le tableau 1 détaille le volume et la concentration finale des composés utilisés pour la fabrication des gels. Les composés ont été ajoutés dans l'ordre en maintenant l'ensemble à 0°C dans un bac rempli de glace pour éviter une gélification prématurée. Une fois le mélange réalisé, quelques gouttes de bicarbonate de sodium ont été ajoutées afin d'équilibrer le pH (avant l'ajout des cellules pour le gel cellulaire), le but étant d'obtenir une coloration rose-orangée (soit un pH d'environ 7,2-7,4). Un millilitre de préparation pour gel acellulaire a été déposé dans les inserts puis incubé à 37°C pendant 30 minutes, permettant la gélification. Trois millilitres de préparation pour gel cellulaire ont été ensuite ajoutés. Après 2 heures, 2 mL de milieu de culture ont été ajoutés dans les puits et 1,5 mL dans les inserts. Les dermes ont été cultivés pendant 7 jours.

Tableau 1 : Composés nécessaires pour la préparation des équivalents de derme.

	Gel acellulaire	Gel cellulaire
Eau stérile	3 mL	9 mL
10 X Minimum Essential Medium (Gibco®)	0,6 mL	1,8 mL
L-Glutamine (Gibco®)	54 µL	162,5 µL
Sérum de veau fœtal (Hyclone®)	0,68 mL	2,02 mL
Bicarbonate de sodium (Gibco®)	187 µL	0,56 mL
Collagène 3 mg/mL (Cell Systems®)	5 mL	15 mL
Fibroblastes 2.10^5 / mL	-	1,65 mL

Volumes calculés pour la préparation de 6 inserts.

4) Culture des cellules SK-MEL-28 sur les équivalents de derme

Les cellules SK-MEL-28 ont ensuite été ajoutées au modèle à la concentration de 1.10^5 cellules par puits. Deux protocoles différents ont été testés. Le premier consistait à ajouter les mélanocytes 24 heures (J1) après l'établissement des dermes, le second à 7 jours (J7). Les modèles ont été cultivés durant 7 jours en présence des mélanocytes.

5) Caractérisation histologique des modèles

Les dermes, contenant ou non des mélanocytes, ont été sectionnés en deux. La première partie a été conservée à 4°C dans du formalin à 4 % et la seconde à 4°C dans du sucrose 2 M.

Les échantillons fixés dans le formalin ont été déshydratés par immersion dans des bains d'alcool de concentration croissante (70 %, 95 %, 100 %) puis dans de l'Histo-Clear II®. Ils ont ensuite été inclus en paraffine. Des coupes (de 4 à 8 µm) ont été réalisées au microtome (Leica RM2245) et recueillies sur lame de verre. Une coloration à l'hématéine-éosine a été réalisée.

Les échantillons conservés dans le sucrose ont été utilisés pour les coupes au cryostat après inclusion à l'OCT (Optimal Cutting Temperature compound, Prolabo®).

6) Test EdU Click-iT

Afin d'évaluer la prolifération cellulaire au sein des équivalents de derme, nous avons utilisé le test Click-iT® EdU Imaging Kits (Molecular Probes®). L'EdU est un équivalent de la

thymine qui s'incorpore à l'ADN lors de la prolifération cellulaire. Le milieu de culture des dermes a été remplacé par un milieu frais contenant de l'EdU à 10 μ M. Après 5 heures, le milieu a été retiré et les dermes conservés dans du sucrose 2 M, avant la réalisation des coupes au cryostat. La détection de l'EdU est fondée sur une « click reaction », réaction covalente entre un alcyne (contenu dans l'EdU) et un azoture (contenu dans l'Alexa Fluor[®]) catalysée par le cuivre. L'incorporation de l'EdU (marquage vert) peut ainsi être mise en évidence au microscope en épifluorescence (Leica DMI 6000).

Un marquage des noyaux au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), à la concentration de 5 μ g/mL, a été réalisé en parallèle.

7) Test TUNEL Click-iT

Le test Click-iT[®] Plus TUNEL Assay (Molecular Probes[®]) a été utilisé pour détecter les cellules en apoptose au sein des modèles de derme sur coupe en paraffine. Ce test permet de détecter l'ADN fragmenté des cellules en apoptose par une « click reaction ». Une fois déparaffinées, les coupes ont été fixées au paraformaldéhyde à 4 %, perméabilisées à la protéinase K et marquées selon le protocole fourni avec le test. Afin de contrôler l'efficacité du test, un traitement par une DNase de type I (Promega[®]), permettant de fragmenter l'ADN, a été réalisé en parallèle sur des lames contrôles.

Un marquage des noyaux au DAPI a également été réalisé en parallèle.

8) Evaluation de l'effet du vémurafénib sur le modèle « derme + mélanocytes »

L'effet du vémurafénib sur le modèle « derme + mélanocytes » a été évalué en utilisant plusieurs méthodes : le marquage EdU pour évaluer la prolifération cellulaire, le marquage TUNEL pour évaluer l'apoptose et la numération cellulaire. Les modèles ont été comparés à des modèles non traités.

Le protocole de traitement était similaire pour chacune des méthodes utilisées. Les mélanocytes ont été ajoutés après 7 jours de culture des dermes. Vingt-quatre heures après l'ajout des mélanocytes, les milieux de culture ont été remplacés par du milieu de culture contenant du vémurafénib à la concentration de 10 μ M. Pour les modèles non-traités, le vémurafénib a été remplacé par du DMSO à la même concentration. L'évaluation de l'effet du traitement a été réalisée 48 heures après l'ajout du traitement.

Pour les marquages EdU et TUNEL, les protocoles étaient les mêmes que précédemment. Pour le marquage EdU, des photos réalisées aléatoirement au microscope à épifluorescence ont permis d'évaluer le taux de cellules ayant proliférées.

Pour la numération cellulaire, la matrice extracellulaire a été dégradée en utilisant une collagénase de type I (Gibco®). Les milieux de culture ont été retirés et remplacés par 3 mL de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) contenant 200 U/mL de collagénase. Après 6 heures d'action de la collagénase, les dermes étaient totalement dégradés. Les cellules ont alors été récoltées et la viabilité cellulaire a été évaluée par numération cellulaire avec coloration au bleu trypan.

Une évaluation de l'effet du vémurafénib sur la lignée HDFn par numération cellulaire après culture en 2D a été réalisée en parallèle selon le même protocole que pour les lignées de mélanome.

9) Tests statistiques

Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé comme test statistique pour la comparaison des données avec un p fixé à 0,05 pour la numération cellulaire et pour le test au MTS en 2D.

III) RESULTATS

1) Tests 2D des lignées cellulaires établies de mélanome métastatique

a. Prolifération et viabilité cellulaire des cellules SK-MEL-3 et SK-MEL-28 cultivées en 2D et traitées par vémurafénib

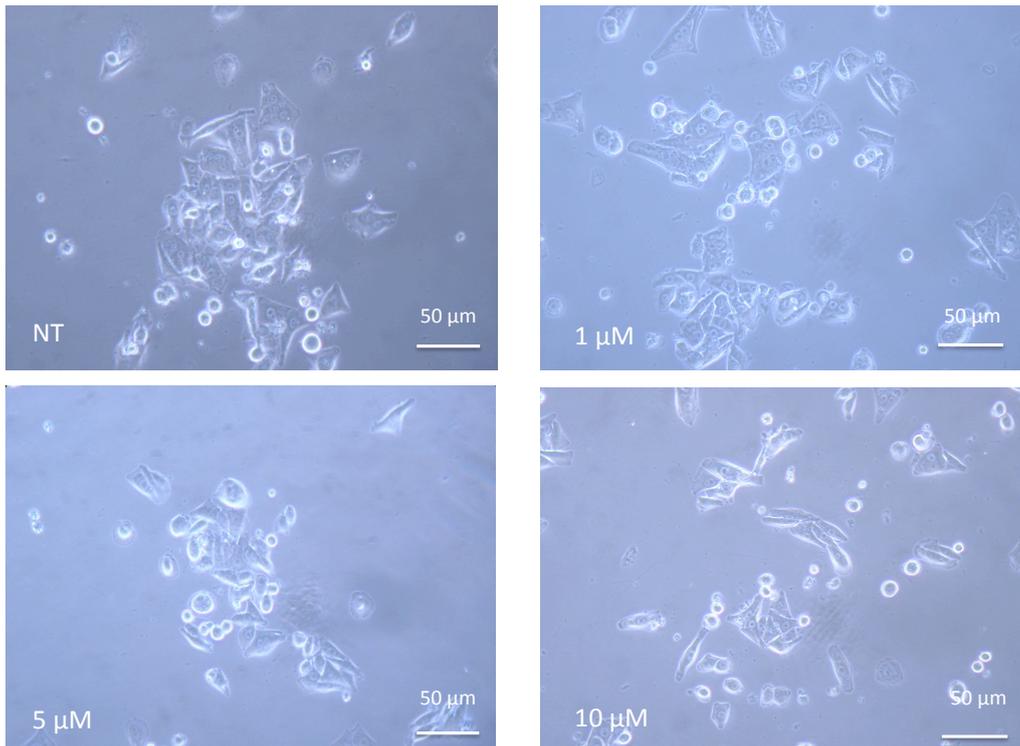
La figure 6 montre l'aspect en microscopie des deux lignées cellulaires après 48 heures de traitement par différentes concentrations de vémurafénib (1 μ M, 5 μ M et 10 μ M) et en l'absence de traitement (NT). En culture 2D, les cellules sont adhérentes et s'étalent en prenant une morphologie « étoilée » avec des pseudopodes. Les cellules SK-MEL-28 se sont plus étalées que les cellules SK-MEL-3. Le traitement a semblé diminuer leur étalement. Lorsque les cellules étaient traitées par vémurafénib, une diminution de la densité cellulaire était constatée en microscopie optique. Cette diminution était moins évidente pour les cellules SK-MEL-3.

