

Remerciements .....	2
Résumés .....	4
Table des Matieres .....	8
Liste des Figures .....	12
Liste des Tableaux .....	16
Avant-Propos .....	18
Introduction .....	20
Partie 1 : Présentation générale de la peau et de ses modèles d'étude <i>in vitro</i> .....	22
1. Présentation générale de la structure de la peau humaine .....	22
2. Les modèles d'étude <i>in vitro</i> de la peau humaine .....	32
Partie 2 : Le mélanome, développement et approches thérapeutiques .....	42
1. Facteurs de risque impliqués dans le développement du mélanome .....	44
2. Développement de la pathologie .....	46
3. Traitement du mélanome.....	52
Partie 3 : Les modèles d'étude précliniques du mélanome.....	62
1. Les modèles <i>in vitro</i> .....	62
2. Les modèles <i>in vivo</i> .....	70
3. Importance des modèles d'étude dans le développement préclinique d'un composé thérapeutique .....	84
Objectifs de la thèse .....	88
Résultats .....	90
Partie 1 : Développement d'un modèle de mélanome humain <i>ex vivo</i> .....	92
1. Présentation des stratégies testées pour l'implantation d'un sphéroïde unique dans une biopsie de peau .....	92
2. Impact des différentes conditions d'implantation sur l'intégrité des sphéroïdes après implantation.....	94
3. Evaluation du taux de réussite d'implantation en gélatine visqueuse.....	100
4. Analyse de l'impact de l'injection de gélatine sur la viabilité cellulaire au sein des explants de peau .....	100
5. Procédure d'obtention du modèle OncoSkin®.....	104
Partie 2 : Application du modèle OncoSkin® à l'étude du mélanome : développement de stratégies d'analyse .....	106
1. Analyse de la migration des cellules tumorales à l'échelle macroscopique.....	106
2. Analyse en trois dimensions de l'évolution du volume de la micro-tumeur.....	108

3. Caractérisation du devenir de la micro-tumeur en histologie .....	112
Partie 3 : Caractérisation de la viabilité cellulaire du sphéroïde au sein du modèle OncoSkin® .....	114
1. Caractérisation de la viabilité cellulaire des sphéroïdes de cellules de la lignée WM-266-4 implantés.....	114
2. Evaluation de la viabilité de sphéroïdes des lignées de mélanome WM-115, d'adénocarcinome colique HCT116 et de cellules primaires de kératinocytes et de mélanocytes après implantation .....	122
Partie 4 : Evaluation de l'impact des facteurs environnementaux sur l'évolution du sphéroïde dans le modèle OncoSkin® .....	128
1. Impact des conditions d'implantation .....	128
2. Impact des facteurs sécrétés par le modèle OncoSkin® .....	132
3. Impact de la contrainte mécanique sur la viabilité des sphéroïdes .....	136
4. Impact de la viabilité de l'explant de peau sur le devenir du sphéroïde implanté ..	140
Discussion et Perspectives.....	144
Partie 1 : Perspectives d'applications et d'amélioration du modèle OncoSkin® comme modèle d'étude préclinique .....	146
Partie 2 : Implication de différents facteurs dans la mortalité des sphéroïdes implantés .	152
1. Impact des conditions de production du modèle OncoSkin®.....	152
2. Impact du microenvironnement du modèle OncoSkin® sur la viabilité des sphéroïdes	154
Partie 3 : Perspectives d'applications de la stratégie d'analyse <i>in situ</i> développée au cours du projet.....	162
Conclusion Générale .....	166
Matériels et Méthodes .....	170
1. Culture cellulaire .....	171
2. Culture des modèles OncoSkin® et NativeSkin® .....	172
3. Analyse en histologie .....	174
4. Visualisation des biopsies de peau et des sphéroïdes <i>in toto</i> .....	178
Liste des Abréviations .....	182
Références Bibliographiques.....	186
Annexes .....	208
Annexe 1 : Brevet .....	209



# LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique de la structure de la peau. ....	21
Figure 2. Représentation schématique des différentes couches de l'épiderme.....	21
Figure 3. Structure de la peau en coloration hématoxyline et éosine. ....	25
Figure 4. Représentation schématique des principales annexes cutanées. ....	27
Figure 5. Anatomie du follicule pileux. ....	29
Figure 6. Représentation des différents modèles in vitro de peau en fonction de leur complexité et de leur intérêt pour le développement de composés thérapeutiques. ....	31
Figure 7. Procédé de développement d'un modèle de peau reconstruite.....	33
Figure 8. Présentation du modèle de peau humaine ex vivo NativeSkin®. ....	37
Figure 9. Evolution des taux d'incidence et de mortalité du mélanome. ....	41
Figure 10. Les étapes de progression du mélanome cutané.....	45
Figure 11. Les principales voies de signalisation impliquées dans le développement du mélanome. ....	47
Figure 12. Les différents stades cliniques de progression du mélanome. ....	51
Figure 13. Evolution des traitements approuvés par la FDA pour le mélanome métastatique. ....	53
Figure 14. Principe de l'immunothérapie avec des anticorps monoclonaux. ....	57
Figure 15. Composés thérapeutiques ciblant les effecteurs dérégulés dans le mélanome. ..	57
Figure 16. Amélioration de la survie des patients traités avec des thérapies ciblées. ....	59
Figure 17. Les différents modèles d'étude préclinique. ....	61
Figure 18. Caractéristiques du modèle du sphéroïde multicellulaire. ....	63
Figure 19. Etude du développement du mélanome dans des modèles organotypiques.....	67
Figure 20. Applications des différents modèles murins pour l'étude du mélanome. ....	71
Figure 21. Les différents modèles de xénogreffe. ....	75
Figure 22. Utilisation des modèles PDX pour la thérapie personnalisée. ....	79
Figure 23. Les différentes étapes du développement d'un composé thérapeutique.....	83
Figure 24. Schémas de montage des différentes techniques d'implantation. ....	93
Figure 25. Comparaison de différentes techniques pour la transparisation de biopsies de peau. ....	95
Figure 26. Observation des sphéroïdes après implantation au sein des explants de peau en macroscopie.....	95
Figure 27. Comparaison du résultat de différentes techniques d'implantation des sphéroïdes de WM-266-4. ....	97
Figure 28. Evolution de la gélatine injectée en culture.....	99
Figure 29. Caractérisation de l'expression des marqueurs de prolifération et d'apoptose Ki67 et caspase-3 dans les modèles NativeSkin® 24h après injection de la gélatine. ....	101
Figure 30. Schéma récapitulatif de la procédure d'obtention du modèle OncoSkin®. ....	103

Figure 31. Procédure d'analyse de la migration des cellules du sphéroïde dans les explants de peau. ....	105
Figure 32. Identification de la structure du derme et d'annexes cutanées dans des explants de peau humaine à l'aide de leur autofluorescence au SPIM. ....	107
Figure 33. Co-visualisation de l'autofluorescence de la peau et de la fluorescence d'un sphéroïde de HCT116 en 3 dimensions à l'aide du SPIM. ....	109
Figure 34. Combinaison des analyses macroscopique, en trois dimensions et en histologie pour étudier l'évolution d'un sphéroïde de la lignée HCT116 implanté. ....	111
Figure 35. Evolution de la structure du modèle OncoSkin® en culture. ....	115
Figure 36. Evaluation de la prolifération des cellules du sphéroïde implanté en culture. ....	117
Figure 37. Evaluation de l'expression de la caspase-3 dans les cellules du sphéroïde implanté en culture. ....	119
Figure 38. Evaluation de la structure des sphéroïdes de différentes lignées dans le modèle OncoSkin® non cultivé. ....	121
Figure 39. Evolution de la structure des sphéroïdes de différentes lignées dans le modèle OncoSkin® cultivé 3 jours. ....	123
Figure 40. Caractérisation de l'expression des marqueurs de prolifération et d'apoptose Ki67 et caspase-3 dans les sphéroïdes HCT116 implantés. ....	125
Figure 41. Comparaison de la morphologie et de la viabilité de sphéroïdes de WM-266-4 implantés dans différentes solutions 3 jours après implantation. ....	127
Figure 42. Caractérisation de la morphologie de petits sphéroïdes de WM-266-4 3 jours après implantation. ....	129
Figure 43. Impact des facteurs sécrétés par les modèles implantés sur la croissance des sphéroïdes de WM-266-4. ....	131
Figure 44. Caractérisation en histologie de l'effet des sécrétions des modèles OncoSkin® sur les sphéroïdes de WM-266-4. ....	133
Figure 45. Impact de la contrainte mécanique sur la croissance des sphéroïdes de WM-266-4. ....	135
Figure 46. Caractérisation en histologie de l'effet de la contrainte mécanique sur les sphéroïdes de WM-266-4. ....	137
Figure 47. Caractérisation morphologique des sphéroïdes de WM-266-4 implantés dans des biopsies de peau desséchées. ....	139
Figure 48. Evaluation de la viabilité des sphéroïdes implantés en peau desséchée. ....	141
Figure 49. Schéma récapitulatif des différents facteurs pouvant être impliqués dans la mortalité du sphéroïde implanté. ....	151

**Rapport-Gratuit.com**

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Fréquences d'occurrence des principales mutations intervenant dans le développement du mélanome.....	47
Tableau 2. Taux de survie à 5 ans associés au stade de progression au moment du diagnostic.....	51
Tableau 3. Applications et limites des différents modèles d'étude du mélanome.....	81
Tableau 4. Conditions spécifiques aux anticorps primaires utilisés .....	175
Tableau 5. Conditions spécifiques aux anticorps secondaires utilisés .....	175





# AVANT-PROPOS

Le mélanome est le cancer de la peau le plus agressif, et son incidence est en constante augmentation depuis plusieurs décennies. Tandis que cette pathologie est associée à un bon pronostic lorsqu'elle est diagnostiquée durant ses premiers stades de développement, aucune thérapie ne permet actuellement de traiter de manière efficace le stade métastatique, notamment en raison de sa résistance aux approches chimiothérapeutiques et malgré le développement récent de nouvelles stratégies thérapeutiques telles que les thérapies ciblées ou l'immunothérapie.

Il existe actuellement un réel besoin de nouveaux modèles d'étude précliniques permettant d'étudier le mélanome et de prédire avec efficacité l'activité et la toxicité de composés thérapeutiques. Afin d'être prédictifs, ces modèles doivent permettre d'étudier la tumeur dans son microenvironnement, les interactions entre ces deux composants jouant un rôle dans les mécanismes de résistance aux thérapies.

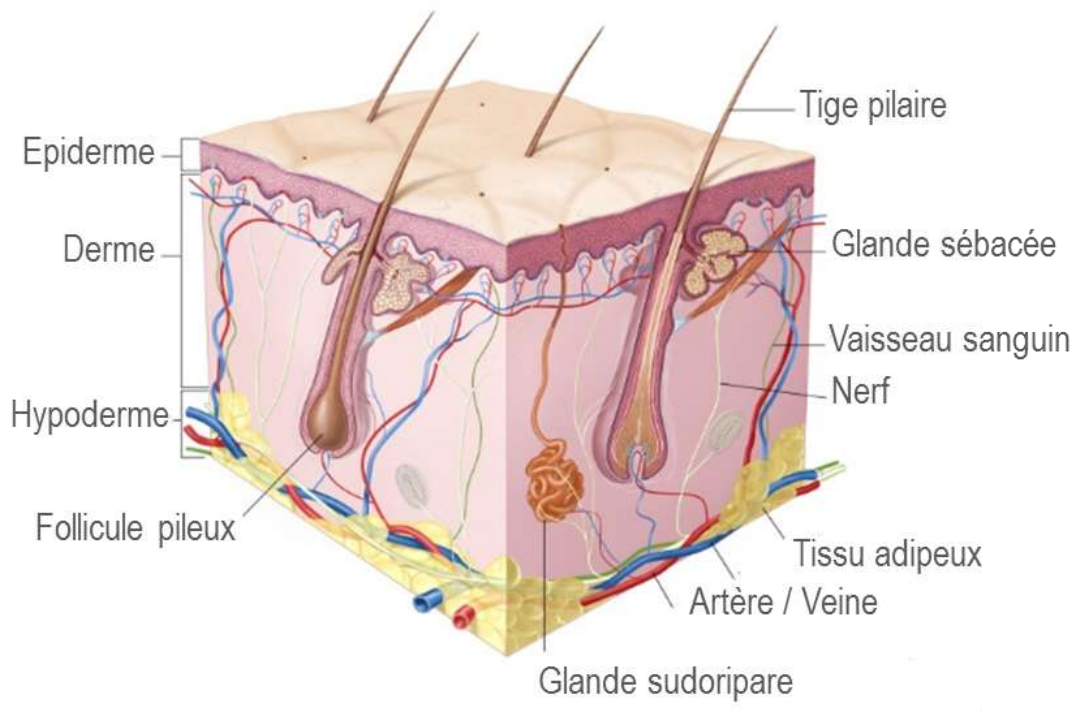
L'utilisation de tels modèles doit contribuer à l'élaboration de stratégies thérapeutiques permettant d'améliorer la survie des patients d'une part, mais également à l'identification de composés ayant un réel potentiel thérapeutique avant qu'ils n'entrent en phase de développement clinique d'autre part, afin de réduire les taux d'attrition et coûts de recherche et développement associés au développement de médicaments.

Dans ce contexte, ce projet de thèse porte sur le développement d'un modèle de mélanome humain *ex vivo* permettant d'étudier la tumeur dans son microenvironnement, la peau.

La partie introductive a pour but de poser le contexte dans lequel s'inscrit ce projet et est divisée en trois parties. La première partie porte tout d'abord sur la structure générale de la peau et dresse un état de l'art des modèles *in vitro* actuellement utilisés pour étudier cet organe. La seconde partie est consacrée au mélanome et rappelle les connaissances nécessaires à la compréhension du développement de cette pathologie et aux stratégies thérapeutiques existantes. Enfin, les principaux modèles actuellement utilisés pour étudier le mélanome ainsi que les enjeux associés au développement d'un composé thérapeutique seront présentés dans une dernière partie.

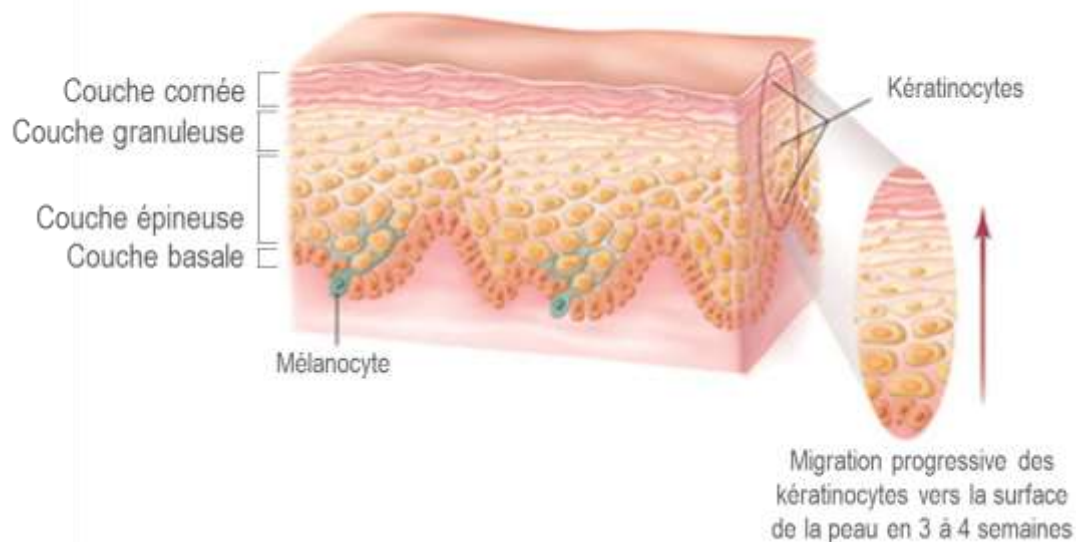


# INTRODUCTION



**Figure 1. Représentation schématique de la structure de la peau.**

Adapté de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022679/?figure=2>



**Figure 2. Représentation schématique des différentes couches de l'épiderme.**

Adapté de <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Melanomes-de-la-peau/Anatomie-de-la-peau>

## Partie 1 : Présentation générale de la peau et de ses modèles d'étude *in vitro*

### 1. Présentation générale de la structure de la peau humaine

La peau est l'enveloppe recouvrant notre corps. Chez l'adulte, elle couvre une surface d'environ 2 m<sup>2</sup> sur une épaisseur moyenne de 2,5 mm, et représente 6% du poids total de son corps. En tant que premier organe en contact avec l'extérieur, elle assure différentes fonctions qui font d'elle un organe vital : elle agit tout d'abord comme barrière de protection contre les agressions extérieures, aussi bien mécaniques ou chimiques que microbiennes, mais joue également un rôle dans la thermorégulation de l'organisme, la prévention de la perte en eau ainsi que dans les réactions immunitaires et la réception d'informations sensorielles (Crickx 2005b; Hurtley et al. 2014).

Ces diverses fonctions lui sont conférées par les trois compartiments qui la constituent, l'épiderme, le derme et l'hypoderme, ainsi que les différentes annexes cutanées qui leur sont associées telles que les glandes sudoripares, les glandes sébacées ou les follicules pileux (**Figure 1**).

#### 1.1 L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau. C'est un épithélium pavimenteux stratifié d'une centaine de microns d'épaisseur, composé de 4 types cellulaires : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (Prost-Squarcioni 2005; Crickx 2005a).

Les kératinocytes représentent le type cellulaire majoritaire de l'épiderme : ils constituent en effet 80% de sa population cellulaire et lui confèrent son organisation stratifiée en migrant de la profondeur vers la surface au cours de leur différenciation. L'épiderme est ainsi divisé en 4 couches distinctes, définies en fonction de la forme et du statut de différenciation des kératinocytes (**Figure 2**).

La couche basale est la plus profonde de l'épiderme. Cette couche comporte toujours une assise cellulaire unique, contrairement aux autres couches dont l'épaisseur est variable. Les cellules qui la constituent sont directement en contact avec la jonction dermo-épidermique, à laquelle les kératinocytes sont reliés par les hémidesmosomes (Tsuruta et al. 2011). Les cellules souches qui assurent le renouvellement de l'épiderme sont localisées dans la couche



basale (Schepeler, Page, and Jensen 2014). Cette couche est également la seule au sein de laquelle les kératinocytes prolifèrent.

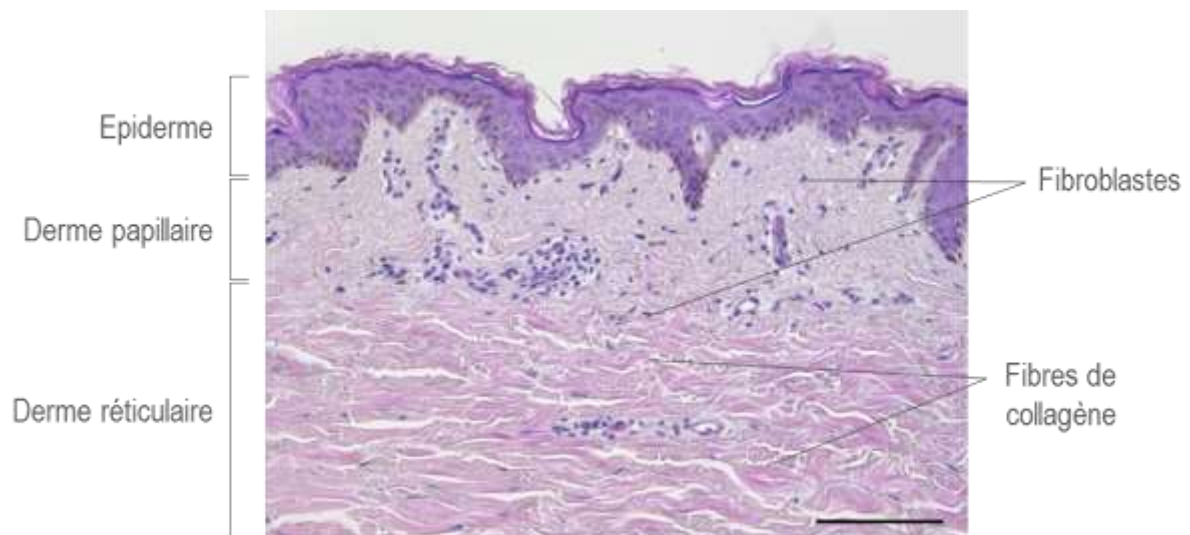
La couche épineuse est composée de plusieurs assises de kératinocytes, dont la morphologie est polygonale. Dans la couche granuleuse, les kératinocytes sont répartis dans plusieurs assises cellulaires et présentent une morphologie aplatie, dans un axe parallèle à celui de la jonction dermo-épidermique. Finalement, les kératinocytes perdent leurs organites, dont le noyau, tout en s'aplatissant et s'enrichissant d'un réseau dense de kératine. Ils deviennent des cornéocytes dans la couche cornée, qui est la plus superficielle de l'épiderme. Le processus de différenciation et de migration des kératinocytes de la couche basale à la couche cornée de l'épiderme dure en moyenne 3 à 4 semaines chez l'Homme.

Les kératinocytes confèrent à l'épiderme 3 fonctions distinctes : la cohésion de sa structure d'une part, grâce à leur cytosquelette et aux desmosomes qui les relient entre eux ; sa fonction de barrière entre l'organisme et le milieu extérieur d'autre part, liée à leur différenciation terminale en cornéocytes (van Smeden and Bouwstra 2016) ; et enfin une protection contre les radiations lumineuses, grâce à l'incorporation de grains de mélanine dans leur cytoplasme.

Les mélanocytes constituent le second type cellulaire le plus abondant de l'épiderme : on dénombre 1 mélanocyte pour 35 kératinocytes, basaux et suprabasaux confondus. Ces cellules dendritiques, localisées dans la couche basale de l'épiderme, synthétisent 2 types de mélanine au sein des mélanosomes : les eumélanines, de couleur brun-noir, et les phéomélanines, de couleur jaune-rouges. La proportion de ces deux pigments définit la couleur de la peau d'un individu, appelée pigmentation constitutive, par opposition à la pigmentation facultative, qui apparaît en réponse à une exposition aux radiations ultraviolettes. Par convention, on distingue 6 phénotypes cutanés selon les pigmentations constitutive et facultative de la peau. Les eumélanines jouent également un rôle important de photoprotection, tandis qu'à l'inverse, les phéomélanines sont carcinogènes en réponse à l'exposition à des radiations lumineuses. Les mélanines sont synthétisées dans des organites spécifiques, les mélanosomes. Ceux-ci sont ensuite transférés aux kératinocytes par cytophagocytose (Kondo and Hearing 2011).

Les cellules de Langerhans représentent 3 à 8% des cellules de l'épiderme. Ces cellules dendritiques transépithéliales appartiennent au système immunitaire : présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T, leur rôle est de capter les exo-antigènes avant de migrer dans l'épiderme puis le derme de la peau jusqu'au système lymphatique afin de présenter les antigènes capturés aux lymphocytes T naïfs, permettant ainsi leur activation (Crickx 2005a; Seneschal et al. 2012).





**Figure 3. Structure de la peau en coloration hématoxyline et éosine.**  
Barre d'échelle 100 µm.

Enfin, les cellules de Merkel représentent la population cellulaire minoritaire de l'épiderme. Ces cellules neuro-épithéliales jouent le rôle de mécanorécepteurs. Elles sont irrégulièrement réparties dans la couche basale de l'épiderme et sont souvent regroupées en amas dans les zones les plus sensibles de la peau (lèvres, paumes, pulpes des doigts, ...), formant des disques appelés corpuscules de Merkel (Boulais and Misery 2007; Zimmerman, Bai, and Ginty 2014)..

## 1.2 Le derme

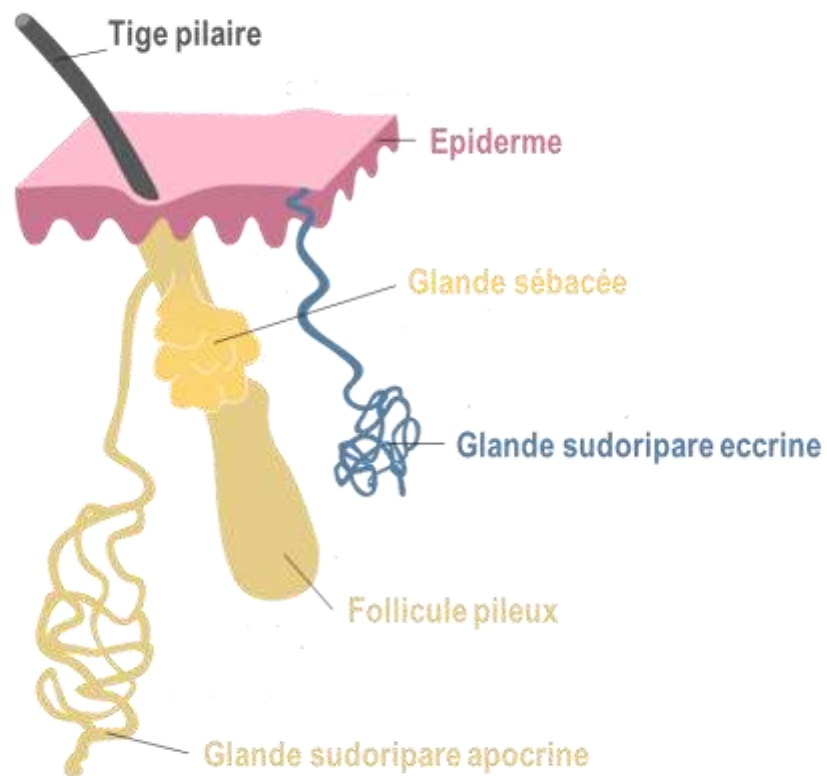
Le derme est séparé de l'épiderme par la jonction dermo-épidermique. C'est un tissu conjonctif richement vascularisé et innervé dont l'épaisseur moyenne varie de 1 à 2 mm. Il est principalement constitué d'une matrice extracellulaire abondante, composée de protéines fibreuses insolubles, telles que les fibres de collagène – principalement de type I, III et V, constituant 60-80%, 15-20% et 2-5% des fibres respectivement - et les fibres élastiques. Ces différentes fibres sont réparties dans un gel aqueux de glycoprotéines et de protéoglycannes, appelé substance fondamentale (Mélissopoulos and Levacher 1998).

Ces différents constituants confèrent à la peau ses propriétés mécaniques. Comme leur nom l'indique, les fibres élastiques sont responsables de l'élasticité de la peau : elles sont en effet capables de s'allonger de 120 à 150% avant de reprendre leur longueur initiale. Cette caractéristique contribue à protéger l'organisme des chocs extérieurs. A l'inverse, les fibres de collagène ne sont ni extensibles ni élastiques. Elles confèrent au derme sa résistance aux forces de traction.

Deux catégories de cellules distinctes sont présentes dans ce compartiment : les fibroblastes, d'origine mésenchymateuse, et des cellules d'origine hématopoïétique, tels que les mastocytes et des macrophages, impliqués notamment dans la surveillance immunitaire (Mélissopoulos and Levacher 1998; Freinkel and Woodley 2001). Les fibroblastes synthétisent les différents constituants de la matrice extracellulaire et sont responsables de leur renouvellement, via la production d'enzymes de dégradation de cette matrice (Vapniarsky et al. 2015).

Enfin, le derme abrite également de nombreux vaisseaux sanguins, intervenant dans les échanges de chaleur avec le milieu extérieur et la nutrition des différents compartiments de la peau, et un réseau nerveux très dense, assurant la sensibilité de la peau à la température, à la pression et à la douleur (Prost-Squarcioni 2005).

Le derme est divisé en 2 zones, caractérisées par des organisations distinctes : le derme papillaire et le derme réticulaire (**Figure 3**).



**Figure 4. Représentation schématique des principales annexes cutanées.**

Adapté de [www.cosmeticofficine.com/la-peau-et-ses-differentes-couches-tissulaires/les-annexes-cutanees/](http://www.cosmeticofficine.com/la-peau-et-ses-differentes-couches-tissulaires/les-annexes-cutanees/)

Le derme papillaire est la partie superficielle du derme, située immédiatement sous la jonction dermo-épidermique, entre les crêtes épidermiques. Il est composé d'un tissu conjonctif lâche, constitué par des fibres de collagène isolées et de fines fibres élastiques, appelées fibres oxytalanées. L'orientation de ces différentes fibres est majoritairement perpendiculaire au plan formé par la membrane basale. Cette région du derme abrite également des terminaisons nerveuses et des récepteurs au tact, les corpuscules de Meissner. La densité cellulaire est particulièrement importante dans le derme papillaire, qui abrite ainsi la majorité des fibroblastes, responsables du renouvellement de la matrice extracellulaire.

Le derme réticulaire est la partie plus profonde du derme. Il n'est pas séparé du derme papillaire par une limite franche, mais par une modification de sa structure. Le tissu conjonctif qui le constitue est dense et constitué de fibres de collagène organisées en trousseaux épais de longueur indéfinie, et de fibres élastiques matures et immatures, les fibres d'élaunine. L'ensemble de ces fibres s'entrecroise dans toutes les directions en suivant des plans relativement parallèles à la surface de la peau (Crickx 2005a). Cette partie du derme contient également des artérioles et veinules, ainsi que des petits nerfs.

### 1.3 L'hypoderme

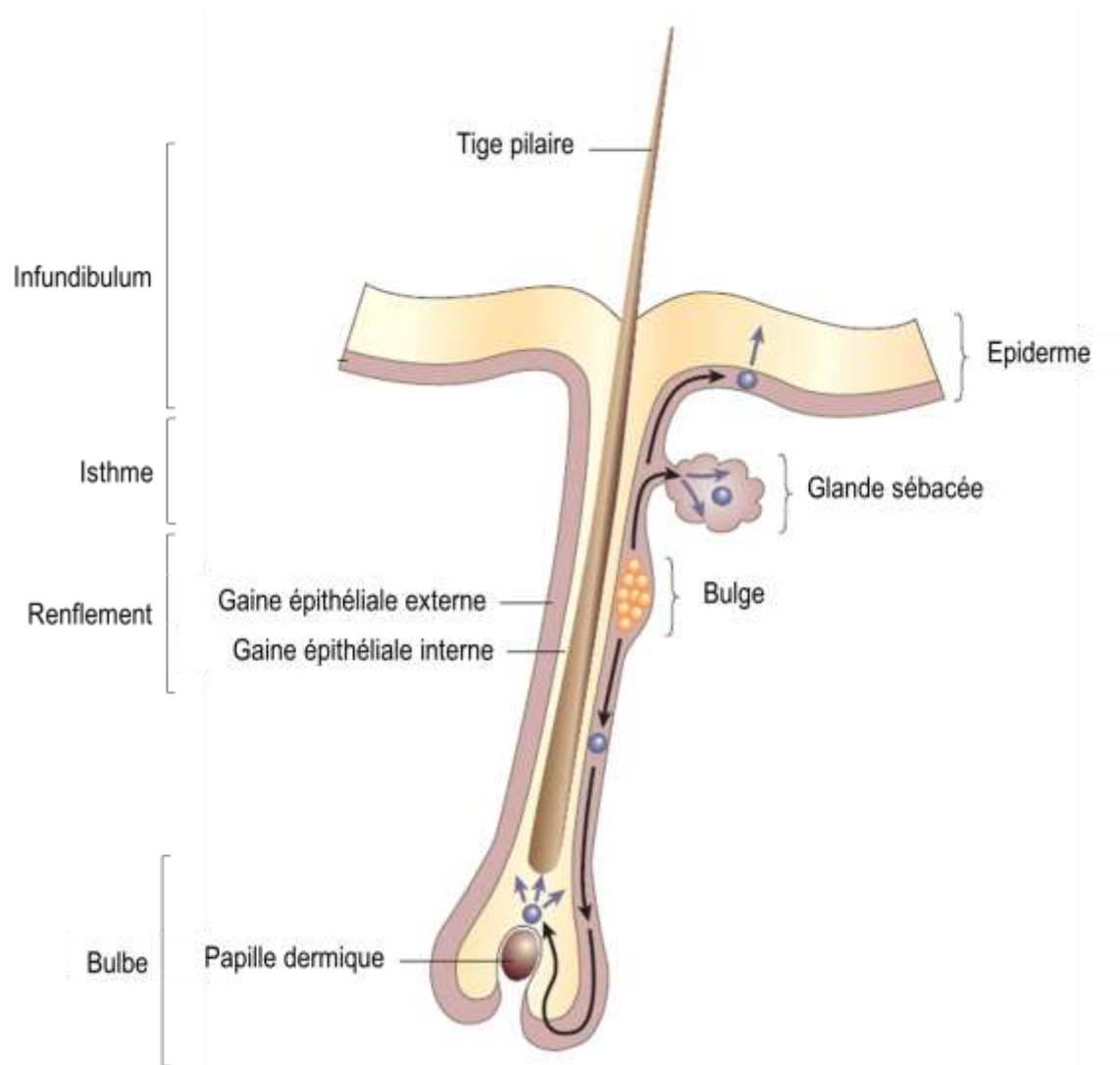
Tout comme le derme, l'hypoderme est un tissu conjonctif. Il n'est pas séparé du derme réticulaire par une limite franche mais assure sa continuité. L'hypoderme est constitué de lobules graisseux formés par les adipocytes séparés par des septums interlobulaires, qui permettent le passage des nerfs et vaisseaux jusqu'au derme.