La diminution du nombre de cellules a été confirmée par la numération cellulaire. La figure 7 représente l'indice de prolifération à 48 heures de traitement des deux lignées cellulaires en fonction de la concentration en vémurafénib. On constate, en comparaison avec l'absence de traitement, une diminution légère et non significative de l'indice de prolifération des cellules SK-MEL-3 au fur et à mesure de l'augmentation des concentrations en vémurafénib. Pour les cellules SK-MEL-28, on remarque une diminution franche du nombre de cellules après 48 heures de traitement, et ce même en présence de faibles concentrations de vémurafénib. Cette différence s'accroît progressivement jusqu'à atteindre un plateau. Elle est statistiquement significative pour les concentrations de vémurafénib à 5 et 10 μ M.

La différence observée entre les 2 lignées cellulaires peut s'expliquer par un indice de prolifération plus élevé de la lignée SK-MEL-28 (indice de prolifération à 72 heures de plus de 3,5, contre moins de 2 pour la lignée SK-MEL-3).

La figure 8 représente la viabilité cellulaire après 48 heures de traitement. Celle-ci est d'environ 95 % pour la lignée SK-MEL-28, quelle que soit la concentration en vémurafénib. Le traitement a donc un effet essentiellement cytostatique. Pour les cellules SK-MEL-3, la viabilité diminue de façon modérée avec l'augmentation de la concentration en traitement, suggérant un effet cytotoxique modéré.

SK-MEL-3 :



SK-MEL-28 :

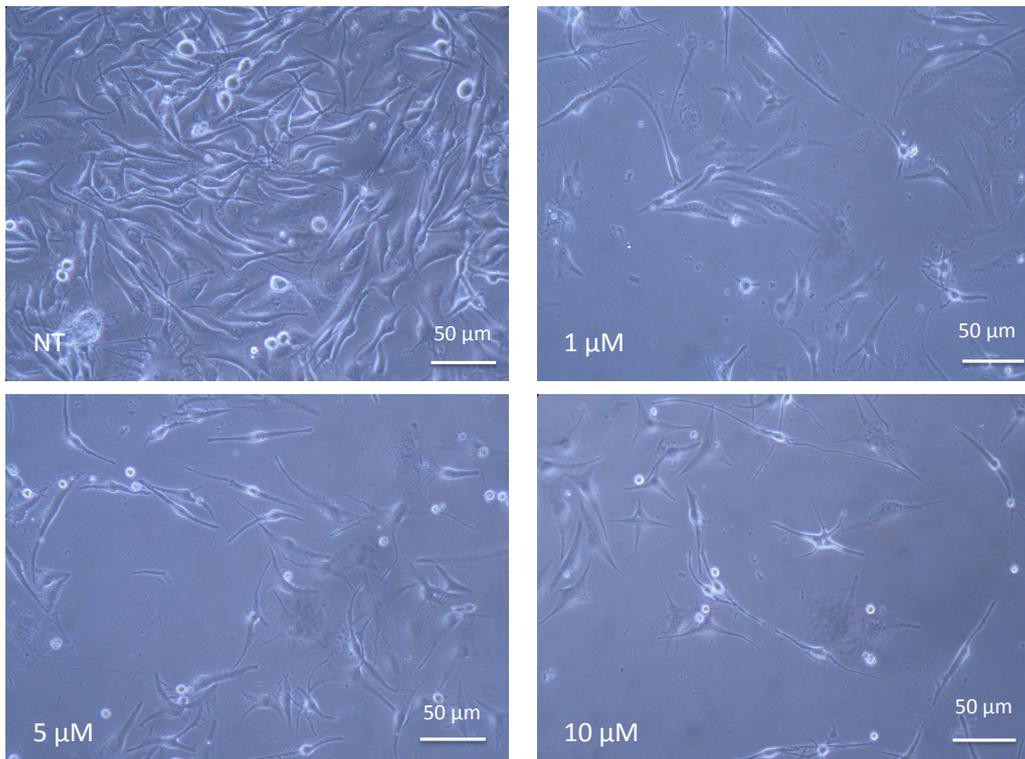


Figure 6 : Aspect en microscopie optique des cellules SK-MEL-3 et SK-MEL-28 après 48 heures de traitement par différentes concentrations de vémurafénib.
NT = pas de traitement. Grossissement X 200.

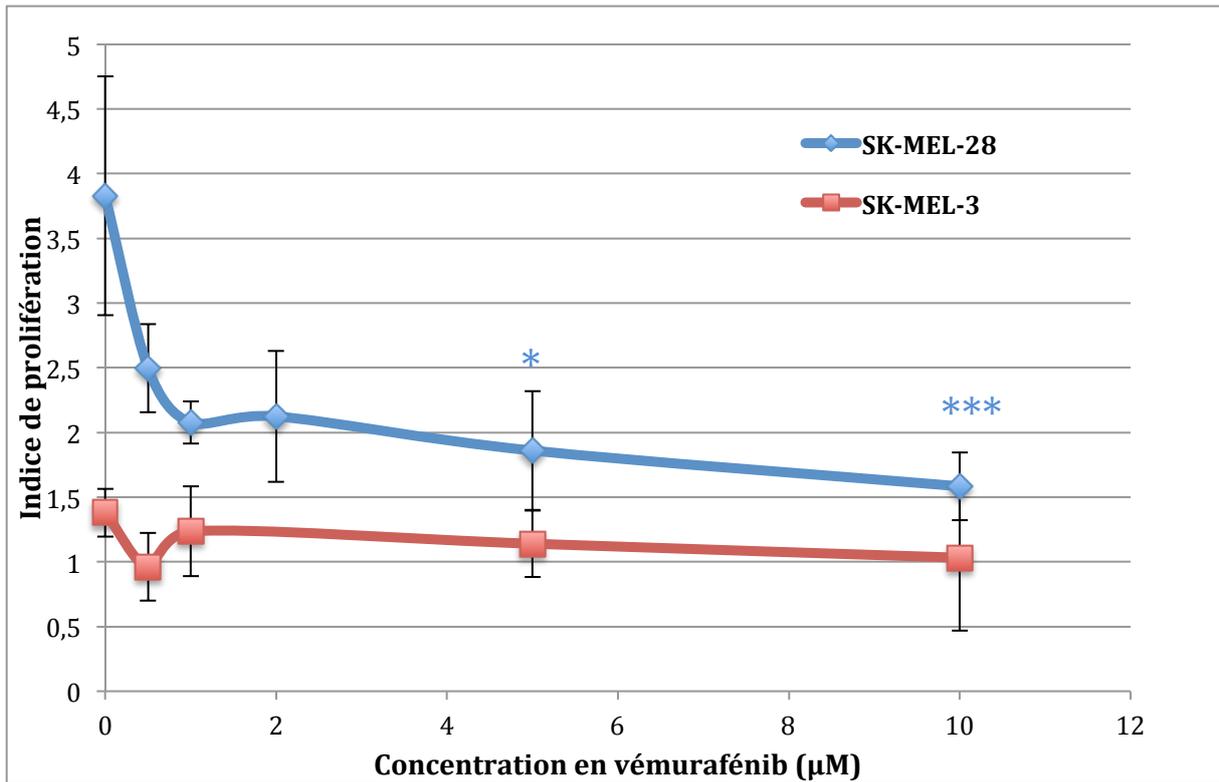


Figure 7 : Indice de prolifération des cellules SK-MEL-3 et SK-MEL-28 après 48 heures de traitement en fonction de la concentration en vémurafénib.

* = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$ versus cellules non traitées.

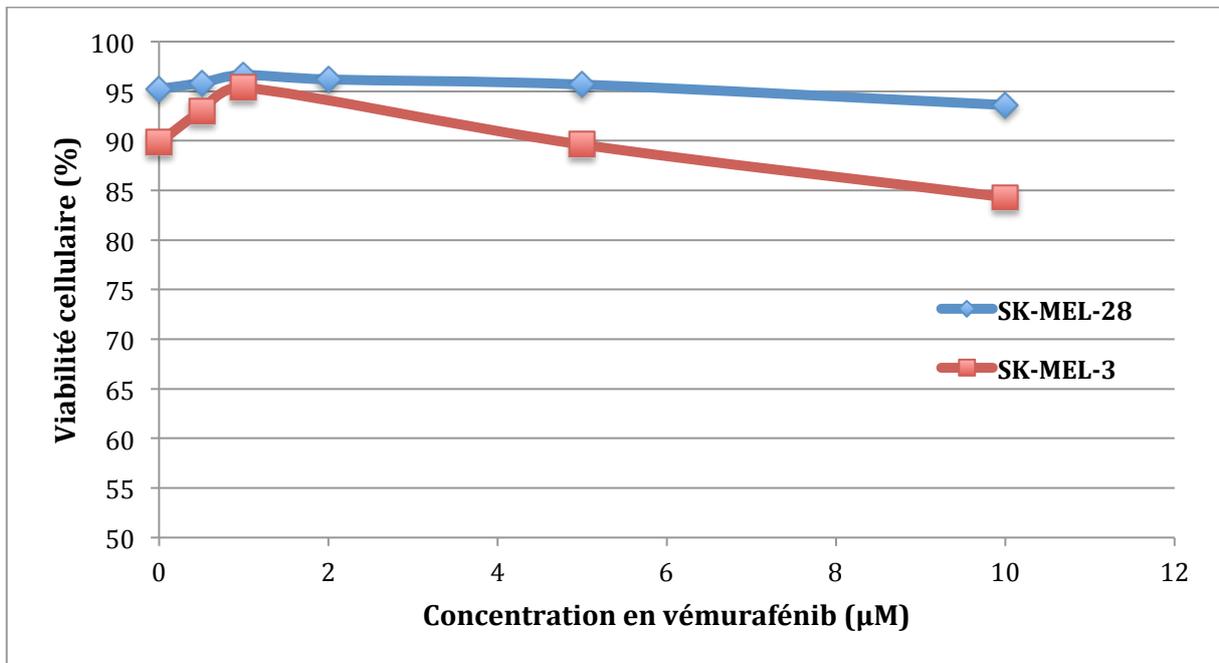


Figure 8 : Pourcentage de viabilité cellulaire des cellules SK-MEL-3 et SK-MEL-28 après 48 heures de traitement en fonction de la concentration en vémurafénib.

b. Activité métabolique sous vémurafénib (test au MTS)

La figure 9 représente l'activité métabolique des 2 lignées cellulaires après 48 heures de traitement par vémurafénib. Dès 0,5 μM de vémurafénib, l'activité métabolique est diminuée d'environ 50 % pour les deux lignées cellulaires. L'activité métabolique continue ensuite de diminuer progressivement avec l'accroissement de la concentration en vémurafénib jusqu'à atteindre un plateau (20 % pour les cellules SK-MEL-28 et 40 % pour les SK-MEL-3). La différence observée était significative à partir de 1 μM pour la lignée SK-MEL-3 et 2 μM pour la lignée SK-MEL-28.