L'épaisseur de tissu adipeux varie selon les individus et selon les régions corporelles : très mince au niveau du front voire absent au niveau des paupières et des oreilles, elle est plus importante au niveau de l'abdomen ou des cuisses.

L'hypoderme possède plusieurs fonctions : il joue tout d'abord un rôle majeur dans la thermorégulation de l'organisme, mais représente également une barrière physique contre les agressions microbiennes. Il contribue par ailleurs à fixer la peau sur les organes qu'elle recouvre. Enfin, il constitue une réserve d'énergie via le stockage des lipides (Alexander et al. 2015).

### 1.1 Les annexes cutanées

Les annexes cutanées sont des structures épithéliales qui prennent racine dans le derme ou dans l'hypoderme. Elles regroupent différentes structures telles que les glandes sébacées et sudoripares, les poils et les ongles (**Figure 4**).



**Figure 5. Anatomie du follicule pileux.**  
Adapté de Reya and Clevers 2005.

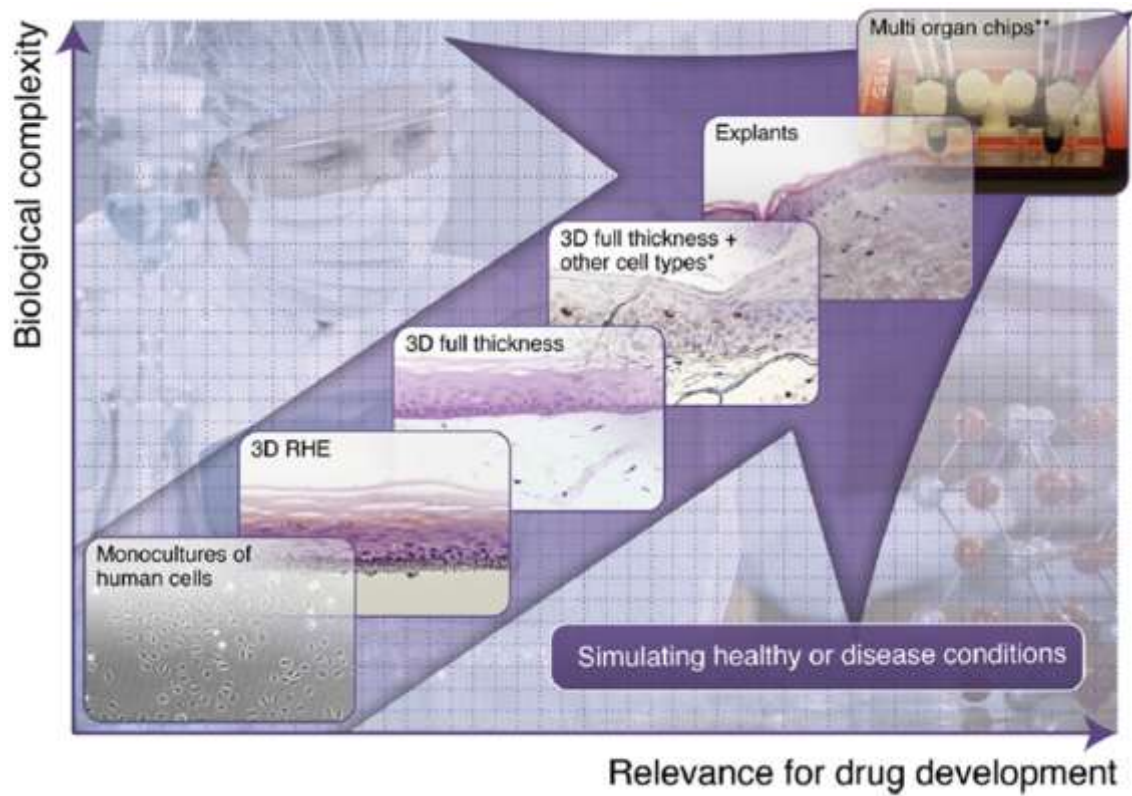
Les glandes sébacées sont généralement associées aux poils, formant le follicule pilo-sébacé. Leur taille est inversement proportionnelle à celle du follicule pileux auquel elles sont rattachées. Les glandes sébacées sont des glandes exocrines dont la portion sécrétrice est située dans le derme. Les cellules qui la constituent, les sébocytes, produisent et excrètent le sébum, qui est déversé dans le conduit pilo-sébacé. Ce sébum contribue à protéger la peau du dessèchement et possède également des propriétés anti-fongiques (Crickx 2005a).

Les glandes sudoripares sont des glandes exocrines constituées d'une portion sécrétrice tubuleuse et d'un canal excréteur. On distingue 2 types de glandes sudoripares : les glandes eccrines et apocrines (Crickx 2005a). Les glandes sudoripares eccrines sont réparties sur l'ensemble de la surface de la peau et sont situées dans le derme réticulaire profond, voire l'hypoderme. Elles sécrètent la sueur, un liquide aqueux qui joue un rôle dans la thermorégulation de l'organisme et participe à sa détoxification. Leur canal excréteur traverse le derme puis l'épiderme et débouche à la surface de la peau au niveau d'un pore. Les glandes sudoripares apocrines sont systématiquement annexées à un follicule pilo-sébacé. Elles ne sont présentes que dans des régions bien définies de l'organisme, telles que les paupières ou le pubis. Leur rôle n'est pas précisément identifié. Leur portion sécrétrice est située plus profondément que celle des glandes eccrines dans l'hypoderme, et leur canal excréteur débouche dans le conduit pilo-sébacé.

Le follicule pileux est constitué d'une tige pileuse, d'une gaine épithéliale et d'un muscle arrecteur, dont la contraction dicte l'horripilation de la tige pileuse (Prost-Squarcioni 2005). Il est divisé en 4 zones (**Figure 5**):

- L'infundibulum est la partie supérieure, au niveau de laquelle la tige pileuse émerge à la surface de la peau ;
- L'isthme est la région dans laquelle la ou les glandes sébacées s'abouchent au follicule pileux ;
- Le bulge est un renflement situé sous l'insertion du muscle arrecteur du poil, qui contient les cellules souches du follicule pileux (Schepeler, Page, and Jensen 2014) ;
- La racine du poil, ou région sous-isthmique, comprend la papille dermique, entourée de la matrice du poil et des différentes gaines du follicule pileux, les gaines épithéliales interne et externe. Elle est ancrée dans l'hypoderme.

Les follicules pileux sont présents sur l'ensemble de la surface de la peau, à l'exception de rares zones telles que les paumes et les plantes. La croissance de la tige pileuse suit des cycles alternant des phases d'activité et de repos.



**Figure 6. Représentation des différents modèles *in vitro* de peau en fonction de leur complexité et de leur intérêt pour le développement de composés thérapeutiques.**

RHE : Reconstructed Human Epidermis. D'après Mathes, Ruffner, and Graf-Hausner 2014.



## 2. Les modèles d'étude *in vitro* de la peau humaine

Afin de pouvoir étudier les fonctions de la peau et les différentes pathologies auxquelles cet organe peut être sujet, différents modèles d'étude ont été développés. En effet, bien que cet organe soit facilement accessible, les expérimentations chez l'homme sont limitées, notamment pour des raisons éthiques (Lebonvallet et al. 2010).

Il existe un grand nombre de modèles animaux, développés par exemple chez le cochon, dont la structure de la peau est similaire à la peau humaine (Jacobi et al. 2007; Godin and Touitou 2007), ou chez la souris, qui est facilement disponible et manipulable en laboratoire (Godin and Touitou 2007). Cependant, ces différents modèles ne permettent pas de reproduire fidèlement les caractéristiques de la peau humaine, notamment en termes de perméabilité : différentes études ont en effet montré une pénétration plus importante de composés chez la souris que chez l'homme (Bond and Barry 1988; Roberts and Mueller 1990). Par ailleurs, l'utilisation de modèles animaux tend actuellement à être réduite pour des raisons éthiques, et a récemment fait l'objet d'une interdiction dans le cas d'études dermo-cosmétiques (Gruber and Hartung 2004; Fernandes et al. 2015).

Différents modèles *in vitro* permettent d'étudier la peau dans un contexte entièrement humain. Ces modèles, de complexités différentes, ont été développés pour répondre à des questions et applications différentes (Mathes, Ruffner, and Graf-Hausner 2014) (**Figure 6**).

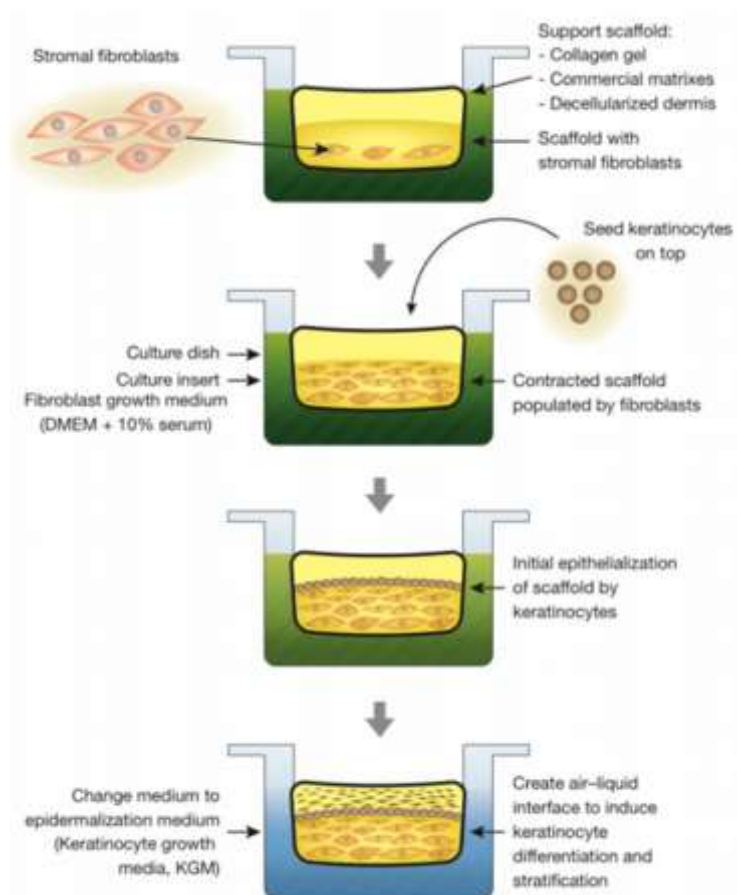
### 2.1 Les cultures cellulaires en monocouche

Les modèles les plus simples mimant la peau sont les cultures en monocouche de cellules, primaires ou provenant de lignées cellulaires.

L'isolation de fibroblastes et de kératinocytes primaires à partir de biopsies de peau humaine a été mise au point il y a plusieurs décennies (Hayflick and Moorhead 1961; Rheinwald and Green 1975). La culture de fibroblastes permet d'étudier les mécanismes de synthèse de la matrice extracellulaire du derme, mais également le rôle de ces cellules dans les processus de cicatrisation et de vieillissement cutané. La culture de kératinocytes est généralement utilisée pour modéliser l'épiderme et étudier la différenciation épidermique ainsi que la cicatrisation (Prunieras 1979; Haase et al. 2003; Deyrieux and Wilson 2007). Elle est plus difficile à réaliser que la culture de fibroblastes, car ces cellules se différencient rapidement, perdant leur capacité de division.

Afin d'étudier les interactions entre les différents types cellulaires et les mécanismes dépendant de ces interactions, des modèles de co-cultures ont également été développés. Les principaux modèles mis au point comprennent les co-cultures de kératinocytes et mélanocytes pour étudier la pigmentation de la peau (Lei et al. 2002), de kératinocytes et





**Figure 7. Procédé de développement d'un modèle de peau reconstruite.**

Les différentes étapes nécessaires à la fabrication d'un modèle de peau reconstruite sont représentées sur le schéma D'après Oh et al. 2013.

fibroblastes permettant l'étude des interactions entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses (Mujaj et al. 2010; Z. Wang et al. 2012), ou les co-cultures de kératinocytes et neurones pour étudier les fonctions sensorielles de la peau (Le Gall-Ianotto et al. 2012).

Ces différents modèles sont également utilisés en recherche préclinique dans le cadre de tests de cytotoxicité, ou d'évaluation de l'effet de composés. Par exemple, des modèles de coculture de kératinocyte et de mélanocytes ont permis d'évaluer l'effet de stimulants mélanogéniques tels que la MSH (Melanocyte-Stimulating Hormone) ou la 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) (Lei et al. 2002). Très faciles à mettre en œuvre, ils ne reproduisent en revanche pas la complexité et la structure en 3 dimensions de la peau.

## 2.2 Les modèles organotypiques

Le terme de modèle organotypique englobe 2 types de modèles différents : les modèles reconstruits et les cultures d'explants. Ces modèles, plus complexes, permettent de reproduire en partie la structure et certaines fonctions normales de la peau *in vivo* et de maintenir les propriétés des cellules qui les constituent, notamment grâce à leur organisation tridimensionnelle.

### 2.2.1 Les modèles reconstruits

Il existe différents types de modèles reconstruits, allant de l'épiderme ou du derme seul à des modèles de peau reconstruite.

Les dermes reconstruits sont obtenus en ensemençant des fibroblastes dans des matrices plus ou moins complexes, allant d'un simple réseau de fibres de collagène à des matrices commerciales développées spécifiquement pour cette application, jusqu'au derme désépidermisé et acellularisé, obtenu à partir d'une biopsie de peau (Oh et al. 2013; Mathes, Ruffner, and Graf-Hausner 2014). Ces modèles permettent d'étudier les interactions entre les cellules et leur matrice extracellulaire.

Les épidermes reconstruits (RHE, Reconstructed Human Epidermis) reproduisent la stratification différenciée observée au sein de la peau. Ils sont obtenus en cultivant des kératinocytes à l'interface air-liquide (Mathes, Ruffner, and Graf-Hausner 2014) et sont utilisés par exemple pour tester l'efficacité et la pénétration d'agents pharmacologiques ou le potentiel irritant de molécules (Kandárová et al. 2009; Tornier et al. 2010; Van Gele et al. 2011).

Les modèles de peau reconstruite combinent les 2 compartiments, le derme et l'épiderme. Ils sont produits en plusieurs étapes (**Figure 7**) : dans un premier temps, des fibroblastes sont ensemençés dans une matrice de la même façon que lors de la formation d'un derme



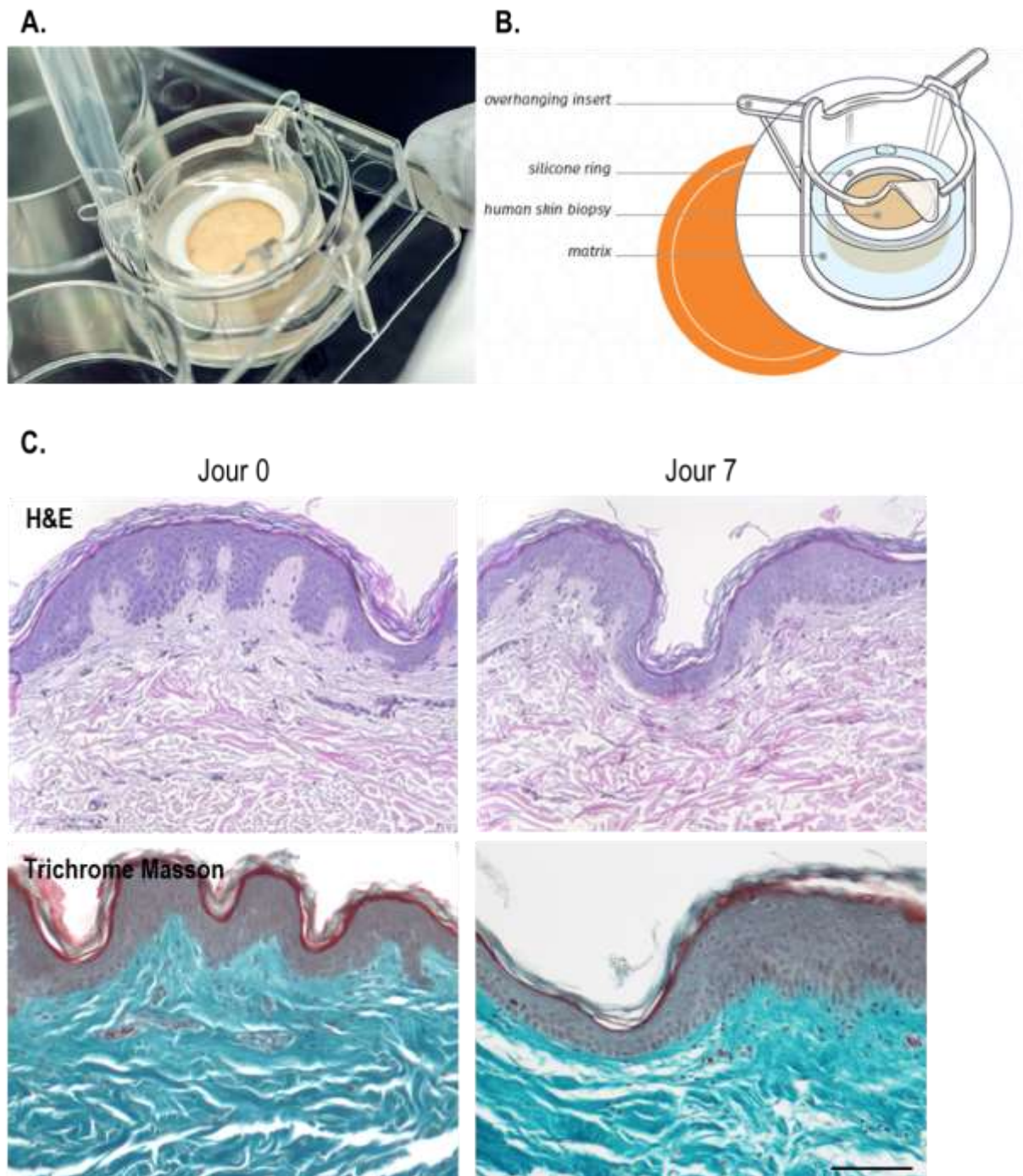
reconstruit. Après plusieurs jours de culture dans un milieu favorisant le développement des fibroblastes, des kératinocytes ou des feuillets épidermiques, séparés de biopsies de peau par digestion enzymatique, sont ensemencés ou déposés à la surface du derme équivalent. Le modèle est alors transféré dans un milieu favorisant la croissance des kératinocytes. Enfin, la différenciation stratifiée de l'épiderme est induite en maintenant la surface du modèle obtenu à l'interface air-liquide.