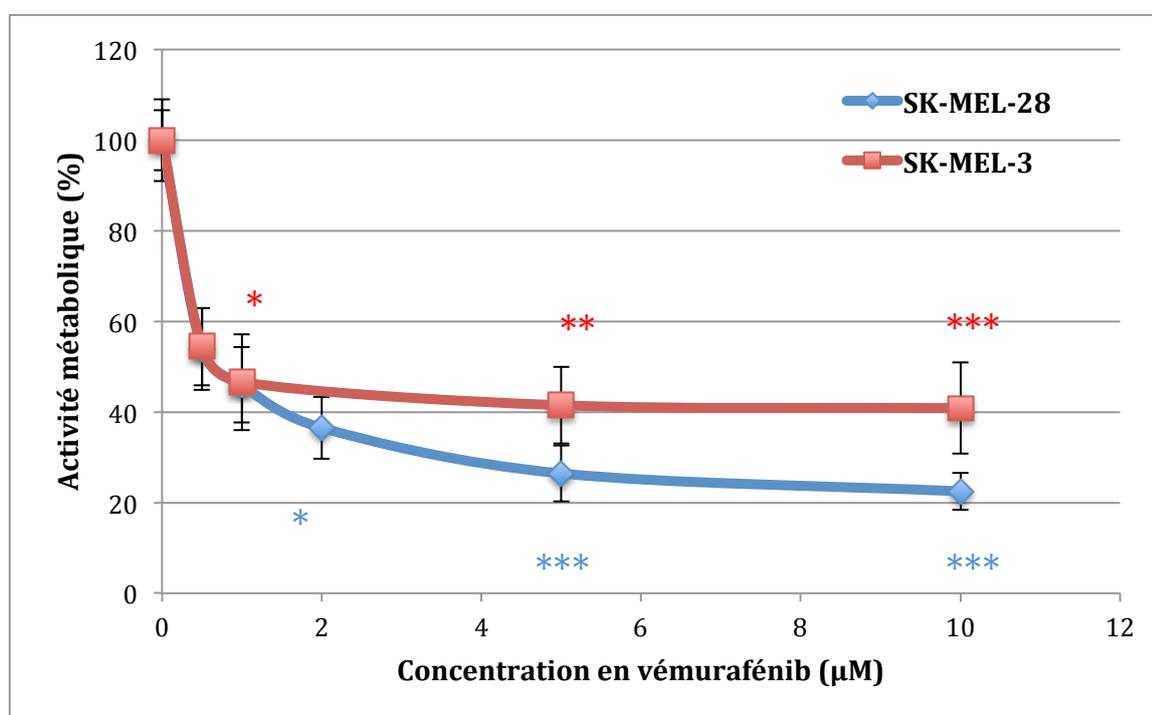


Figure 9 : Activité métabolique des cellules SK-MEL-3 et SK-MEL-28 après 48 heures de traitement en fonction de la concentration en vémurafénib, en pourcentage de l'activité métabolique en l'absence de traitement.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ versus cellules non traitées.

c. Synthèse des résultats 2D

Le vémurafénib est actif sur les deux lignées cellulaires. Il entraîne une diminution significative de leur activité métabolique qui se traduit par un effet cytostatique (plus marqué pour les cellules SK-MEL-28). Un effet cytotoxique modéré est observé sur la lignée SK-MEL-3.

2) Développement et caractérisation du modèle 3D

a. Développement du modèle de derme

La première étape a consisté à réaliser des modèles de derme, le but étant d'obtenir un aspect histologique proche d'un derme humain. Pour cela, différentes concentrations de collagène (1 et 1,5 mg/mL) et de cellules ($1 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^5$ et $3 \cdot 10^5$ /mL) ont été testées. A J7, la plupart des dermes étaient rétractés et donc peu exploitables.

Deux hypothèses pouvant expliquer ce phénomène ont été envisagées :

- L'absence de fusion des gels acellulaire et cellulaire.
- Un problème en rapport avec les inserts utilisés.

La suppression du gel acellulaire n'a pas permis d'améliorer les résultats. Le changement des inserts Nunc[®] par des inserts à membrane en PET transparent Falcon[®] a permis de résoudre le problème (Figure 10).

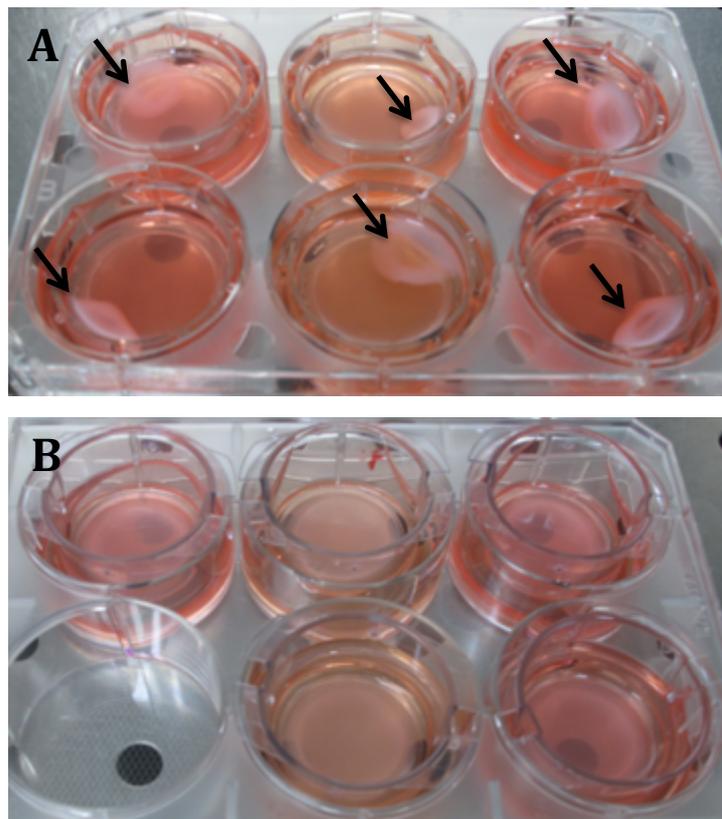


Figure 10 : Aspect macroscopique des dermes à J7.

A : Inserts avec membrane en polycarbonate de type Nunc[®]. **B :** Inserts avec membrane en PET de type Falcon[®]. **Flèches :** Rétractation des modèles.

Malgré les problèmes techniques rencontrés, une analyse histologique des dermes obtenus avec les premiers inserts a pu être réalisée. Les concentrations en collagène à 1 mg/mL et cellulaire à $2 \cdot 10^5$ cellules/mL ont permis d'obtenir un rapport cellules / matrice extra cellulaire adéquat, avec un aplatissement des fibroblastes et une horizontalisation des fibres de collagènes (Figure 11).

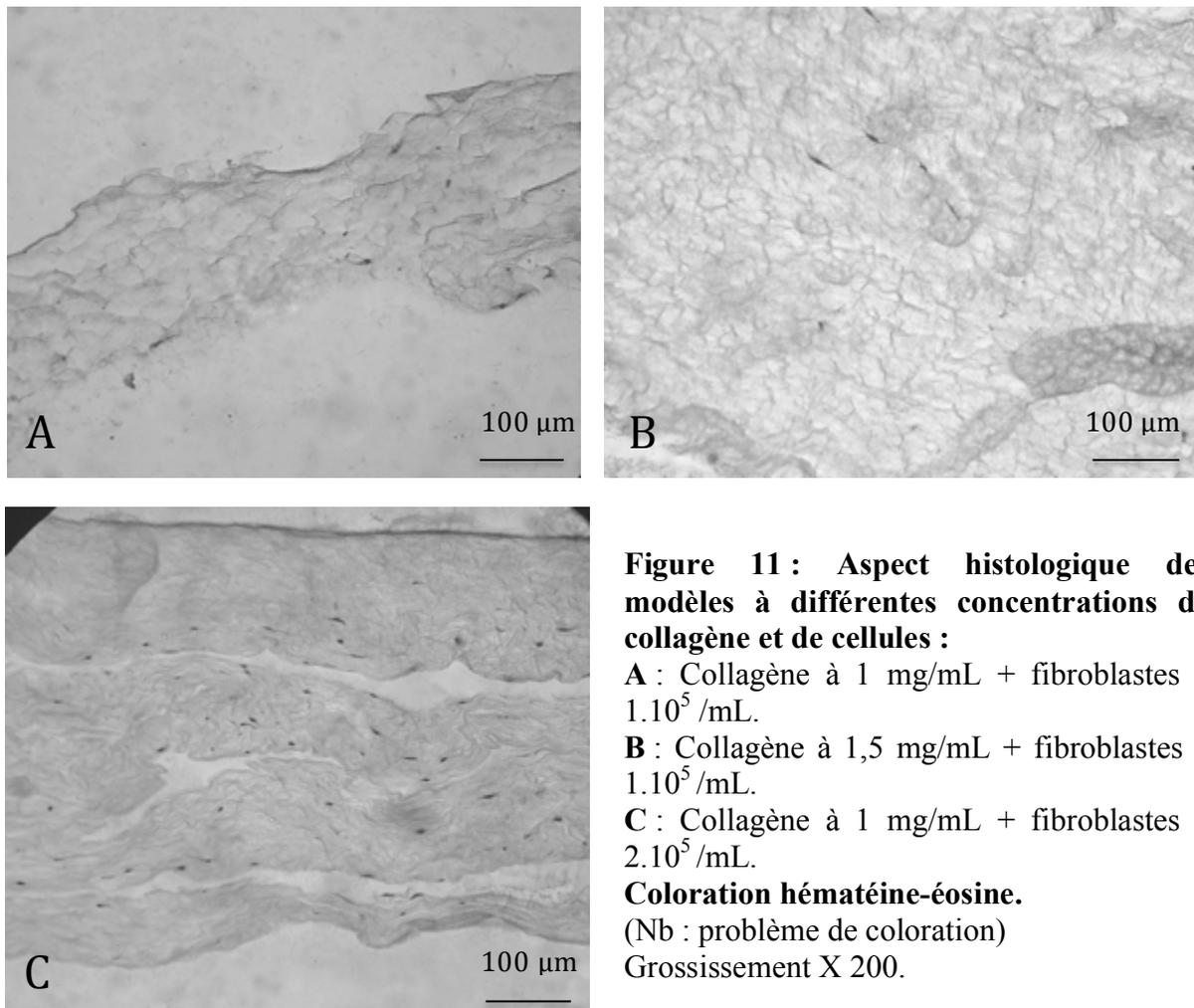


Figure 11 : Aspect histologique des modèles à différentes concentrations de collagène et de cellules :

A : Collagène à 1 mg/mL + fibroblastes à $1 \cdot 10^5$ /mL.

B : Collagène à 1,5 mg/mL + fibroblastes à $1 \cdot 10^5$ /mL.

C : Collagène à 1 mg/mL + fibroblastes à $2 \cdot 10^5$ /mL.

Coloration hématoxyline-éosine.

(Nb : problème de coloration)

Grossissement X 200.

b. Caractérisation du modèle « derme + mélanocytes »

i. Coloration hématoxyline-éosine

L'utilisation des nouveaux inserts nous a permis d'obtenir un modèle de derme exploitable. En premier lieu, une analyse histologique avec coloration à l'hématoxyline-éosine a été réalisée. La concentration cellulaire semblait adéquate et nous avons obtenu une horizontalisation des fibres de collagène (Figure 12).

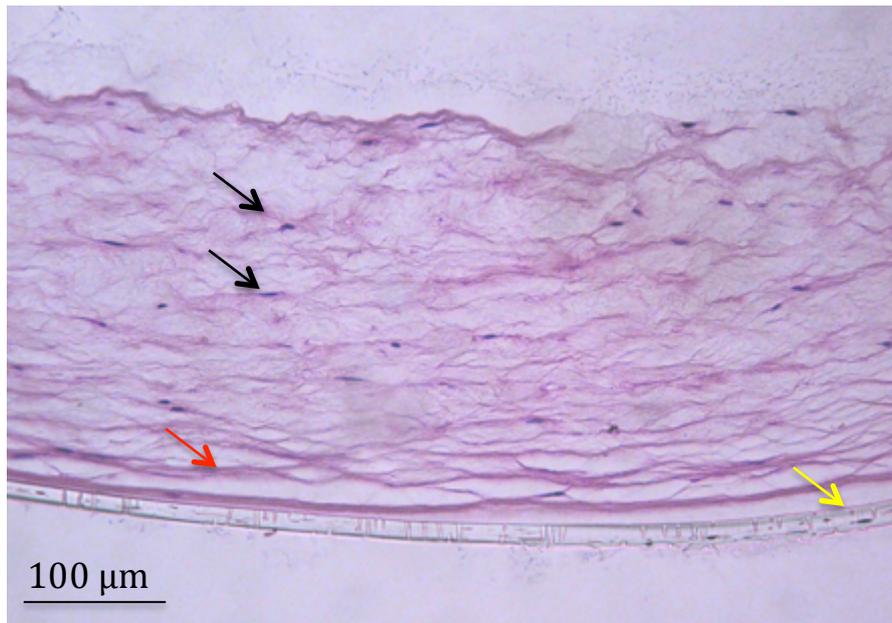


Figure 12 : Image histologique du modèle de derme à J7. Coloration hématoxyne-éosine. Flèches noires : Fibroblastes. Flèche rouge : Fibres de collagène. Flèche jaune : Membrane en PET. Grossissement X 200.

Après ajout des mélanocytes, nous avons observé un aspect histologique similaire avec des mélanocytes présents en surface (Figure 13). Contrairement à nos attentes, nous n'avons observé que très peu d'infiltration des mélanocytes au sein du modèle. Nous n'avons pas observé de différence histologique entre les modèles, que les mélanocytes soient déposés à J1 ou à J7.



Figure 13 : Image histologique du modèle après ajout des mélanocytes à J7 + 7 jours de culture. Coloration hématoxyne-éosine. Flèche blanche : Mélanocytes. Grossissement X 200.

Un amincissement progressif du modèle en son centre a été observé que ce soit en présence ou non des mélanocytes (Figure 14).

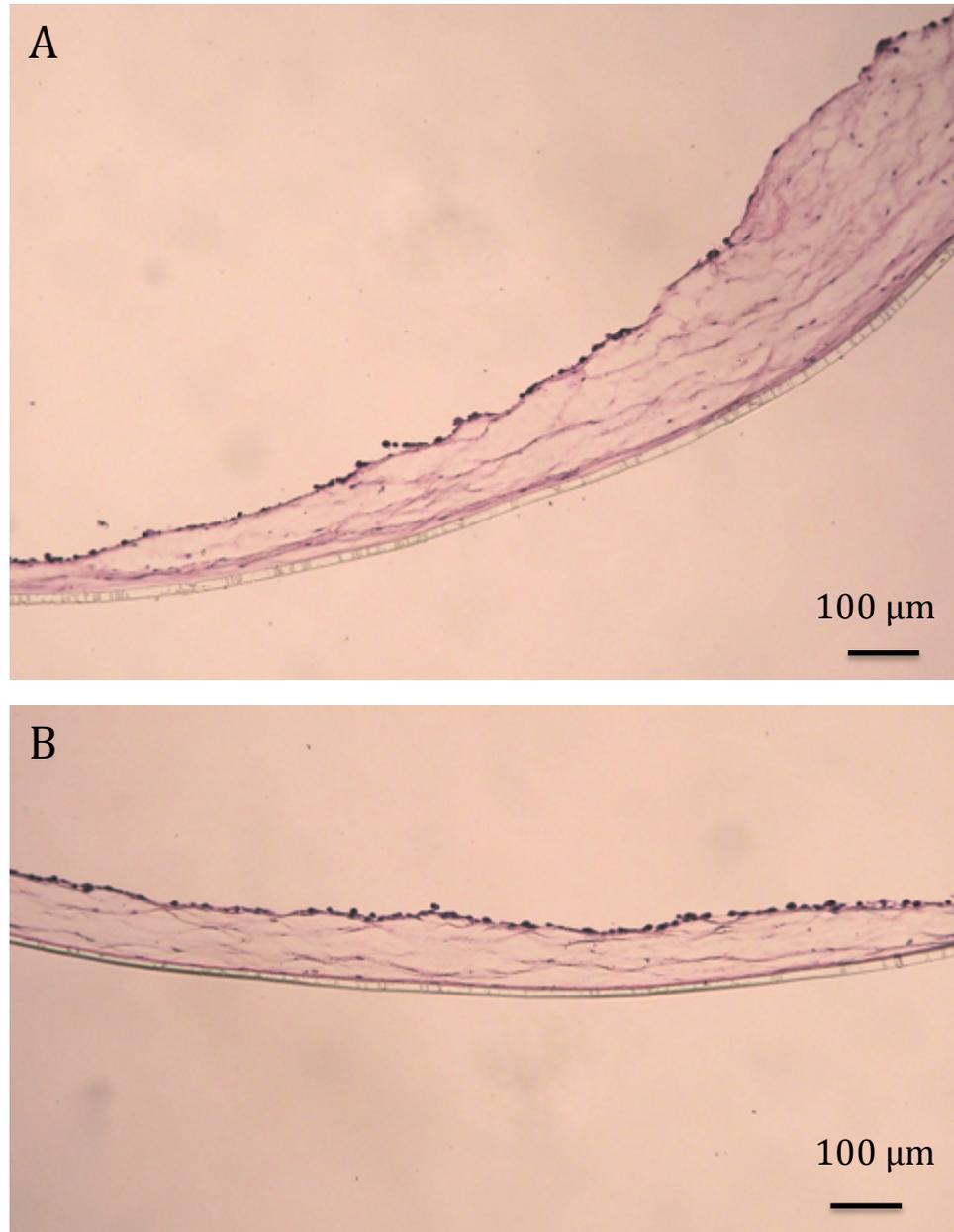


Figure 14 : Image histologique du modèle. Coloration hématoxyline-éosine.
A : Amincissement progressif vers le centre de l'insert. **B :** Aspect histologique au centre du modèle. Grossissement X 100.

ii. Evaluation de la prolifération cellulaire

Le test EdU permet de mettre en évidence la prolifération cellulaire. Lors de l'application de ce test au modèle de derme sans mélanocytes, nous n'avons observé que très peu de prolifération cellulaire. Ce comportement était attendu. En effet, dans ce type de modèle, les fibroblastes prolifèrent jusqu'à atteindre une certaine concentration, puis arrêtent leur prolifération et s'aplatissent.

Lorsque les mélanocytes ont été ajoutés, nous avons observé une prolifération de ces derniers à la surface du modèle (Figure 15).