Ces modèles peuvent être encore complexifiés au moyen de l'ajout d'autres types cellulaires durant leur formation, tels que des mélanocytes, des cellules de Langerhans dérivées d'une lignée cellulaire ou des macrophages, des cellules endothéliales ou des adipocytes, afin d'obtenir des modèles pigmentés, immunocompétents, vascularisés ou comprenant un hypoderme respectivement (Mathes, Ruffner, and Graf-Hausner 2014).

Les modèles de peau reconstruite peuvent également être produits par bio-impression (V. Lee et al. 2014) : l'ensemencement des différents types cellulaires dans un hydrogel, généralement constitué d'un précurseur de collagène, se fait couche par couche de façon automatisée, à l'aide d'une bio-imprimante. Cette technique permet de produire des modèles avec une grande reproductibilité et en plus grand nombre que dans le cas d'un ensemencement manuel.

Les modèles de peau reconstruite, en se rapprochant de la complexité de la peau normale, permettent de réaliser des tests d'efficacité de molécules *in vitro* avec une réponse plus proche de celle observée *in vivo* que les modèles en 2 dimensions, via leur application dans le milieu de culture ou bien sur la surface de la peau (Sanquer et al. 1990). De façon plus générale, ils permettent d'étudier à la fois les interactions cellules-matrice et cellules-cellules dans un environnement tridimensionnel. Dans un autre contexte, ils trouvent également des applications en tant que substituts de peau en médecine régénérative (Bello, Falabella, and Eaglstein 2001).

Ces modèles possèdent en revanche de nombreuses limites (Lebonvallet et al. 2010; Mathes, Ruffner, and Graf-Hausner 2014). Ils sont d'une part longs et coûteux à mettre en œuvre (quelques semaines de culture dans des conditions spécifiques sont nécessaires pour obtenir un modèle possédant un épiderme entièrement stratifié). Ils ne se prêtent, d'autre part, pas à des études de la barrière cutanée ou de pénétration de composés, leur barrière étant plus perméable que celle de la peau normale (Schreiber et al. 2005; Schäfer-Korting et al. 2008). Enfin, ces modèles restent artificiels et ne reproduisent pas la complexité de la peau normale : l'ensemble des cellules présentes dans des conditions physiologique n'y est pas représenté, aucun ne contient d'annexes cutanées ou de pores, qui jouent un rôle dans la réponse et la résistance du tissu à un stimulus extérieur, la complexité de la matrice extracellulaire du derme n'est pas non plus reproduite fidèlement, et l'unique diffusion passive du milieu de culture dans les modèles limite la pertinence des résultats obtenus pour les tests



**Figure 8. Présentation du modèle de peau humaine ex vivo NativeSkin®.**

**A.** Photographie du modèle en culture.

**B.** Schéma des différents constituants du modèle.

**C.** Colorations Hématoxyline et Eosine et Trichrome de Masson réalisées à 0 et 7 jours de culture, reflétant la viabilité et l'intégrité de la peau ainsi que sa teneur en collagène. Données extraites du manuel d'utilisateur NativeSkin®.

d'efficacité ou de toxicité de molécules administrées par la voie systémique *in vivo* (Lebonvallet et al. 2010).

### 2.2.2 Les explants en culture et le modèle NativeSkin®

Les modèles d'explants de peau sont produits à partir de prélèvements de peau provenant d'opérations de chirurgie, telles que des abdominoplasties. Immédiatement après la récupération de ces échantillons, la peau est décontaminée, redimensionnée en biopsies de taille définie et dégraissée. Les explants de peau peuvent alors être mis en culture dans leur totalité, ou après séparation du derme et de l'épiderme selon l'application souhaitée (Lebonvallet et al. 2010).

A l'inverse des modèles de peau reconstruite, ces modèles sont facilement et rapidement utilisables.

Leur utilisation est en revanche dépendante du calendrier des chirurgies, et limitée aux jours qui suivent la récupération des prélèvements biologiques.

Le modèle NativeSkin® est un modèle d'explant de peau développé et commercialisé par la société Genoskin. Suite à la récupération de prélèvements de peau, provenant principalement de plasties abdominales, la peau est dégraissée puis recoupée à l'aide d'un emporte-pièce en biopsies de forme circulaire. Ces explants sont ensuite intégrés dans une matrice nourricière semi-solide à l'intérieur d'un insert de culture, qui est déposé dans une plaque multi-puits (**Figure 8**). La surface du modèle NativeSkin® est maintenue à l'interface avec l'air, permettant l'application topique de composés sur le modèle. Par ailleurs, un anneau de silicone, collé à la périphérie des explants, délimite une zone définie de traitement topique, et permet d'éviter la diffusion latérale des composés appliqués.

La caractérisation du modèle NativeSkin® a révélé la préservation de différentes caractéristiques d'une peau normale au cours de 7 jours de culture, telles que la structure histologique de l'épiderme et du derme, la teneur en collagène du derme, sa viabilité cellulaire et l'imperméabilité de sa barrière (De Wever, Kurdykowski, and Descargues 2015). En outre, les mélanocytes présents dans l'épiderme du modèle conservent leur capacité à produire de la mélanine après plusieurs jours de culture (Calapre et al. 2016), et des études ont révélé une certaine immunocompétence du modèle en culture, avec la présence de cellules de Langerhans dans l'épiderme et de lymphocytes T résidents dans le derme.

Différentes études réalisées sur ce modèle ont démontré sa pertinence dans le cadre de l'évaluation d'effets de molécules pharmaceutiques appliquées à sa surface (Norsgaard et al. 2014), mais également pour des études de défaut de barrière cutanée (Duracher et al. 2015), ou nécessitant la réalisation d'injections intradermiques (données non publiées).

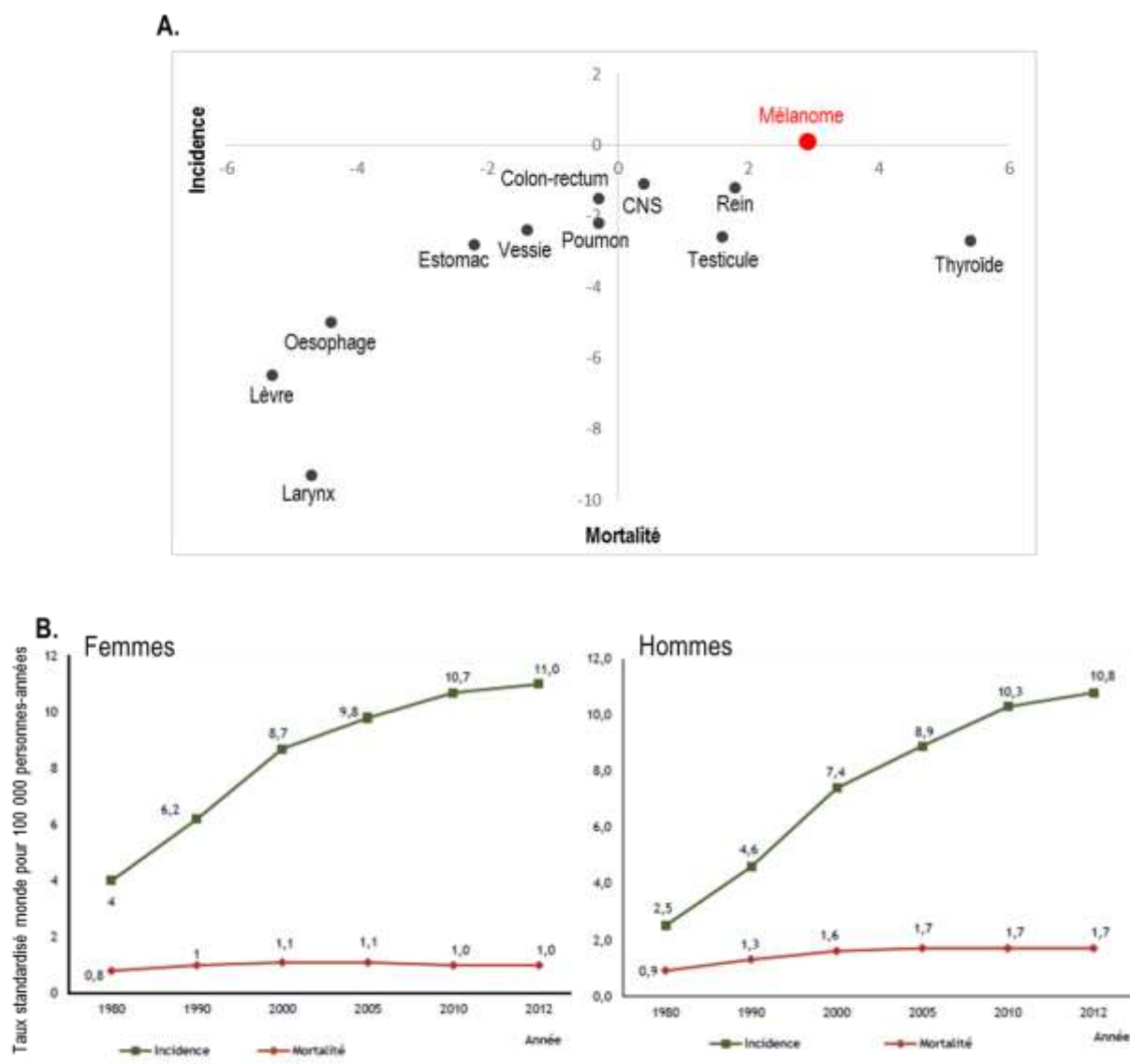


Ce type de modèle permet ainsi de se rapprocher au mieux des conditions *in vivo* et d'étudier la réaction de la peau dans son ensemble face à différents agents de stress ou traitements pharmacologiques.

Des limites similaires à celles observées dans les modèles de peau reconstruite sont cependant également associées au modèle d'explant, notamment celles liées à la culture statique des modèles (Lebonvallet et al. 2010; Mathes, Ruffner, and Graf-Hausner 2014).

Pour pallier cette limite, de nouvelles stratégies tendent à être développées, avec l'utilisation notamment de technologies de microfluidique pour recréer un environnement dynamique autour du tissu (Sakolish et al. 2016). L'application de ces techniques à la culture d'explants *ex vivo* s'est révélée pertinente pour reproduire des réactions similaires à celles observées *in vivo* lors de l'évaluation de la toxicité de composés pharmaceutiques (Abaci et al. 2015), et ouvre des perspectives en termes d'optimisation des recherches précliniques.





**Figure 9. Evolution des taux d'incidence et de mortalité du mélanome.**

**A.** Evolution des taux annuels moyens d'incidence et de mortalité de différents cancers entre 2005 et 2012 (d'après les chiffres de l'Institut de Veille Sanitaire actualisés en 2015).

**B.** Graphiques de l'évolution de l'incidence et de la mortalité du mélanome en France de 1980 à 2012 d'après rapport « Les cancers en France - 2015 » publié par l'Institut National du Cancer)

## Partie 2 : Le mélanome, développement et approches thérapeutiques

La peau peut être sujette à différentes pathologies, parmi elles différents cancers, dont l'incidence n'a fait que croître durant les dernières décennies. Il existe 3 types principaux de cancers cutanés : les carcinomes basocellulaires, les carcinomes spinocellulaires ou épidermoïdes, et les mélanomes.

Le carcinome basocellulaire se développe à partir des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme. Il représente 70% des cancers cutanés mais n'est que peu agressif : sa progression est lente et reste majoritairement locale, permettant son traitement par exérèse chirurgicale.

Le carcinome spinocellulaire, ou épidermoïde, est également un cancer des kératinocytes. Il se développe à partir des couches supérieures de l'épiderme. Cette forme de cancer ne représente que 20% des cancers cutanés, mais est plus agressive que le carcinome basocellulaire, avec le développement de métastases dans 2 à 10% des cas (selon les chiffres de Skin Cancer Foundation, actualisés en 2012). Elle reste cependant rarement mortelle.

Le mélanome est un cancer des mélanocytes. Il se classe au 19<sup>e</sup> rang des cancers les plus fréquents en 2012 (selon les chiffres de Globocan, International Agency for Research on Cancer). Bien que ne représentant que 10% des cancers de la peau, il est particulièrement agressif et est responsable de 75% des décès causés par un cancer de la peau. Par ailleurs, le mélanome est l'un des cancers dont les augmentations d'incidence et de mortalité sont les plus importantes depuis 1980, bien que cette croissance ralentisse depuis 2005 (**Figure 9**, d'après les chiffres de l'Institut de Veille Sanitaire actualisés en 2015)

Il existe 4 principaux types de mélanomes cutanés (Cummins et al. 2006, Données de l'Institut National du Cancer) :

- le mélanome superficiel extensif est la forme la plus fréquente de mélanome cutané chez les populations caucasiennes : il représente 70 à 80% des cas diagnostiqués. Cette forme de mélanome se développe majoritairement à partir de grains de beauté existants, autour d'une moyenne d'âge de 40 à 50 ans. Son apparition est liée à des expositions répétées et prolongées au soleil, en particulier au cours de l'enfance.
- le mélanome nodulaire représente 15 à 30% des mélanomes. Il s'agit de la forme la plus agressive de mélanome cutané, qui s'étend particulièrement rapidement en



profondeur. Ce mélanome se développe plus tardivement que le mélanome superficiel extensif, et indépendamment de grains de beauté existants dans la plupart des cas.

- le mélanome de Dubreuilh représente moins de 5% des mélanomes. C'est la forme la moins agressive de la pathologie, qui se développe principalement sur les zones particulièrement endommagées par des expositions au soleil, et atteint particulièrement des individus de plus de 70 ans.
- le mélanome acro-lentigineux ne représente que 5% des cancers cutanés mais touche particulièrement les populations aux phototypes plus pigmentés telles que les populations asiatiques, hispaniques et africaines. Parmi ces populations, cette forme de mélanome représente 35 à 65% des cas. Le mélanome acro-lentigineux se développe particulièrement au niveau des paumes de mains, des plantes de pieds et sous les ongles.

## 1. Facteurs de risque impliqués dans le développement du mélanome

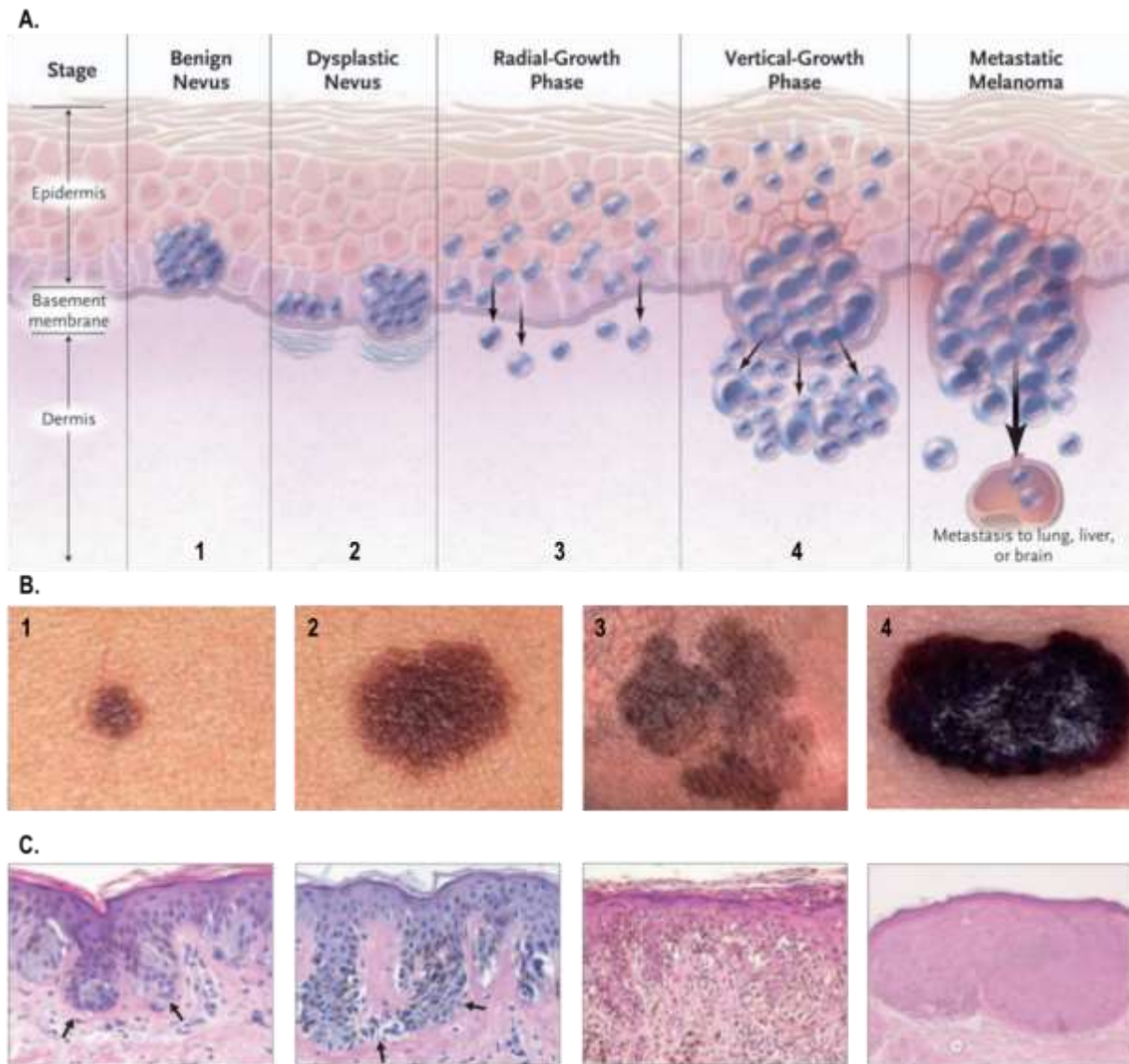
Le développement du mélanome est associé à différents facteurs de risque (Oliveria et al. 2006; Cummins et al. 2006; Armstrong et al. 2011; Lo and Fisher 2014).

### 1.1 Phototype cutané

Le phototype constitue l'un des principaux facteurs de risques pour le développement du mélanome : plus le phototype cutané est clair, plus le risque de développer un mélanome est important. Cette observation est généralement attribuée au fait que ces phénotypes présentent une protection aux radiations ultraviolettes réduite.

### 1.2 Présence de grains de beauté

De façon générale, environ 30% des mélanomes se développent à partir d'un grain de beauté (naevus) existant. La présence d'un nombre important de grains de beauté a été identifiée comme un facteur de risque, augmentant 7,6 fois le risque de développer un mélanome pour un individu présentant plus de 100 grains de beauté comparé à un individu en présentant moins de 10 (C. Garbe et al. 1994).



**Figure 10. Les étapes de progression du mélanome cutané.**

**A.** Schéma représentant les différentes phases de progression du mélanome cutané. **B.** et **C.** Photos macroscopiques et colorations Hématoxyline et Eosine réalisées sur des échantillons de nævus bénin (1), nævus dysplasique (2), phase de croissance radiale (3) et phase de croissance verticale (4). Adapté de Miller and Mihm 2006; Shain and Bastian 2016.

### 1.3 Prédispositions génétiques

L'hérédité représente également un facteur de risque important, impliqué dans environ 10% des cas de mélanome. Les individus présentant un parent ayant contracté un mélanome a 50% de risques supplémentaire d'en développer un également (Cummins et al. 2006).

Différentes mutations héréditaires ont été identifiées comme étant impliquées dans les cas de mélanome familiaux. Parmi celles-ci, la mutation du gène CDKN2A est la plus courante, retrouvée dans 25 à 40% des cas de mélanome familiaux (Hayward 2003; Aoude et al. 2015). Ce gène code pour 2 protéines, p16INK4A et p14ARF, ayant été identifiées comme des protéines suppresseur de tumeurs et intervenant dans la régulation du cycle cellulaire. D'autres mutations héréditaires beaucoup plus rares ont également été identifiées comme étant impliquées dans les cas de mélanome familiaux, telles que des mutations de CDK4, MITF, BAP1, du promoteur TERT ou encore du récepteur MC1R, associé à la pigmentation de la peau (Chin 2003; Aoude et al. 2015).

### 1.4 Exposition aux ultraviolets

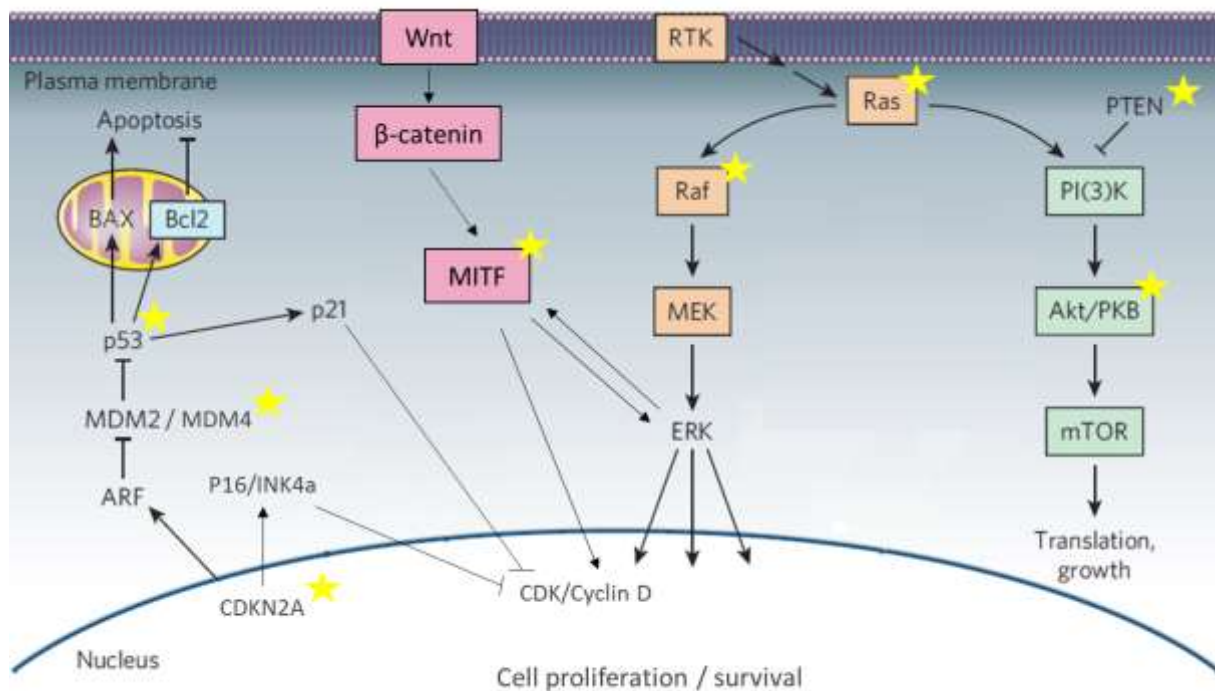
Les ultraviolets, au travers de l'exposition au soleil ou l'utilisation de cabines de bronzage, engendrent des dommages à l'ADN au niveau de la peau. L'exposition à ces rayonnements représente l'un des facteurs favorisant le développement d'un mélanome : différentes études épidémiologiques ont révélé que des coups de soleil répétés, et particulièrement au cours de l'enfance, augmentent le risque de développer un mélanome (Cummins et al. 2006; Oliveria et al. 2006; Newton-Bishop et al. 2011).

## 2. Développement de la pathologie

### 2.1 Les étapes de progression du mélanome

La progression du mélanome est généralement décrite comme un procédé linéaire divisé en 5 étapes, défini pour la première fois par Clark en 1991 (W. H. Clark 1991; Hsu, Meier, and Herlyn 2002; Miller and Mihm 2006; Gaggioli and Sahai 2007) (**Figure 10**).

Le naevus (communément appelé grain de beauté) est la première manifestation de prolifération aberrante des mélanocytes. La majorité des naevi est acquise durant les 20 premières années de vie d'un individu et reste des lésions bénignes, qui ne donnent pas lieu au développement d'un mélanome. Certains naevi atypiques présentent un degré de dysplasie élevé. Seule une faible proportion d'entre eux peut représenter une lésion précurseur et donner lieu à un mélanome.



**Figure 11. Les principales voies de signalisation impliquées dans le développement du mélanome.**

Schéma représentant les principales voies de signalisation dérégulées au cours du développement du mélanome. Les étoiles jaunes représentent les mutations les plus fréquentes. Adapté de Gray-Schopfer, Wellbrock, and Marais 2007.

Voie de signalisation	Mutation	Fréquence de mutation
MAPK	BRAF	50-70%
	NRAS	15-30%
PI3K	PTEN	25-30%
	AKT	60%
p53	MDM4	65%
	CDKN2A	16-41%
	TP53	10-20%
Wnt / $\beta$ -caténine	MITF	20%

**Tableau 1. Fréquences d'occurrence des principales mutations intervenant dans le développement du mélanome.**

D'après Shtivelman et al. 2014.



La phase de croissance radiale (RGP, Radial Growth Phase) est définie comme le premier stade malin de la pathologie. Durant cette phase, l'invasion des mélanocytes se fait latéralement et principalement dans l'épiderme, bien que des micro-invasions du derme puissent également être localement observées. Cette étape peut également être désignée par le terme de mélanome *in situ* (Shain and Bastian 2016).

Durant la phase de croissance verticale (VGP, Vertical Growth Phase), ou mélanome invasif, les cellules tumorales envahissent les couches plus superficielles de l'épiderme ainsi que le derme et le tissu sous-cutané. La transition vers cette phase est associée à l'augmentation de la vascularisation des lésions et l'acquisition d'un potentiel métastatique (Gaggioli and Sahai 2007).

Enfin, durant la dernière phase de croissance métastatique, les cellules se disséminent au-delà du site de la tumeur primaire et colonisent d'autres tissus. Les premières métastases apparaissent au niveau des ganglions lymphatiques avant d'envahir plus tardivement d'autres sites de la peau et des organes distants tels que les poumons, le foie ou le cerveau.

Le développement du mélanome par chacune de ces phases n'est pas systématique, et son schéma de progression peut être associé à son type (Gray-Schopfer, Wellbrock, and Marais 2007; Shain and Bastian 2016) :

- dans le cas d'un mélanome lié à une exposition chronique au soleil, le mélanome *in situ* se développe directement à partir de mélanocytes isolés sans être associé à une lésion précurseur telle qu'un naevus ;
- le mélanome nodulaire apparaît généralement soudainement et n'est associé à aucune lésion précurseur, présentant immédiatement un caractère invasif.
- environ 4% des mélanomes se caractérisent par l'apparition de métastases sans qu'aucune tumeur primaire ne soit identifiée.

## 2.2 Voies de signalisation cellulaire impliquées dans le développement du mélanome

Différentes voies de signalisation sont dérégulées dans le mélanome au-travers de la surexpression ou de l'inhibition de l'expression de certains de leurs effecteurs (**Figure 11**). Ces mutations génétiques ou modifications épigénétiques contribuent au développement de la pathologie. Les principales voies dérégulées dans le cas du mélanome sont impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire, l'apoptose et la sénescence. Ces voies et les principales mutations responsables de leur dérégulation dans le cas du mélanome sont résumées dans le **Tableau 1**.



### 2.2.1 La voie des MAPK

La voie des Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) est située en aval d'un récepteur tyrosine kinase (RTK) et suit une cascade d'activation RAS/RAF/MEK/ERK. Elle est impliquée dans le contrôle de la survie et de la prolifération cellulaires. La signalisation par cette voie joue un rôle particulièrement important dans le développement du mélanome : elle est en effet hyperactivée dans 90% des cas (Shtivelman et al. 2014). Cette activation est liée à différentes mutations, qui conduisent à l'activation constitutive de la voie et la perte du contrôle de la prolifération cellulaire.

Les mutations de BRAF, codant pour une sérine / thréonine kinase impliquée dans la voie, sont les plus récurrentes (**Figure 11**) : elles sont retrouvées dans 50 à 70% des mélanomes. Parmi ces mutations, la substitution d'un acide glutamique par une valine à la position 600 (V600E) est la plus commune, et elle est majoritairement retrouvée dans les mélanomes se développant sur des régions non exposées au soleil de façon chronique (Shain and Bastian 2016). D'autres mutations de BRAF existent, (par exemple V600K, K601E, ...) et sont associées à des lésions se développant sur des zones exposées au soleil de façon chronique. Les mutations de BRAF sont également présentes dans des naevi bénins, suggérant qu'elles interviennent précocement dans le développement du mélanome, mais ne suffisent pas à elles seules à sa progression (Poynter et al. 2006).

Une autre mutation communément retrouvée dans la voie est la mutation de NRAS, dans 15 à 30% des mélanomes. Les mutations de NRAS et BRAF sont mutuellement exclusives.

### 2.2.2 La voie PI(3)K

La voie des Phosphoinositide 3-kinase (PI(3)K) est également située en aval d'un récepteur RTK. Sa signalisation est impliquée dans la régulation de la survie et de la prolifération cellulaires, mais également de la motilité des cellules (Gray-Schopfer, Wellbrock, and Marais 2007). Cette voie est fréquemment hyperactivée dans les phases les plus tardives du développement du mélanome (Vredeveld et al. 2012). Différentes mutations et modifications épigénétiques en sont à l'origine : la perte de fonction du suppresseur de tumeur PTEN, partagée par 25 à 30% des mélanomes, ou encore la surexpression de la protéine kinase B (PKB / AKT) dans 60% des mélanomes, sont les plus courantes.

Les mutations de NRAS et PTEN sont exclusives, tandis que d'autres mutations peuvent être cumulées, telles que celles de BRAF et PTEN, dans environ 20% des cas de mélanome.

### 2.2.3 Les récepteurs tyrosine kinase (RTK)

Des mutations affectant les récepteurs RTK en amont des voies MAPK et PI(3)K ont été également identifiées de façon moins courante dans le cas du mélanome cutané, conduisant à une activation de ces voies de signalisation (Damsky, Theodosakis, and Bosenberg 2014; Shtivelman et al. 2014). Les plus courantes touchent des récepteurs de facteurs de croissance tels que c-Kit et MET, qui sont hyperactivés, ou NF1, un inhibiteur de la voie des MAPK, qui est inactivé (Lo and Fisher 2014; Shtivelman et al. 2014).

### 2.2.4 La voie p53

La voie p53 est impliquée dans le contrôle de l'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire. Fréquemment mutée dans d'autres cancers, elle ne l'est que dans 19% des tumeurs de mélanomes (Hodis et al. 2012).

La principale mutation responsable de l'inactivation de cette voie est l'amplification de MDM4, une protéine induisant la dégradation et l'inactivation de p53, dans 65% des cas.

Des délétions du locus CDKN2A sont par ailleurs associées à 16 à 41% des mélanomes, entraînant l'inhibition de la transcription du gène suppresseur de tumeur p14ARF et l'inhibition de l'expression de TP53.