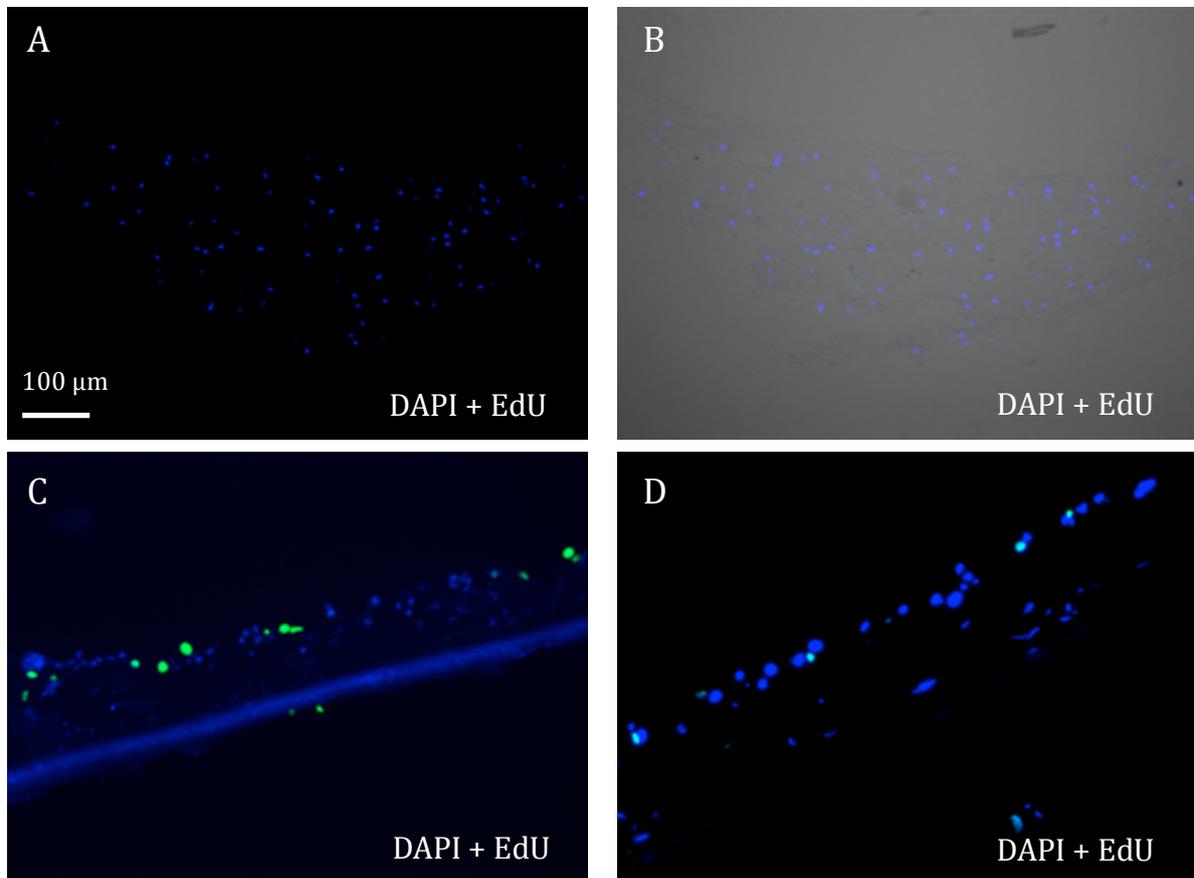


Figure 15 : Evaluation de la prolifération cellulaire (Test EdU).

Bleu : Coloration des noyaux au DAPI. **Vert :** Coloration par l'EdU des noyaux des cellules ayant proliféré.

A : Modèle sans mélanocyte. **B :** Image A avec contraste de phase. **C :** Modèle de derme + mélanocytes déposés à J1. **D :** Modèle de derme + mélanocytes déposés à J7. Grossissement X 200.

iii. Evaluation de l'apoptose

Le test TUNEL permet de mettre en évidence les cellules en apoptose. L'application de ce test au modèle a montré l'absence quasi totale d'apoptose, reflet de sa viabilité (Figure 16).

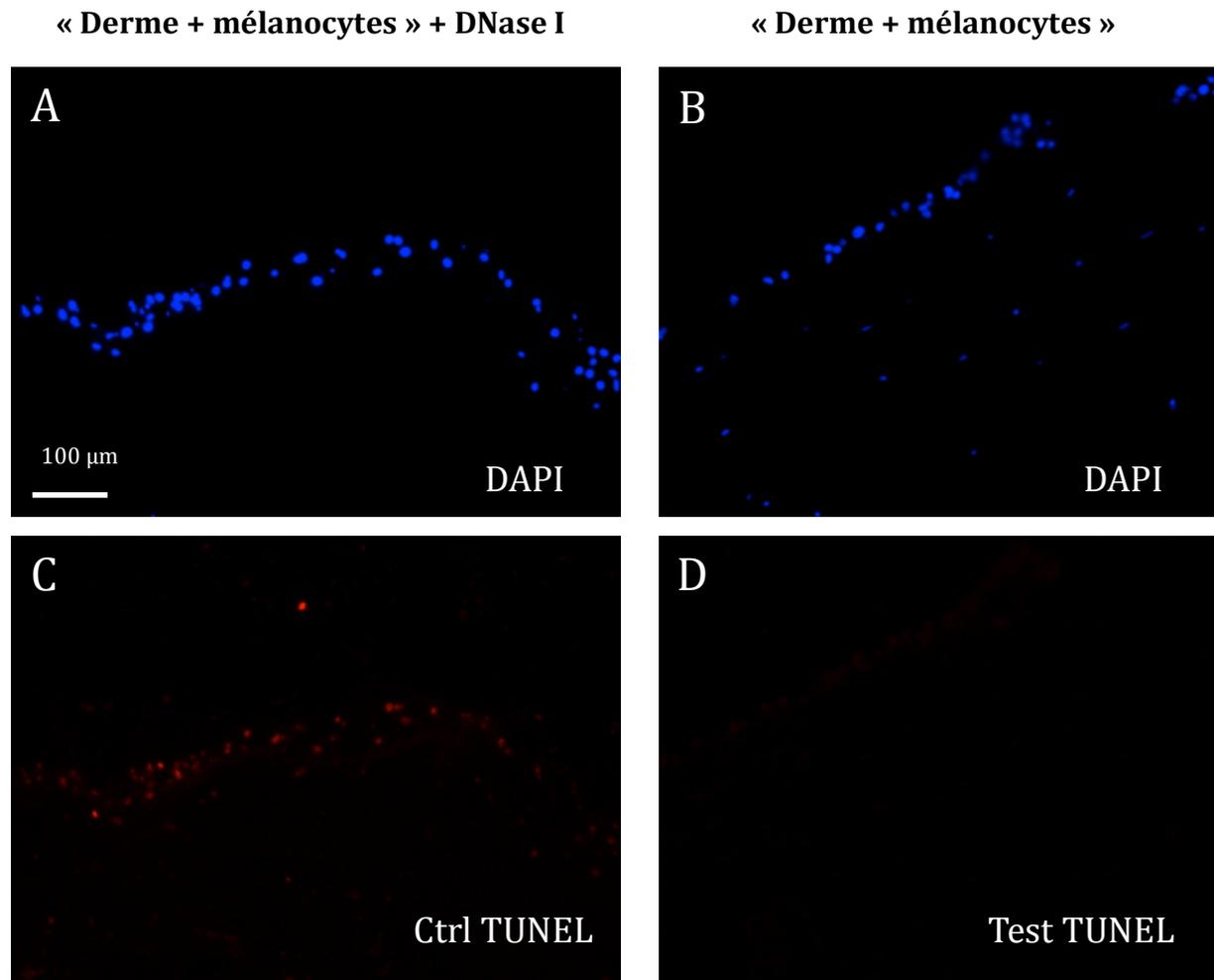


Figure 16 : Evaluation de l'apoptose au sein des modèles « dermes + mélanocytes » (Test TUNEL).

Bleu : Marquage des noyaux au DAPI. **Rouge :** Marquage TUNEL.

A : Marquage au DAPI du contrôle. **B :** Marquage au DAPI du test. **C :** Contrôle positif du marquage TUNEL après traitement par une DNase de type I. **D :** Marquage TUNEL du modèle « derme + mélanocytes ».

3) Traitement des modèles 3D par le vémurafénib

a. Evaluation de la prolifération

Le marquage EdU a montré une diminution de la prolifération cellulaire au sein des modèles traités par vémurafénib (Figure 17). Le taux de cellules ayant proliféré pendant la durée de contact avec l'EdU était de 4 % en présence de traitement et de 9 % en l'absence de traitement (Tableau 2).

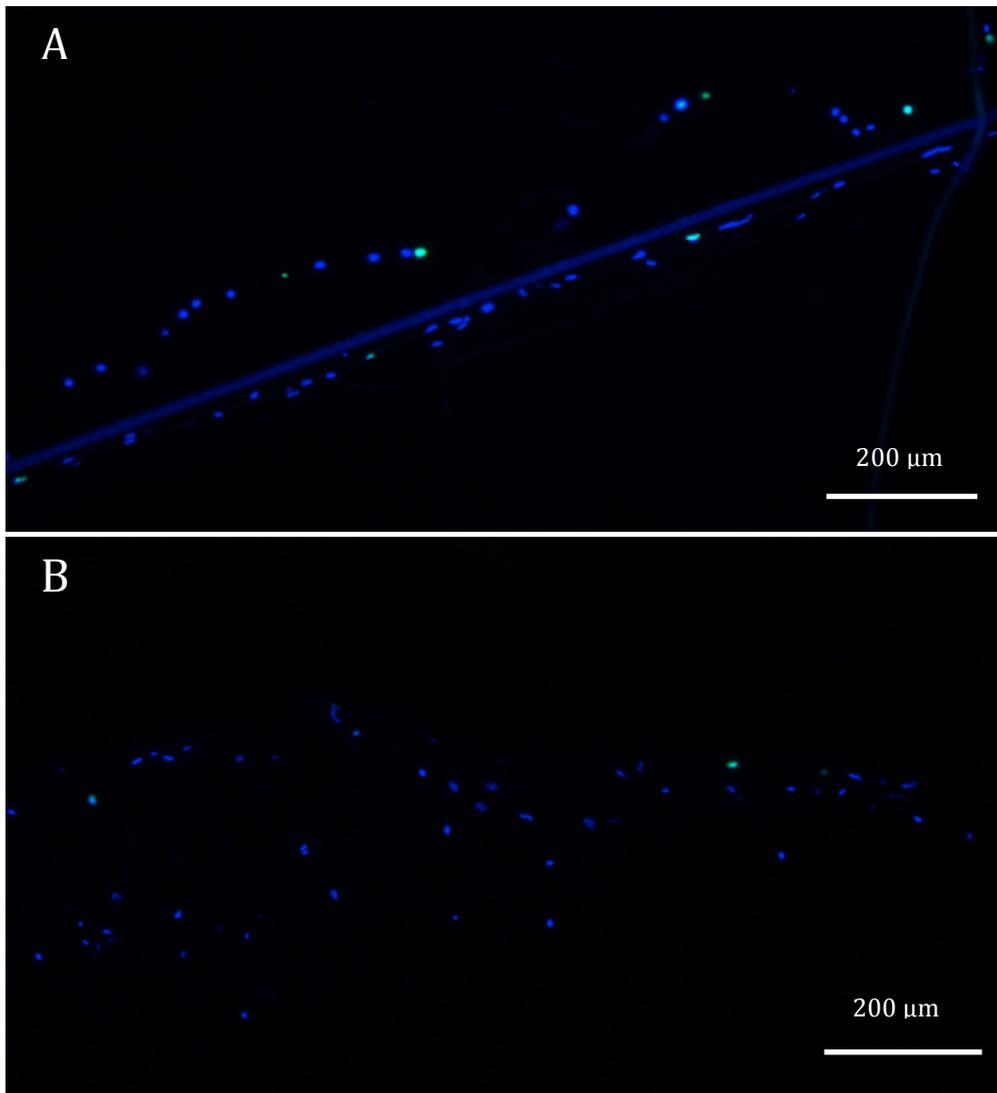


Figure 17 : Evaluation de la prolifération cellulaire au sein des modèles traités par vémurafénib.