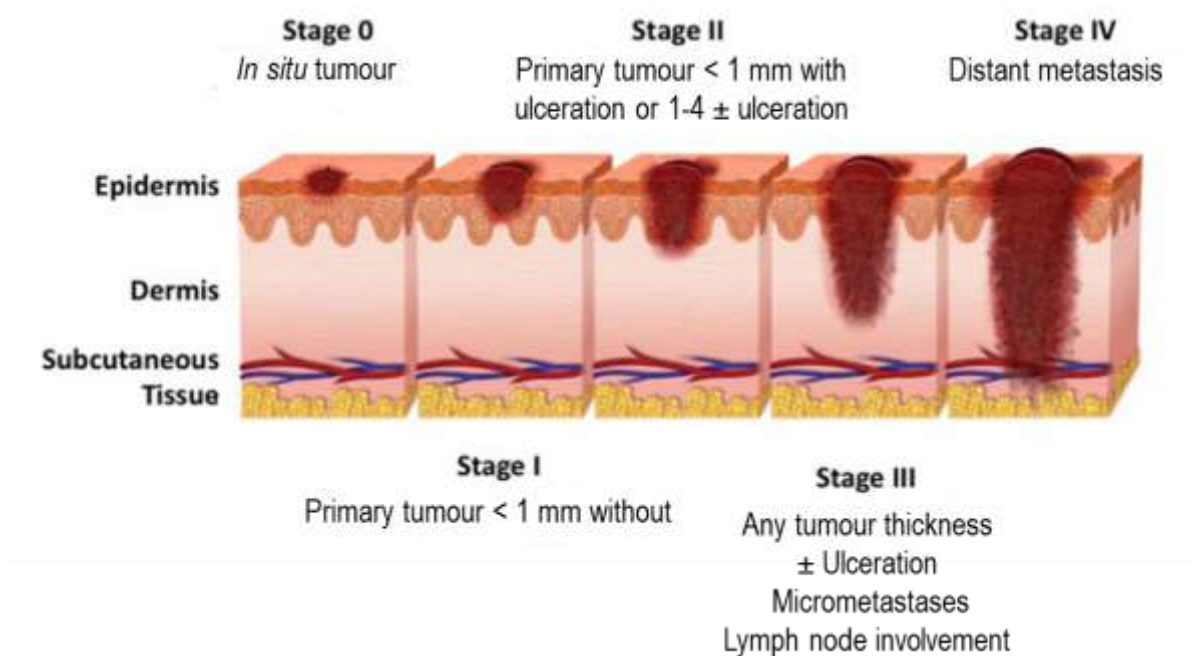
Enfin, le gène codant pour la protéine p53 est également muté dans 10 à 20% des cas.

### 2.2.5 La voie Wnt/ $\beta$ -caténine

La voie de signalisation Wnt est activée dans un tiers des mélanomes, comme l'indique l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans le noyau des cellules (Lo and Fisher 2014). Cette voie canonique est impliquée dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires, et pourrait jouer un rôle dans l'invasion des cellules de mélanome (Shtivelman et al. 2014).

Le facteur de transcription MITF, impliqué dans la différenciation des mélanocytes, est un des effecteurs de la voie Wnt. Son expression est amplifiée dans environ 20% des mélanomes et son niveau d'expression semble être inversement proportionnel à la survie des patients. Cependant, son rôle exact n'est pas encore compris dans le développement du mélanome (Palmieri et al. 2009).

Outre ces différentes voies de signalisation, des mutations sont très fréquemment observées au niveau de régions régulatrices de l'activité de la télomérase (Shtivelman et al. 2014). Celles-ci, présentes dans 33% de tumeurs primaires et 85% de tumeurs métastatiques



**Figure 12. Les différents stades cliniques de progression du mélanome.**

Le stade de progression est défini en fonction de critères cliniques basés sur la profondeur de la tumeur, la présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques et de métastases distantes.

Adapté de [www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/melanoma/treatment/stages-of-melanoma](http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/melanoma/treatment/stages-of-melanoma) et Garbe et al. 2010.

Stade I	Stade II	Stade III	Stade IV
95-100%	65-92%	41-71%	19%

**Tableau 2. Taux de survie à 5 ans associés au stade de progression au moment du diagnostic.**

D'après Svedman et al. 2016.

(Horn et al. 2013), entraînent une augmentation de la transcription des gènes en aval du promoteur TERT, et ainsi une perte de la sénescence des cellules cancéreuses.

De nombreuses autres voies de signalisation peuvent être également dérégulées durant le développement du mélanome, à des fréquences cependant plus faibles que les principales voies détaillées ci-dessus (Shtivelman et al. 2014).

### 3. Traitement du mélanome

En clinique, différents systèmes de classification permettent d'identifier le stade de développement de la tumeur et d'associer à chacun un pronostic (Claus Garbe et al. 2010).

Ces systèmes reposent sur différents critères :

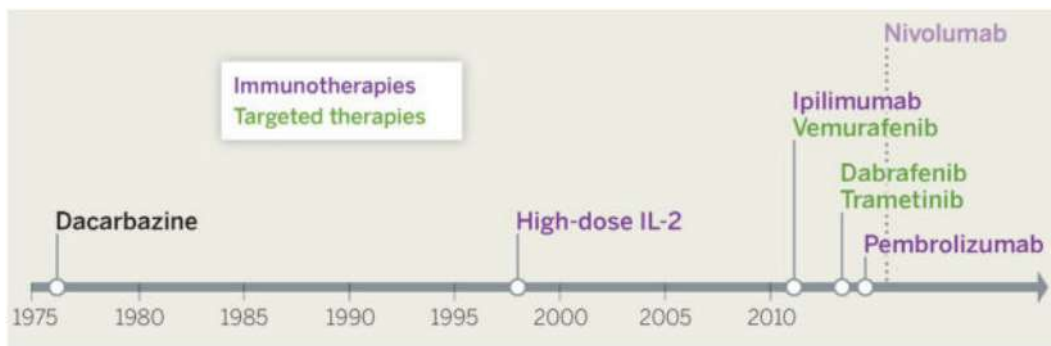
- les caractéristiques de la tumeur primaire, notamment son épaisseur (indice de Breslow) et son degré d'ulcération ;
- la présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques, et notamment le nombre de ganglions touchés et le type de métastases (micro- ou macrométastases) ;
- l'existence de métastases distantes, caractérisée par le type de tissu envahi.

4 stades de progression du mélanome sont définis à partir de ces différents critères (**Figure 12**) :

- les stades I et II correspondent au stade de mélanome *in situ*, décrit dans la section précédente, avec des indices de Breslow plus ou moins importants ;
- le stade III correspond au stade de mélanome invasif, avec invasion plus ou moins importante des ganglions lymphatiques ;
- le stade IV correspond au stade de mélanome métastatique, avec présence de métastases dans les organes distants.

Un pronostic de la survie des patients peut être établi à partir du stade de progression du mélanome au moment de son diagnostic (**Tableau 2**). Les stades I et II sont associés à de bons pronostics, avec respectivement 95-100% et 65-92% de survie à 5 ans. 90% des mélanomes sont diagnostiqués durant ces premiers stades (Tsao, Atkins, and Sober 2004). L'espérance de vie à 5 ans des patients diagnostiqués avec un mélanome de stade III est comprise entre 41 et 71%, tandis que celle des patients diagnostiqués avec un mélanome de stade IV est d'environ 19% (Svedman et al. 2016).

La stratégie de traitement du mélanome dépend de son stade de progression au moment de son diagnostic.



**Figure 13. Evolution des traitements approuvés par la FDA pour le mélanome métastatique.**

Entre 1976 et 2011, la chimiothérapie basée sur la dacarbazine et l'immunothérapie avec de hautes doses d'IL-2 étaient les seuls traitements approuvés par la FDA pour le traitement du mélanome métastatique. Le nombre d'agents approuvés a plus que triplé au cours des 5 dernières années, avec l'approbation de différentes immunothérapies et thérapies ciblées. D'après Lo and Fisher 2014.

### 3.1 Traitement des mélanomes de stades I à III

Le traitement des mélanomes de stades I à III repose tout d'abord sur l'exérèse chirurgicale de la lésion, entourée d'une marge de tissu sain de largeur déterminée en fonction de l'indice de Breslow de la tumeur.

L'exérèse du ganglion sentinelle peut également être pratiquée dans le cas d'une tumeur profonde. En cas de détection de métastases, le curage total des ganglions lymphatiques localisés dans la zone de drainage de la tumeur primaire est réalisé (Claus Garbe et al. 2010).

Dans le cas des mélanomes de stades II avancés et III, présentant un haut risque de rechute, l'immunothérapie est utilisée en complément de la chirurgie en tant que thérapie adjuvante. L'injection de l'interféron alpha 2b (IFN) est un traitement approuvé par la FDA pour les stades II et III. Il s'agit d'une immunothérapie non spécifique, visant à stimuler le système immunitaire du patient. Utilisé à fortes doses, il permet d'allonger la durée de vie des patients, sans toutefois améliorer leur survie globale. Il présente par ailleurs une toxicité élevée (Claus Garbe et al. 2011).

### 3.2 Traitement des mélanomes de stade IV

Le mélanome est associé à un mauvais pronostic s'il est métastatique au moment de sa détection : seulement 16% des patients survivent plus de 5 ans (Freeman-Keller et al. 2016). Pendant des décennies, les traitements de référence du mélanome métastatique ont reposé sur la chimiothérapie et l'immunothérapie avec l'interleukine 2. Les réponses à ces différents traitements restent cependant limitées.

Depuis quelques années, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été développées dans les domaines de l'immunothérapie et de la thérapie ciblée, permettant d'améliorer la survie des patients (**Figure 13**).

#### 3.2.1 *La chimiothérapie*

La chimiothérapie repose sur l'utilisation d'agents cytotoxiques pour inhiber de façon non spécifique la prolifération des cellules saines et cancéreuses. Le principal agent chimiothérapeutique utilisé dans le cas du mélanome est la dacarbazine. Cet agent alkylant est le seul composé approuvé par la FDA pour cette pathologie (Shah and Dronca 2014). Le taux de réponse objective à ce traitement est de 12%, avec un taux de réponse à long terme de seulement 1 à 2% (Claus Garbe et al. 2011).



Le temozolomide est un analogue de la dacarbazine. Des études de phase III ont révélé une efficacité comparable à celle de la dacarbazine avec une toxicité moindre (Middleton et al. 2000). Bien que ce traitement ne soit pas approuvé par la FDA, il est utilisé comme thérapie dans le cas du mélanome.

De nombreux autres composés chimiothérapeutiques ont été testés dans le cas du mélanome, tels que différents nitrosourées (lomustine, fotemustine), des analogues de platine (carboplatine et cisplatine), des alkaloïdes et des taxanes (paclitaxel, docetaxel). Ces composés, administrés seuls ou combinés, ont révélé des activités anti tumorales mais n'apportent pas de meilleurs résultats que la dacarbazine en termes de survie globale (Claus Garbe et al. 2011).

La chimiothérapie reste donc un soin palliatif dans le cas du mélanome métastatique.

### 3.2.2 L'immunothérapie

- L'interleukine-2

L'interleukine 2 (IL-2) est la première immunothérapie développée dans le cas du mélanome approuvée par la FDA. L'administration à fortes doses de cet immunomodulateur non spécifique a permis d'obtenir un taux de réponse de 16% dans des essais cliniques de phase II, et une réponse complète à long-terme pour 5% des patients (Claus Garbe et al. 2011). Cette thérapie ne permet toutefois pas d'améliorer la survie globale des patients et est associée à une toxicité sévère.

Des stratégies de biochimiothérapies, basées sur la combinaison d'agents chimiothérapeutiques et d'IL-2 ou d'interféron alpha, ont également été testées mais n'ont pas permis d'améliorer la survie des patients de façon significative (Claus Garbe et al. 2011).

- Les anticorps monoclonaux anti CTLA-4 et PD-1

Plus récemment, des approches d'immunothérapie basée sur l'inhibition des points de contrôle de la réponse immunitaire ont été développées, pour empêcher l'inhibition de l'activation des cellules T et ainsi permettre de maintenir des réponses immunitaires face aux antigènes des cellules tumorales (Shah and Dronca 2014; Lo and Fisher 2014).

L'activation des cellules T repose sur la combinaison de 2 facteurs co-stimulants : la reconnaissance d'un antigène à la surface des cellules cancéreuses d'une part et une interaction entre la cellule T et la cellule cancéreuse d'autre part. Ce mécanisme est inhibé par compétition par CTLA-4 et PD-1, deux récepteurs présents à la surface des cellules T qui reconnaissent également les antigènes présents à la surface des cellules cancéreuses et modulent la réponse immunitaire.





Des anticorps monoclonaux dirigés contre CTLA-4 (ipilimumab, tremelimumab) et PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) ont été développés pour bloquer les interactions de ces récepteurs avec les antigènes des cellules cancéreuses et ainsi empêcher l'inhibition de l'activation des cellules T (**Figure 14**).

Les thérapies basées sur l'utilisation de ces anticorps se sont révélées particulièrement efficaces, avec des taux de réponse objective de l'ordre de 10% pour l'ipilimumab et de 28% pour le nivolumab (Freeman-Keller et al. 2016), et des réponses durables (Hodi et al. 2010). Des effets secondaires sont observés, mais restent réversibles et moins importants que ceux observés lors du traitement avec l'IL-2 (Lo and Fisher 2014).

Les anticorps dirigés contre PD-1 s'avèrent particulièrement efficace, et de nouvelles immunothérapies basées sur le blocage de ce récepteur sont en cours de développement (Freeman-Keller et al. 2016).

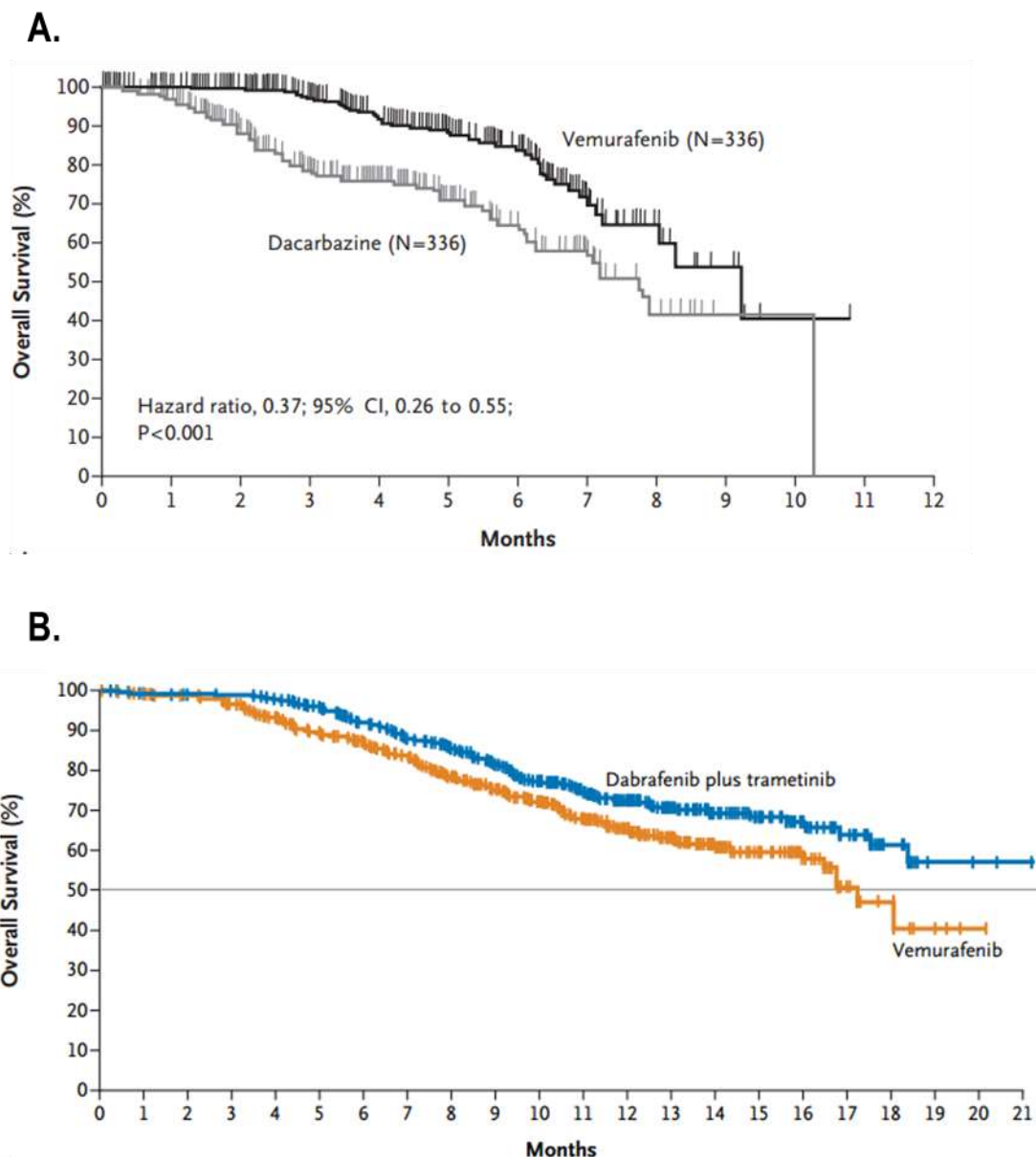
- Les thérapies ciblées

Une avancée majeure dans le traitement du mélanome métastatique repose sur le développement de thérapies ciblant les effecteurs des voies de signalisation particulièrement mutées et/ou dérégulées dans le cas du mélanome. Au cours des dernières années, un nombre important de stratégies a été développé pour cibler les différents effecteurs de ces voies (Shtivelman et al. 2014) (**Figure 15**).

Comme évoqué précédemment, la voie des MAPK est particulièrement fréquemment dérégulée dans le cas du mélanome. De nombreux inhibiteurs ont été développés pour cibler les différents effecteurs de cette voie, notamment dans le cas de mutations de BRAF V600. Le vemurafenib (PLX4032), un inhibiteur de la kinase B-Raf, permet d'améliorer la survie des patients porteurs de la mutation V600E avec un taux de réponse de 48% (Chapman et al. 2011). Le dabrafenib (PLX4720) est un autre inhibiteur de B-Raf. Les essais cliniques conduits sur cette molécule ont montré un taux de réponse de 59% chez les patients portant les mutations V600E/K, et 7% de réponses totales (Ascierto et al. 2013).

Des inhibiteurs de MEK ont également été développés, tels que le trametinib, qui a montré des résultats positifs sur l'amélioration de la survie générale et de la survie sans progression chez des patients porteurs de mutations BRAF V600E ou K (Flaherty et al. 2012).

Différents inhibiteurs de récepteurs à tyrosine kinase (imatinib), de NRAS (tipifarnib, lonafarnib) ou de la voie PI3K/AKT (perifosine, temsirolimus) ont été développés, mais aucun d'eux n'a jusqu'à présent montré d'efficacité ou de réponse objective en tant que monothérapie (Ernst et al. 2005; Fecher et al. 2007; Eggermont and Robert 2011; Shtivelman et al. 2014).



**Figure 16. Amélioration de la survie des patients traités avec des thérapies ciblées.**

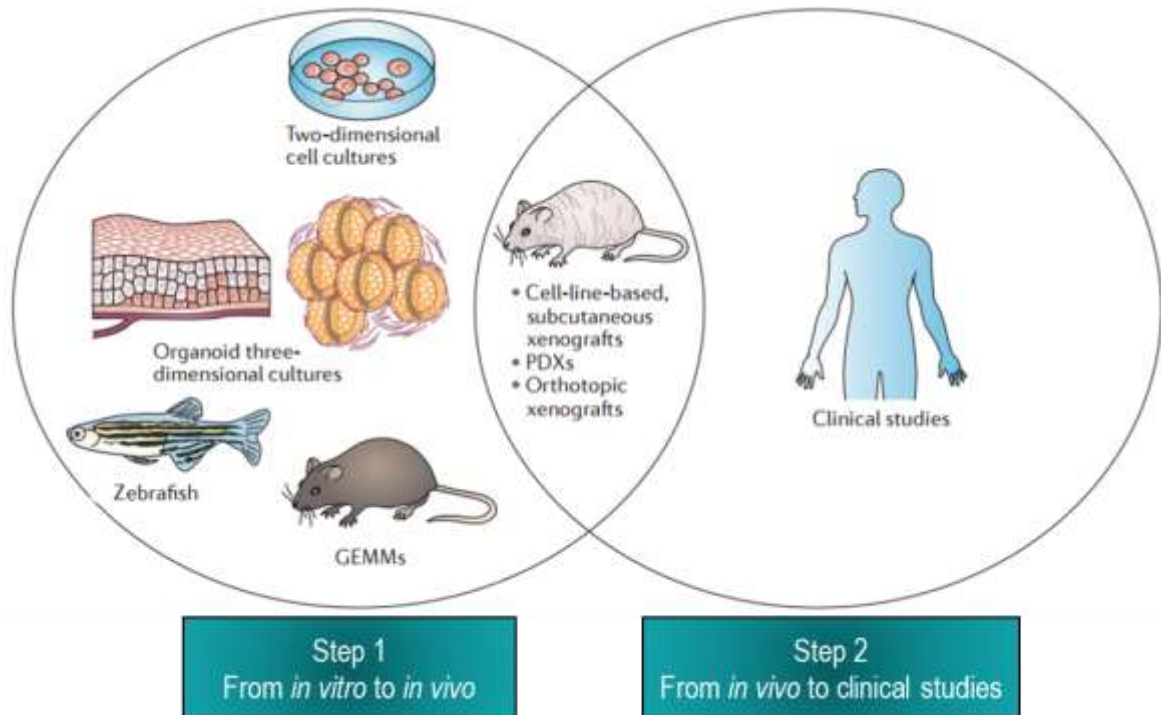
**A.** Courbes de survie globale de patients pendant traitement au vemurafenib ou à la dacarbazine durant des essais cliniques de phase III. Tiré de Chapman et al. 2011.

**B.** Courbes de survie globale des patients pendant traitement au vemurafenib ou avec une combinaison du dabrafenib, un inhibiteur de BRAF, et du trametinib, un inhibiteur de MEK, durant des essais cliniques de phase III. D'après Robert et al. 2015.

Le développement des thérapies ciblées s'est révélé particulièrement efficace et encourageant dans le traitement du mélanome : le vemurafenib a permis d'améliorer la survie globale des patients porteurs de la mutation BRAF<sup>V600</sup> (84% contre 63% après 6 mois) ainsi que leur survie sans progression par rapport à la dacarbazine (**Figure 16.A**) (Chapman et al. 2011). Des résultats similaires ont été obtenus avec le dabrafenib (Hauschild et al. 2012). Cependant, l'efficacité de ces thérapies est limitée aux patients porteurs de mutation de BRAF V600, et ne produisent pas d'effets durables : des mécanismes de résistance à ces différentes drogues sont systématiquement observés après plusieurs mois de thérapie (Lo and Fisher 2014).

Ces mécanismes de résistances peuvent être intrinsèques et prédits, ou acquis au cours du traitement initial. Parmi ces mécanismes, l'expression de BCL2A1, de la cycline D1 et la perte de PTEN semblent être impliqués dans la résistance intrinsèque aux inhibiteurs de la voie des MAPK (Paraiso et al. 2011; Haq et al. 2013; Lo and Fisher 2014). Les phénomènes de résistances acquises sont également très souvent liés à la réactivation de la voie des MAPK ou à l'activation de la voie PI3K, au-travers de mutations de MEK, de la perte de NF1 ou de mutations de NRAS ou de RTK (Nazarian et al. 2010).

Face à ces résistances, des stratégies reposant sur la combinaison d'inhibiteurs de RAF et MEK, ou de RAF et NRAS sont en cours d'étude et permettent d'améliorer la survie globale des patients (**Figure 16.B**). Cependant, ils ne permettent jusqu'à présent pas d'empêcher le développement de résistances et la rechute des patients de façon durable (Flaherty et al. 2012; Robert et al. 2015).



**Figure 17. Les différents modèles d'étude préclinique.**

Ce schéma reprend les principaux modèles d'étude précliniques du existants et utilisés pour étudier le mélanome. GEMM : Genitically Engineered Mouse. Adapté de de Jong, Essers, and van Weerden 2014.

## Partie 3 : Les modèles d'étude précliniques du mélanome

Pour développer des solutions permettant de dépasser les limites actuelles des traitements sur le court-terme, l'élargissement des connaissances globales de la biologie du mélanome est indispensable.

Le développement de nouvelles stratégies nécessite l'utilisation de modèles d'étude précliniques fiables, permettant d'acquérir à la fois une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance aux traitements thérapeutiques et une bonne prédictibilité de la réponse à ces traitements avant leur passage en phase de recherche clinique.

Pour cela, des modèles reproduisant le plus fidèlement possible le développement du mélanome sont nécessaires. Différents modèles ont été développés et sont utilisés pour étudier le mélanome (**Figure 17**). Ces modèles *in vitro* et *in vivo*, de degrés de complexité différents, reproduisent avec plus ou moins de fidélité les différentes composantes impliquées dans le développement du mélanome.

### 1. Les modèles *in vitro*

#### 1.1 Les cultures cellulaires en deux dimensions

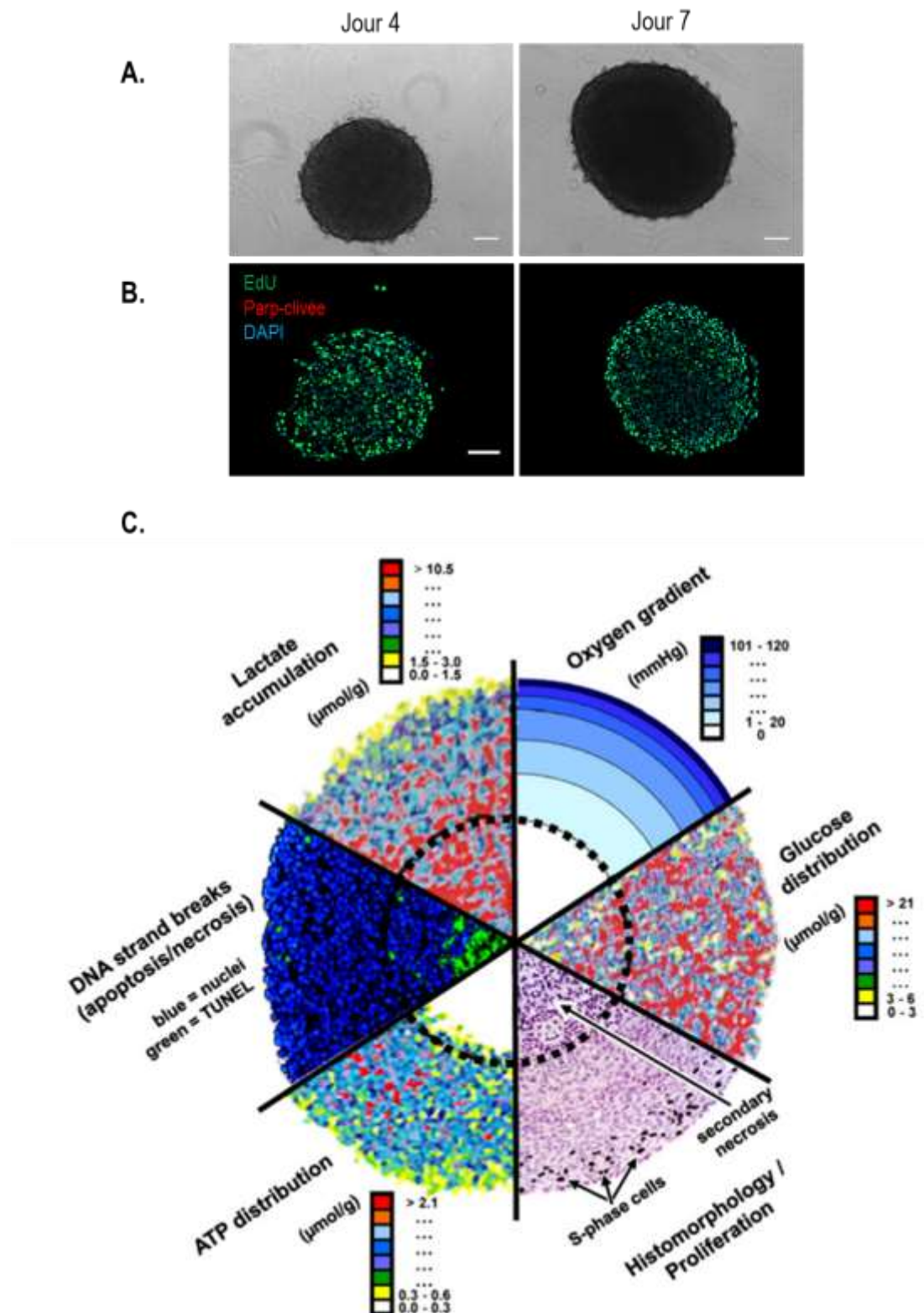
La culture de cellules en monocouche représente le modèle le plus simple pour étudier le mélanome.

Un nombre particulièrement important de lignées cellulaires de mélanome a été établi par différents laboratoires, à partir de prélèvements de tumeurs primaires, telle que la lignée WM-115 par exemple, ou de métastases, telles que les lignées WM-266-4 et A375. On recense ainsi plus de 5000 lignées de mélanomes établies, dont 200 caractérisées en termes de mutations génétiques, d'expression génique et de propriétés biologiques (M. Herlyn and Fukunaga-Kalabis 2010).

Les cultures cellulaires en deux dimensions sont des modèles faciles à produire et ont été développées pour permettre de réaliser rapidement des criblages de drogues (Eagle and Foley 1958; Hickman et al. 2014). Dans le cas du mélanome, ce type de modèle a également permis d'expliquer l'activité spécifique du vemurafenib sur les mélanomes présentant une mutation de BRAF (Poulikakos et al. 2010; Hatzivassiliou et al. 2010), et de mettre en évidence et comprendre des mécanismes de résistance (Nazarian et al. 2010).

Différents tests d'invasion et de migration, tels que la chambre de Boyden, ont également été développés à partir de ces modèles pour évaluer le potentiel métastatique de cellules cancéreuses ou l'effet de différents facteurs sur ces critères





**Figure 18. Caractéristiques du modèle du sphéroïde multicellulaire.**

**A.** Images en lumière transmise d'un sphéroïde de WM-266-4 après 4 et 7 jours de culture. **B.** Images en fluorescence de coupes à congélation de sphéroïdes de WM-266-4 après 4 et 7 jours de culture. L'incorporation d'EdU (vert) montre les cellules prolifératives, l'immunomarquage de la Parp-clivée (rouge) montre les cellules apoptotiques, et la contre-coloration au DAPI (bleu) indique les noyaux. Barres d'échelle : 100  $\mu$ m. **C.** Combinaison d'images analytiques de sections de sphéroïdes étudiées avec différentes technologies, reflétant les différentes caractéristiques de l'hétérogénéité cellulaire du modèle. D'après Hirschhaeuser et al. 2010.

(Stahl and Mueller 1994; Tsuji et al. 2002). Une étude a par exemple montré que des facteurs produits par des cellules de l'épiderme telles que la laminine-5 ou l'intégrine  $\alpha$ -3- $\beta$ -1 induisaient une augmentation de la motilité des cellules tumorales dérivées de mélanome métastatique (Tsuji et al. 2002).

Ces modèles présentent cependant de nombreuses limites : les conditions de culture de ces cellules, sur un support rigide et dans des milieux définis, sont éloignées de leur contexte physiologique. Les cellules sont dissociées de leur microenvironnement, les interactions cellules-cellules et avec d'autres types cellulaires sont limitées, conduisant ces modèles à développer des caractéristiques propres, éloignées de leurs caractéristiques originelles (M. Herlyn and Fukunaga-Kalabis 2010; Hickman et al. 2014).

Pour ces différentes raisons, ces modèles sont souvent peu prédictifs de l'efficacité de drogues en conditions cliniques.

## 1.2 Les modèles cellulaires en trois dimensions

Afin de se rapprocher des conditions dans lesquelles les tumeurs se développent dans leur environnement, des modèles en trois dimensions se sont développés. Ces modèles, de différentes natures, permettent de reproduire l'organisation tridimensionnelle et les caractéristiques d'une tumeur, ou même d'intégrer cette tumeur à un microenvironnement, afin d'étudier son évolution dans un système tendant à se rapprocher de celui dans lequel elle se développe *in vivo*.

### 1.2.1 Le modèle du sphéroïde multicellulaire

Le modèle du sphéroïde multicellulaire est actuellement admis comme reproduisant l'architecture tri-dimensionnelle et les interactions cellulaires d'un micro-domaine tumoral et son intérêt en pharmacologie anti-tumorale a été démontré par de nombreuses publications (pour revue Hirschhaeuser et al. 2010).