Bleu : marquage des noyaux au DAPI ; **Vert** : marquage EdU.

A : Modèle sans traitement ; **B** : Modèle avec traitement (10 µM de vémurafénib).

Tableau 2 : Prolifération cellulaire au sein des modèles traités et non traités.

	Sans traitement	Avec traitement
Nombre de cellules comptées	733	991
Nombre de cellules ayant proliféré	66	42
Taux de cellules ayant proliféré	9 %	4 %

b. Numération cellulaire après traitement par collagénase

Après dégradation de la matrice extracellulaire des modèles par une collagénase de type I et comptage des cellules, nous avons retrouvé moins de cellules dans les modèles traités que dans les modèles non traités (Figure 19). Il était morphologiquement impossible de différencier mélanocytes et fibroblastes. Pour déterminer si la différence observée est statistiquement significative, il sera nécessaire de renouveler plusieurs fois l'expérience dans les mêmes conditions. Concernant la viabilité cellulaire, elle a été de 97 % pour les cellules des inserts non traités et de 95 % pour les cellules des inserts traités.

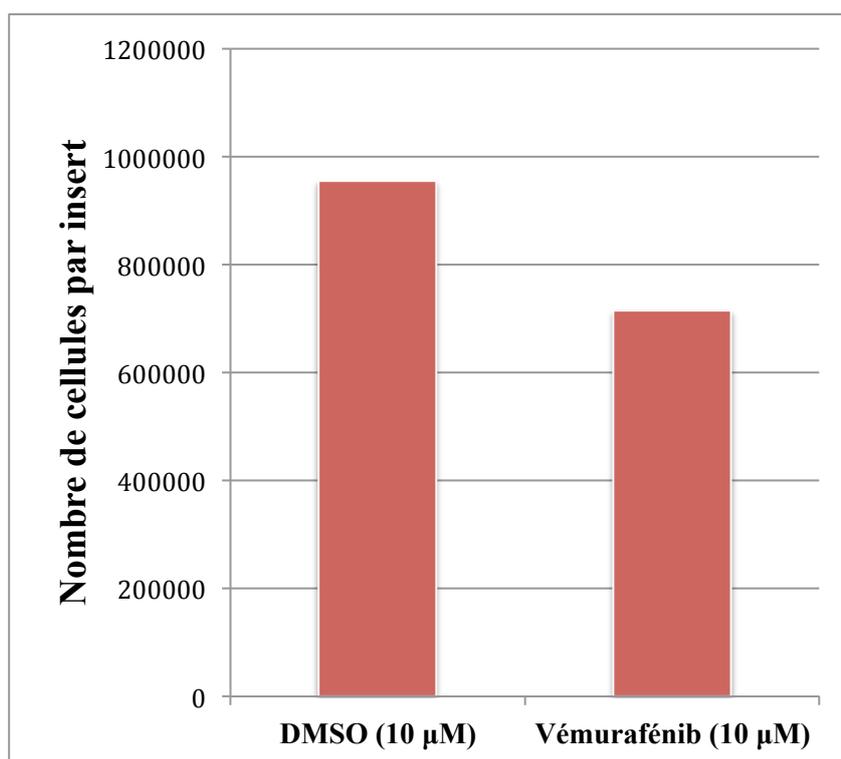


Figure 18 : Comparaison du nombre total de cellules (fibroblastes + mélanocytes) au sein des modèles 3D après 48 heures de traitement par le DMSO et le vémurafénib.
Colonne 1 : Inserts non traités ; Colonne 2 : Inserts traités par vémurafénib.

c. Evaluation de l'apoptose

Le marquage TUNEL des modèles traités et non traités par vémurafénib a montré la présence de rares cellules en apoptose au sein des modèles. Le nombre de cellules en apoptose semblait légèrement plus important au sein des modèles traités par vémurafénib (Figure 19). La présence de nombreux artéfacts n'a pas permis une comparaison objective du nombre de cellules en apoptose entre modèles traités et non traités.

4) Synthèse des résultats 3D

Ces différents tests nous ont permis de développer et caractériser un modèle tumoral qui semble exploitable. En effet, l'équivalent de derme est proche d'un derme humain et atteint un état de stabilité avec arrêt de la prolifération cellulaire. Les mélanocytes tumoraux déposés sur le modèle prolifèrent et on observe très peu d'apoptose. En revanche, les mélanocytes n'envahissent que peu le derme, ce qui limite les interactions mélanocytes/fibroblastes et mélanocytes/MEC. L'inhibition de la prolifération des cellules SK-MEL-28 par le vémurafénib, initialement constatée lorsque les cellules sont cultivées en 2D, semble également observée sur les modèles tumoraux en 3D.

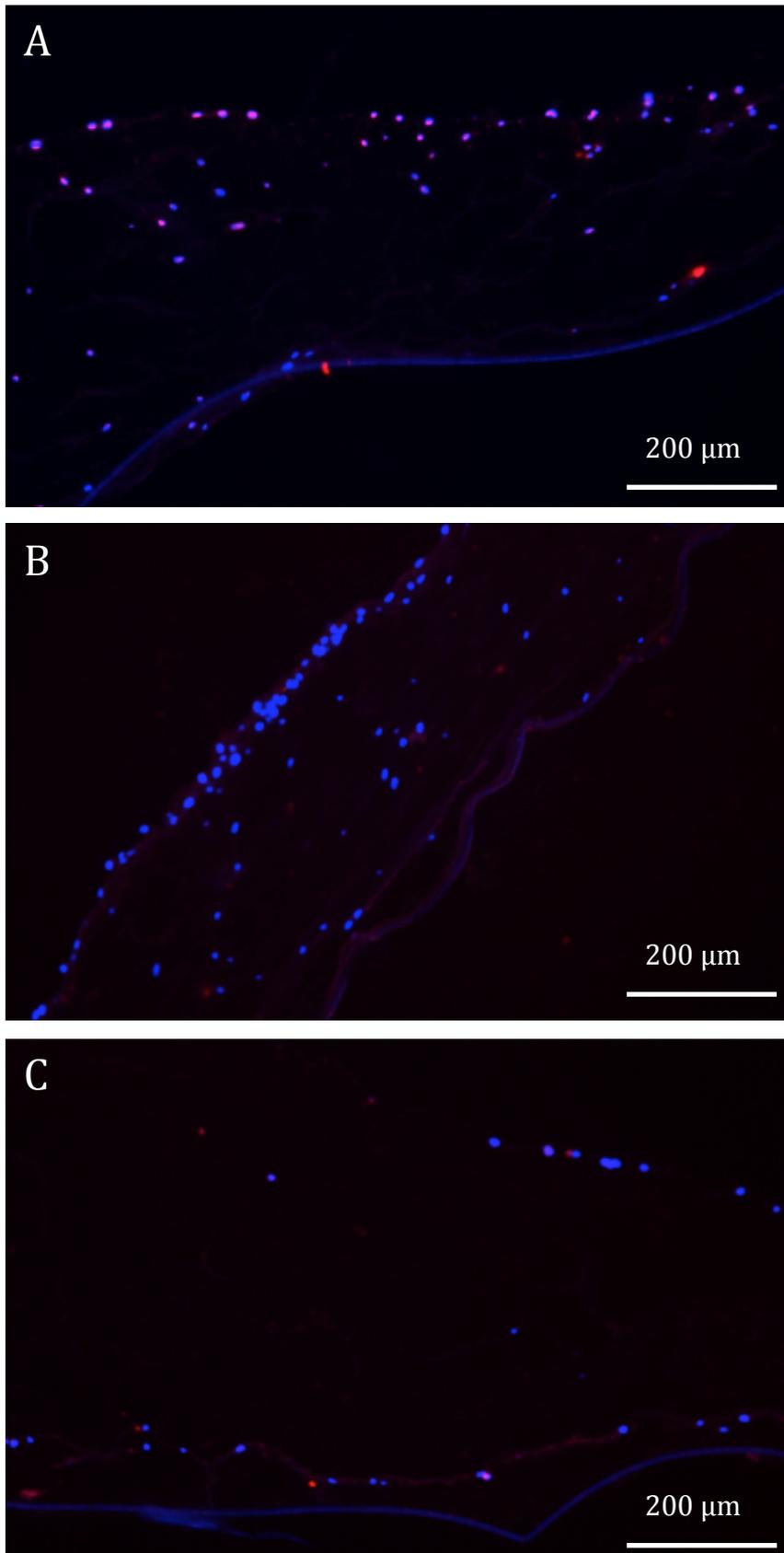


Figure 19 : Evaluation de l'apoptose au sein des modèles traités par vémurafénib.
Bleu : Marquage des noyaux au DAPI. **Rouge** : Marquage TUNEL.
A : Témoin positif (modèle + DNase) ; **B** : Modèle sans traitement ; **C** : Modèle avec traitement.

5) Effet du vémurafénib sur la lignée HDFn

En parallèle des tests 3D, nous avons évalué l'effet du vémurafénib sur la lignée HDFn cultivée en 2D en suivant le même protocole que pour les lignées de mélanomes. La figure 20 représente l'indice de prolifération à 48 heures de traitement des cellules HDFn en fonction de la concentration en vémurafénib. On observe une légère augmentation de l'indice de prolifération pour les concentrations 0,5, 1 et 2 μM puis une diminution à partir de 5 μM qui devient significative à 10 μM en comparaison aux concentrations 1 et 2 μM .

La viabilité cellulaire était de 98 % quelle que soit la concentration en vémurafénib. L'effet observé est donc cytostatique.

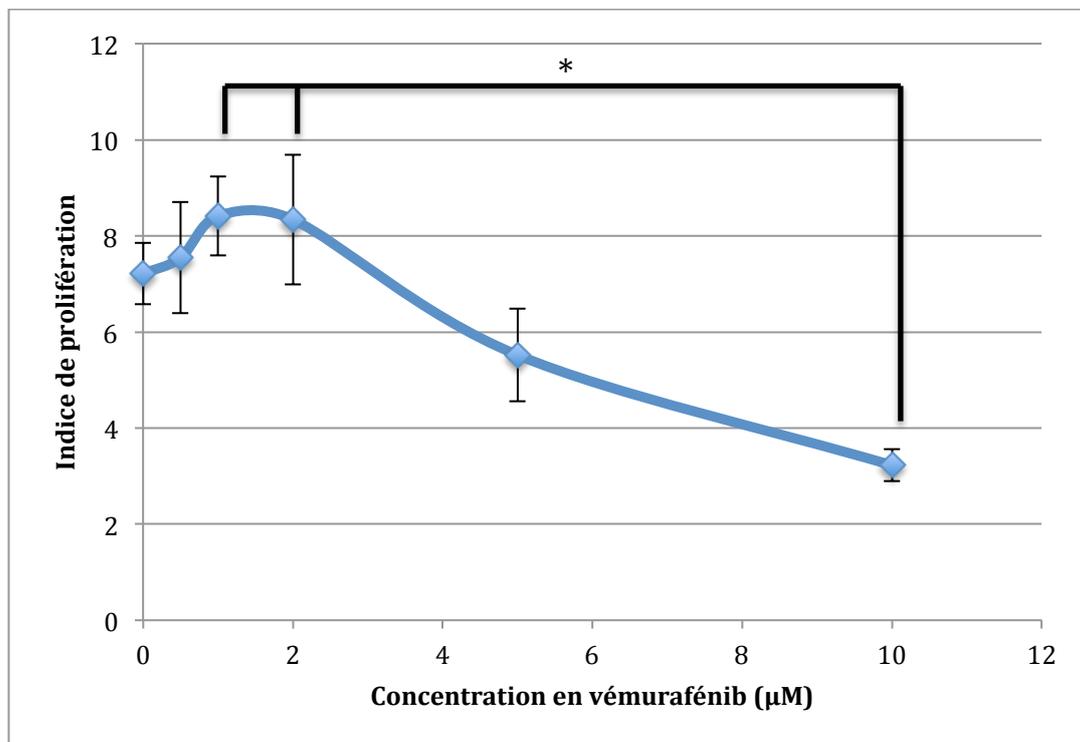


Figure 20 : Indice de prolifération des cellules HDFn après 48 heures de traitement en fonction de la concentration en vémurafénib.

* = $p < 0,05$.

IV) DISCUSSION

Le vémurafénib diminue l'activité métabolique et la prolifération des deux lignées cellulaires de mélanomes (SK-MEL-3 et SK-MEL-28) cultivées en 2D. Les cellules SK-MEL-28, plus sensibles, ont été cultivées sur un équivalent de derme (fibroblastes humains et collagène), histologiquement proche d'un derme humain. Nous avons montré que ce modèle tumoral 3D était viable. Le traitement de ce modèle par le vémurafénib a provoqué une diminution de la prolifération et du nombre de cellules.

1) Effet du vémurafénib sur les lignées SK-MEL-3 et SK-MEL-28 en 2D

Le traitement de la lignée SK-MEL-3 par vémurafénib diminue l'indice de prolifération de ces cellules mais la différence observée entre cellules traitées et non traitées n'est pas significative. Si on se limite à ces résultats, on pourrait considérer cette lignée comme résistante au traitement. Cependant, le test au MTS montre une diminution significative de l'activité métabolique en présence de vémurafénib. Cette discordance s'explique probablement par le faible indice de prolifération de base de ces cellules qui ne permet pas de montrer une différence entre cellules traitées et non traitées. Une seule étude s'est intéressée à l'effet du vémurafénib sur cette lignée et mettait en évidence une résistance au traitement [32] mais dans cette étude l'évaluation se faisait uniquement par numération cellulaire. Nous n'avons pas retrouvé d'étude évaluant l'efficacité du vémurafénib sur la lignée SK-MEL-3 par le test au MTS. Par ailleurs, le vémurafénib semble avoir un effet cytotoxique modéré sur la lignée SK-MEL-3 à de fortes concentrations.

Concernant la lignée SK-MEL-28, nous avons observé une diminution de l'indice de prolifération et de l'activité métabolique en présence de vémurafénib. L'efficacité du vémurafénib sur cette lignée cultivée en 2D a été démontrée dans plusieurs études et nos résultats concordent avec les données de la littérature [32, 34, 35].

Ces résultats nous ont conduits à choisir la lignée SK-MEL-28 pour le développement des modèles 3D.

2) Développement et caractérisation du modèle 3D « derme + mélanocytes »

Les problèmes techniques rencontrés ont pu être résolus, et nous avons obtenu un équivalent de derme proche d'une peau humaine avec un bon équilibre entre cellules et MEC, un

aplatissement des fibroblastes et une horizontalisation des fibres de collagène. Nous avons également pu montrer que ce modèle était viable avec une prolifération des mélanocytes au sein du modèle et très peu de cellules apoptotiques. Nous avons constaté un amincissement au centre des modèles, non décrit par Carlson *et al.* [33], que ce soit en présence ou non de mélanocytes. Le type d'inserts, de collagène ou de fibroblaste utilisés explique peut-être ce phénomène.

Contrairement à nos attentes, les mélanocytes sont restés en surface du derme et nous n'avons observé que peu d'infiltration des cellules tumorales au sein du modèle. Ceci limite probablement les interactions des mélanocytes avec les fibroblastes et la MEC. Dans leur étude, Vörsmann *et al.* [30] ont montré un comportement différent des lignées de mélanome métastatique : les cellules envahissaient le derme en formant des métastases. Cependant, contrairement au leur, notre modèle ne comporte pas d'épiderme, permettant aux mélanocytes de proliférer en surface sans rencontrer d'obstacle. De plus, il est possible qu'un tel comportement varie d'une lignée cellulaire à l'autre, même au sein de lignées métastatiques. Il pourrait être intéressant de tester différentes lignées de mélanome métastatique afin de comparer leur comportement au sein du modèle. Par ailleurs, une complexification de notre modèle par l'ajout de kératinocytes humains (lignée HEKn : Human Epidermal Keratinocytes neonatal) afin de reconstituer un épiderme est envisagée. Cela pourrait modifier le comportement des mélanocytes.

Il est également possible que la durée de mise en culture de 7 jours n'ait pas permis d'observer d'infiltration franche. En effet, Tiago *et al.* [25] ont cultivé un modèle similaire jusqu'à 15 jours et ont montré que le degré d'infiltration des mélanocytes métastatiques au sein du derme augmentait avec la durée de culture.

3) Traitement du modèle 3D par vémurafénib

Dans leur étude, Tiago *et al.* [25] démontrent que la culture de lignées cellulaires de mélanome sur un équivalent de derme protège les mélanocytes de l'effet cytotoxique de la doxorubicine. Leur travail montre l'importance de l'environnement tumoral dans la réponse aux thérapeutiques. En effet, une tumeur n'est pas constituée uniquement de cellules tumorales, mais comporte un stroma qui par l'activation de voies de signalisation et la sécrétion de facteurs de croissances modifient le comportement des cellules tumorales [17], favorisant ainsi leur survie.

A l'heure actuelle, aucune étude n'a proposé de tester les molécules de thérapies ciblées sur des modèles 3D de mélanome. Le traitement par vémurafénib du modèle que nous proposons engendre une diminution de la prolifération des cellules en comparaison au modèle non traité. La numération cellulaire, réalisée après dégradation de la matrice extracellulaire semble confirmer cette observation. Cependant, il sera nécessaire de renouveler nos expériences afin de permettre une analyse statistique des données.

Il est morphologiquement impossible de différencier mélanocytes et fibroblastes lors du comptage. Or, il serait intéressant de pouvoir les distinguer car le vémurafénib diminue l'indice de prolifération des fibroblastes cultivés en 2D aux concentrations utilisées. Dans leur étude, Tiago *et al.* [25] ont pu distinguer les deux types cellulaires par cytométrie en flux après surexpression d'une protéine fluorescente grâce à un vecteur viral. L'utilisation de technique similaire pourrait nous permettre de distinguer les deux types cellulaires. Par exemple, il nous paraît envisageable de séparer mélanocytes et fibroblastes par un tri cellulaire immuno-magnétique.

Il est probable que la différence observée soit essentiellement liée à la diminution de prolifération des mélanocytes. En effet, le vémurafénib a un effet cytostatique sur la lignée HDFn, or nous avons montré qu'à J7 il n'y avait quasiment plus de prolifération des fibroblastes au sein du modèle de derme (sans mélanocytes). Pour confirmer cette hypothèse, nous envisageons d'évaluer l'effet du vémurafénib sur les fibroblastes seuls organisés en 3D. Enfin, si le vémurafénib s'avère avoir un effet sur les fibroblastes en 3D, il suffira de déterminer la concentration de traitement la plus adéquate pour obtenir un effet sur les cellules tumorales sans impacter les fibroblastes. En effet, l'indice de prolifération des fibroblastes ne commence à diminuer qu'à partir d'une concentration de 5 μM de vémurafénib, alors que la prolifération des mélanocytes décroît rapidement dès 0,5 μM .

4) Intérêts et limites de ce type de modèle 3D

Ce type de modèle permet d'étudier l'effet des thérapeutiques dans un environnement plus proche du vivant. Il est relativement facile à réaliser et les méthodes d'analyse (évaluation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et numération cellulaire) sont au point.

Les modèles cellulaires *in vitro* existants, utilisés notamment pour le développement thérapeutique, ne prennent pas en compte la complexité physiologique des cancers. Ceci explique en partie la différence entre l'effet constaté *in vitro* et la réalité clinique. Le type de modèle que nous proposons pourrait donc être utilisé en complément de la culture 2D

traditionnelle, en particulier lors des étapes de criblage de nouvelles molécules thérapeutiques.

Les progrès thérapeutiques en oncologie s'accroissent depuis quelques années et la thérapie personnalisée tend à se développer. Dans le mélanome, le choix du traitement se fait actuellement en fonction du statut *BRAF*. Malgré cela, la moitié des patients présentant un mélanome *BRAF* muté traité par vémurafénib résistent au traitement [10]. Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF sont multiples (mutations activatrices de MEK ou de NRAS, augmentation de l'expression de RAF de type sauvage, surexpression des récepteurs membranaires PDGFR- β et IGF-1R, etc.) et sont liés à la grande instabilité génétique des cellules tumorales [36]. Dans l'avenir, une caractérisation moléculaire plus complète pourrait permettre de proposer aux patients le traitement le plus adéquat. Cependant cette caractérisation nécessitera probablement l'utilisation de nombreuses techniques (techniques de biologie moléculaire, immunohistochimie, protéomique, etc.) et le développement de marqueurs robustes capables de documenter la résistance aux traitements. Le fait de pouvoir tester les molécules thérapeutiques *in vitro* sur des modèles incluant des cellules de patients, pourrait représenter une alternative ou être utilisé en complément des outils déjà existants. Les cultures d'explants ne peuvent être maintenues que pendant un temps restreint ce qui limite leur intérêt dans cette problématique [26]. Un support de culture est donc nécessaire. Les progrès réalisés dans l'ingénierie tissulaire permettent d'envisager l'utilisation de modèles de peau 3D. A moyen terme, le modèle que nous proposons pourrait ainsi être utile dans le cas des thérapies ciblées telles que le vémurafénib car leur mode d'action permet de les tester sur ce type de modèle. Les premières étapes de développement sont encourageantes. Il reste à préciser si la complexification du modèle (ajout d'un épiderme) est pertinente et si l'ajout de cellules de patients est réalisable en pratique.

Ce modèle présente tout de même des limites. Bien qu'il se rapproche d'un modèle *in vivo*, il n'en présente pas toutes les caractéristiques. Il ne comprend notamment pas de vascularisation, ni de cellules immunitaires. Or ces composantes, jouent un rôle essentiel dans la physiopathologie tumorale. L'immunothérapie, utilisée dans le traitement des mélanomes métastatiques, a un mode d'action plus complexe que les thérapies ciblées, ce qui pourrait limiter l'utilisation de ce type de modèle tumoral dans l'évaluation de l'efficacité de ces traitements. Cependant, l'adjonction de cellules immunocompétentes pourrait permettre de pallier ce défaut. Certaines équipes ont pu développer des modèles immunocompétents : Chau *et al* [37], ont par exemple réussi à intégrer des cellules dendritiques dérivées du sang de

donneurs et ont montré que leur modèle était immunocompétent avec une activation des cellules dendritiques suite à un traitement irritant la peau.

V) CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons développé, caractérisé et commencé à tester un modèle tumoral de mélanome en trois dimensions prenant en compte les interactions cellulaires et cellules/matrice extracellulaire. Le développement de ce modèle permet ainsi de se rapprocher de l'environnement physiologique des cellules tumorales. Cela permettra d'évaluer l'impact de l'environnement 3D sur la réponse au vémurafénib.

Ce modèle, viable et facilement réalisable, va servir de base à un prochain projet qui consistera à remplacer les lignées cellulaires établies de mélanome par des cellules provenant directement de patients. Le principe sera de prélever du tissu tumoral, d'isoler les cellules cancéreuses, de les cryoconserver, puis de les cultiver au sein du modèle. Une comparaison entre la réponse clinique et *in vitro* permettra d'évaluer l'intérêt du modèle dans le cadre de la thérapie personnalisée. Nous prévoyons également de complexifier le modèle par l'ajout d'un équivalent d'épiderme.

VI) BIBLIOGRAPHIE

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014 ; 64 : 9–29.
2. Brohem CA, Da Silva Cardeal LB, Tiago M, Soengas MS, de Moraes Barros SB, Maria-Engler SS. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011 ; 24 : 35–50.
3. Conde-Perez A, Larue L. Human relevance of NRAS/BRAF mouse melanoma models. *Eur J Cell Biol.* 2014 ; 93 : 82–86.
4. El-Nassan HB. Recent progress in the identification of BRAF inhibitors as anti-cancer agents. *Eur J Med Chem.* 2014 ; 72 : 170–205.
5. Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol.* 2011 ; 5 : 124–136.
6. Rahman MA, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK-Y. B-Raf mutation: a key player in molecular biology of cancer. *Exp Mol Pathol.* 2013 ; 95 : 336–342.
7. Ilieva KM, Correa I, Josephs DH, Karagiannis P, Egbuniwe IU, Cafferkey MJ, et al. Effects of BRAF mutations and BRAF inhibition on immune responses to melanoma. *Mol Cancer Ther.* 2014 ; 13 : 2769–2783.
8. Kimbrough CW, McMasters KM, Davis EG. Principles of surgical treatment of malignant melanoma. *Surg Clin North Am.* 2014 ; 94 : 973–988.
9. Atallah E, Flaherty L. Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2005 ; 6 : 185–193.
10. 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.
11. Larkin J, Lao CD, Urba WJ, McDermott DF, Horak C, Jiang J, et al. Efficacy and safety of nivolumab in patients with BRAF V600 mutant and BRAF wild-type advanced melanoma: a pooled analysis of 4 clinical trials. *JAMA Oncol.* 2015 ; 1 : 433–440.
12. Ribas A, Puzanov I, Dummer R, Schadendorf D, Hamid O, Robert C, et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015 ; 16 : 908–918.
13. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al.

Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med.* 2014 ; 371 : 1877–1888.

14. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med.* 2014 ; 371 : 1867–1876.

15. Herlyn M, Fukunaga-Kalabis M. What is a good model for melanoma? *J Invest Dermatol.* 2010 ; 130 : 911–912.

16. Herlyn M, Thurin J, Balaban G, Bennicelli JL, Herlyn D, Elder DE, et al. Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression. *Cancer Res.* 1985 ; 45 : 5670–5676.

17. Smalley KSM, Lioni M, Herlyn M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2006 ; 42 : 242–247.

18. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science.* 1988 ; 240 : 177–184.

19. Boisvert-Adamo K, Longmate W, Abel EV, Aplin AE. Mcl-1 is required for melanoma cell resistance to anoikis. *Mol Cancer Res.* 2009 ; 7 : 549–556.

20. Goundiam O, Nagel M-D, Vayssade M. Growth and survival signalling in B16F10 melanoma cells in 3D culture. *Cell Biol Int.* 2010 ; 34 : 385–391.

21. Vayssade M, Sengkhampan N, Verhoef R, Delaigue C, Goundiam O, Vigneron P, et al. Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16F10 melanoma cells. *Phytother Res.* 2010 ; 24 : 982–989.

22. Eke I, Cordes N. Radiobiology goes 3D: how ECM and cell morphology impact on cell survival after irradiation. *Radiother Oncol.* 2011 ; 99 : 271–278.

23. Roth A, Singer T. The application of 3D cell models to support drug safety assessment: opportunities & challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 ; 69-70 : 179–189.

24. Kimlin LC, Casagrande G, Virador VM. In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. *Mol Carcinog.* 2013 ; 52 : 167–182.

25. Tiago M, de Oliveira EM, Brohem CA, Pennacchi PC, Paes RD, Haga RB, et al. Fibroblasts protect melanoma cells from the cytotoxic effects of doxorubicin. *Tissue Eng Part A.* 2014 ; 20 : 2412–2421.

26. Hickman JA, Graeser R, de Hoogt R, Vidic S, Brito C, Gutekunst M, et al. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnol J.* 2014 ; 9 : 1115–1128.

27. Xu X, Farach-Carson MC, Jia X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer

research and drug evaluation. *Biotechnol Adv.* 2014 ; 32 : 1256–1268.

28. Schuessler TK, Chan XY, Chen HJ, Ji K, Park KM, Roshan-Ghias A, et al. Biomimetic tissue-engineered systems for advancing cancer research: NCI Strategic Workshop report. *Cancer Res.* 2014 ; 74 : 5359–5363.
29. Meier F, Nesbit M, Hsu M-Y, Martin B, Van Belle P, Elder DE, et al. Human melanoma progression in skin reconstructs: biological significance of bFGF. *Am J Pathol.* 2000 ; 156 : 193–200.
30. Vörsmann H, Groeber F, Walles H, Busch S, Beisert S, Walczak H, et al. Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing. *Cell Death Dis.* 2013 ; 4 : e719.
31. Kiowski G, Biedermann T, Widmer DS, Civenni G, Burger C, Dummer R, et al. Engineering melanoma progression in a humanized environment in vivo. *J Invest Dermatol.* 2012 ; 132 : 144–153.
32. Tap WD, Gong K-W, Daring J, Tseng Y, Ginther C, Pauletti G, et al. Pharmacodynamic characterization of the efficacy signals due to selective BRAF inhibition with PLX4032 in malignant melanoma. *Neoplasia.* 2010 ; 12 : 637–649.
33. Carlson MW, Alt-Holland A, Egles C, Garlick JA. Three-dimensional tissue models of normal and diseased skin. *Curr Protoc Cell Biol* Editor Board Juan Bonifacino Al. 2008 ; Chapter 19 : Unit 19.9.
34. Yang H, Higgins B, Kolinsky K, Packman K, Go Z, Iyer R, et al. RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res.* 2010 ; 70 : 5518–5527.
35. Søndergaard JN, Nazarian R, Wang Q, Guo D, Hsueh T, Mok S, et al. Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032. *J Transl Med.* 2010 ; 8 : 39.
36. Charles J, Martel C, de Fraipont F, Leccia M-T, Robert C, Busser B. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF. *Ann Dermatol Vénéréologie.* 2014 ; 141 : 671–681.
37. Chau DYS, Johnson C, MacNeil S, Haycock JW, Ghaemmaghami AM. The development of a 3D immunocompetent model of human skin. *Biofabrication.* 2013 ; 5 : 035011.

Site internet consulté : www.e-cancer.fr