Ce modèle reproduit différentes caractéristiques de l'architecture d'une tumeur *in vivo* (Hirschhaeuser et al. 2010) (**Figure 18**) : au cours de sa croissance, des gradients décroissants d'oxygène et de nutriments se mettent en place de sa périphérie vers le centre. La mise en place de ces différents gradients entraîne le développement d'une hétérogénéité au sein du sphéroïde, se manifestant par la mise en place d'un gradient de prolifération au sein du sphéroïde au cours de sa culture : les cellules prolifératives se concentrent à la périphérie de la structure, là où l'accessibilité en oxygène et nutriments est la plus importante. Le nombre de cellules prolifératives diminue avec la profondeur tandis qu'à l'inverse, la proportion de cellules quiescentes augmente. Au centre du sphéroïde, les cellules ayant le





moins accès à l'oxygène et aux nutriments entrent dans un processus de mort cellulaire, entraînant l'apparition d'un cœur nécrotique. Selon le type cellulaire à partir duquel le sphéroïde est produit, l'organisation de sa structure peut varier, et les distances à la périphérie à partir desquelles ces différentes zones apparaissent peuvent différer.

Par ailleurs, ce modèle permet également de reproduire les interactions cellules-cellules en 3 dimensions : ce sont les jonctions intercellulaires qui participent majoritairement à la cohésion des sphéroïdes (Ivascu and Kubbies 2007).

L'organisation du modèle permet donc de reproduire l'hétérogénéité tumorale trouvée *in vivo* dans une microtumeur ou des micro-métastases.

Le sphéroïde multicellulaire est couramment utilisé en pharmacologie anti-tumorale et permet d'apporter une meilleure prédictibilité de l'effet d'agents thérapeutiques que les modèles cultivés en 2 dimensions, en reproduisant des mécanismes de résistance liés à l'hétérogénéité de la tumeur (Haass et al. 2008). Le modèle du sphéroïde a été utilisé dans le cadre de l'évaluation préclinique de l'efficacité du vemurafenib et a permis de prédire les effets de cette molécule observés sur modèles *in vivo* et durant les essais de phases cliniques II et III (Tsai et al. 2008; J. T. Lee et al. 2010; Bollag et al. 2010).

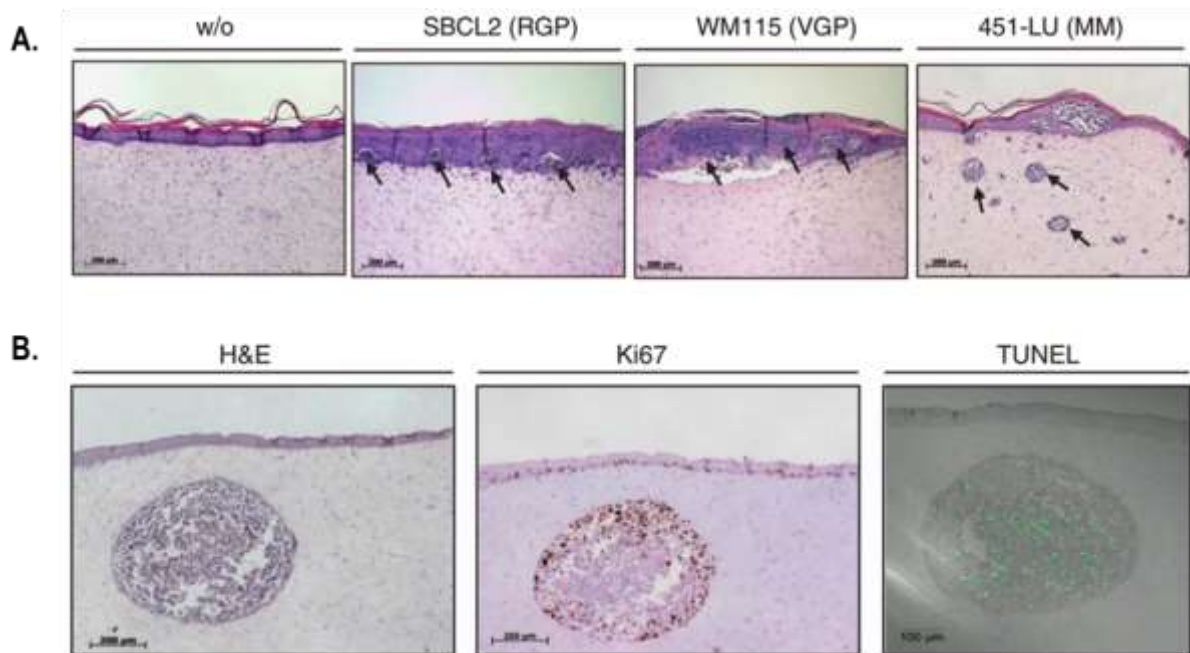
La simplicité des conditions de culture de ce modèle et la reproductibilité avec laquelle il peut être produit à partir d'une lignée cellulaire en font de nos jours un modèle de choix pour le criblage à haut débit d'agents pharmacologiques ou de banques de molécules (Vinci et al. 2012; Sirenko et al. 2015).

Cependant, ce modèle à lui seul ne permet pas d'étudier l'évolution de la tumeur dans le microenvironnement que constitue le tissu environnant et ne reproduit pas les interactions entre cellules tumorales et cellules saines. Ces interactions jouent pourtant un rôle majeur dans le développement de la micro-tumeur (Thoma et al. 2014).

### 1.2.2 Les modèles organotypiques de mélanome

Afin de pouvoir étudier *in vitro* le développement de la tumeur dans son microenvironnement, différentes stratégies ont été développées, basées sur la modélisation plus ou moins complète d'un microenvironnement autour des cellules tumorales. Dans le cas du mélanome, les cellules tumorales, organisées en sphéroïde ou non, sont associées à des modèles de peau reconstruite de complexité plus ou moins élevée.

De façon très simple, le modèle du sphéroïde multicellulaire a tout d'abord été enrobé et cultivé dans des matrices de complexités différentes. Des études menées sur des sphéroïdes issus de lignées cellulaires de mélanome de différentes origines ont mis en évidence des profils de croissance et d'invasion différents et corrélés à la phase de développement de la pathologie à



partir de laquelle les lignées avaient été établies : les lignées dérivées d'une tumeur en phase de croissance radiale présentent un phénotype peu invasif, tandis que des lignées établies à partir d'un mélanome métastatique envahissent rapidement leur microenvironnement lorsqu'elles sont cultivées dans un gel de collagène (Smalley et al. 2006). De la même façon, il a été montré que les contraintes mécaniques générées par la matrice extracellulaire, et notamment son élasticité, pouvaient avoir un impact sur la réponse aux traitements de cellules de lignées de mélanome (Tokuda, Leight, and Anseth 2014). Il a ainsi été montré que la sensibilité au vemurafenib des cellules de la lignée WM35, dérivée d'une tumeur en phase de croissance radiale, étaient plus sensibles au vemurafenib sur un substrat élastique que rigide. A l'inverse, la sensibilité d'une lignée dérivée d'un mélanome métastatique s'est avérée indépendante de l'élasticité de la matrice dans laquelle les cellules étaient cultivées.

Par ailleurs, des modèles plus complexes ont été développés en incorporant des cellules de lignées de mélanome dans des modèles de peau reconstruite reproduisant les 2 compartiments de la peau (Meier et al. 2000; Eves et al. 2000; Beaumont, Mohana-Kumaran, and Haass 2013). Dans ces modèles, les cellules de mélanome reproduisent les caractéristiques du développement de la pathologie *in vivo* (**Figure 19.A**): tandis que les cellules de lignées établies à partir d'une tumeur en phase de croissance radiale prolifèrent sous forme d'amas dans l'épiderme, les cellules provenant d'une tumeur en phase de croissance verticale envahissent rapidement le derme des peaux reconstruites. Ce type de modèle a par exemple été utilisé pour étudier l'impact d'un microenvironnement blessé et inflammé sur l'évolution des cellules tumorales (Marques and MacNeil 2016), ou afin d'étudier le rôle de facteurs de croissance sur la progression du mélanome (Meier et al. 2000).

Des études ont également été conduites sur ce type de modèle afin de valider l'effet et la toxicité de composés thérapeutiques tels que des inhibiteurs de BRAF (Beaumont, Mohana-Kumaran, and Haass 2013) ou la combinaison d'inhibiteurs de la voie MAPK et de AKT (Meier et al. 2007).

Un modèle organotypique de mélanome *in vitro* est également commercialisé par la société MatTek. Dans ce modèle, des cellules de mélanome humain de la lignée A375, dérivée d'un mélanome métastatique, sontensemencées dans une peau reconstruite formée à partir de fibroblastes humains dermiques cultivés dans une matrice de collagène et de kératinocytes différenciés pour reformer un épiderme complet. Le tissu obtenu reproduit de façon reproductible le phénotype des différentes phases de croissance radiale, verticale et métastatique du mélanome.

Récemment, un modèle a été développé à partir de sphéroïdes de lignées de mélanome intégrés dans une peau reconstruite (**Figure 19.B**) (Vörsmann et al. 2013). Dans ce modèle, les sphéroïdes s'intègrent dans l'épiderme ou le derme des peaux reconstruites selon s'ils sont formés à partir de lignées établies à partir des phases de croissance radiale, verticale ou



métastatique : les sphéroïdes de lignées cellulaires dérivées des phases de croissance radiale et verticale se développent dans une région proche de la jonction dermo-épidermique, tandis que les sphéroïdes dérivés de tumeurs métastatiques se développent dans le derme des modèles. Par ailleurs, un gradient de prolifération est établi et conservé au sein de ces sphéroïdes, témoignant de leur hétérogénéité cellulaire. Ce modèle a été utilisé pour évaluer l'effet de traitements chimiothérapeutiques tels que le cisplatine, en monothérapie ou combiné à un traitement aux ultraviolets B ou TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), sur la viabilité des cellules tumorales. Les résultats obtenus ont mis en évidence une résistance plus importante aux traitements dans ce modèle par rapport à une étude sur cellules en 2D, confirmant la pertinence du modèle pour se rapprocher de conditions *in vivo*.

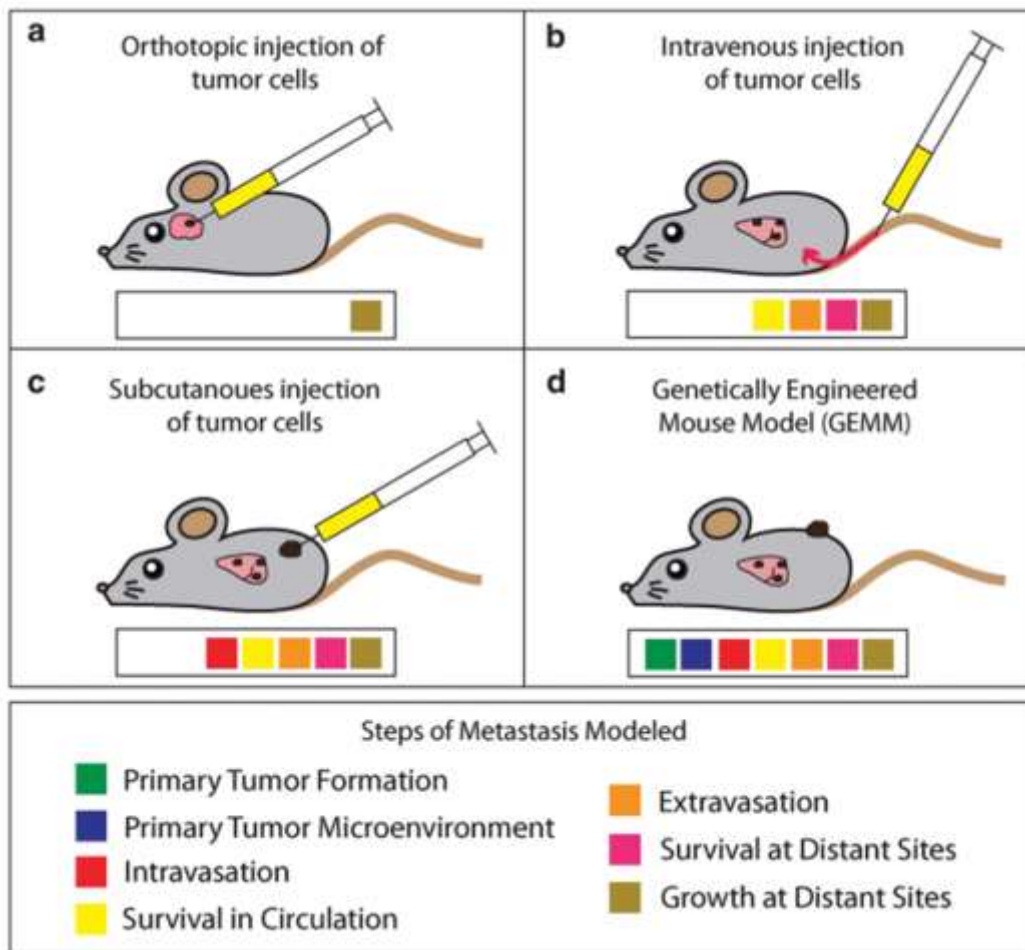
Enfin, un modèle intégrant une microvascularisation des substituts de peau a récemment été développé (Gibot et al. 2013). Outre la reproduction des différentes phases de développement du mélanome, le potentiel angiogénique d'une lignée métastatique agressive a pu être évalué, au-travers de la production de VEGF.

De façon générale, les modèles organotypiques permettent d'étudier la biologie du mélanome et la réponse à des molécules pharmacologiques durant les premiers stades de développement de la pathologie. Ces modèles peuvent être généralement cultivés durant une vingtaine de jours.

Ces modèles possèdent cependant différentes limites. A l'inverse du modèle de sphéroïde multicellulaire isolé, ces modèles sont complexes à mettre en œuvre et requièrent une certaine technicité (Beaumont, Mohana-Kumaran, and Haass 2013). Par ailleurs, ces modèles ne reproduisent pas toute la complexité du microenvironnement tumoral : les modèles de peaux reconstruites sont généralement développés à partir des 2 types majoritaires de cellules de la peau, les kératinocytes et les fibroblastes, et ne contiennent pas de cellules du système immunitaire. De plus, le derme artificiel sur lequel reposent ces modèles, est constitué d'une matrice de collagène, qui ne reflète pas la complexité de la matrice extracellulaire du tissu. Ces modèles organotypiques restent ainsi simplifiés et ne se prêtent pas à toutes les études précliniques.

## 2. Les modèles *in vivo*

Les modèles *in vivo* permettent de modéliser le développement du mélanome dans un organisme entier. Ils sont généralement utilisés pour déterminer la fonction d'un gène ou d'une protéine particulière dans la progression de la pathologie ou pour évaluer l'efficacité de composés thérapeutiques (Larue and Beermann 2007).



**Figure 20. Applications des différents modèles murins pour l'étude du mélanome.**

Les différents modèles murins permettent de reproduire et d'étudier différents aspects du développement du mélanome. D'après Damsky, Theodosakis, and Bosenberg 2014.

La souris est le principal modèle animal utilisé, car son génome et sa physiologie sont comparables à ceux de l'homme. Par ailleurs, les souris sont facilement disponibles et manipulables en laboratoire, et ce modèle est très bien caractérisé d'un point de vue génétique.

Dans le cas de l'étude du mélanome, il possède cependant différentes limites. La principale repose sur le fait que la peau de souris est structurée différemment de la peau humaine : les mélanocytes sont principalement localisés dans la couche basale de l'épiderme et dans les follicules pileux dans la peau humaine normale, tandis que chez la souris, ils sont majoritairement situés dans les follicules pileux, et parfois dans le derme. Cette différence de localisation entraîne une sensibilité différente aux facteurs extérieurs d'induction de la pathologie, et des propriétés histologiques peu représentatives de la pathologie humaine. La transition de la phase de croissance radiale à la phase de croissance verticale, ne peut par exemple pas être étudiée chez la souris pour cette raison.

Enfin, les souris développent rarement des mélanomes de façon spontanée. Afin de pallier ces différences et limites, différents types de modèles ont été développés chez la souris (**Figure 20**).

### 2.1 Les modèles transgéniques

Les souris transgéniques présentent une expression génique modifiée, qui leur permet de développer, spontanément ou après induction, des tumeurs de mélanome et des métastases. Différentes approches sont utilisées pour développer ces modèles, telles que l'introduction aléatoire d'un oncogène dans le génome, ou la modification spécifique de l'expression d'un gène par recombinaison homologue (Larue and Beermann 2007). Plus récemment, une technique reposant sur le système RCAS/TVA a été développée pour délivrer des ADNc, microARN ou ARN de façon ciblée et stable dans les modèles animaux et permettre l'introduction rapide de plusieurs altérations génétiques sans avoir recours à des croisements entre différentes lignées de souris transgéniques (Kuzu et al. 2015).

Les modèles de souris transgéniques sont couramment utilisés pour déterminer les mécanismes impliqués dans le développement du mélanome et plus particulièrement évaluer l'effet d'altérations génétiques particulières dans l'initiation, la progression et le développement de métastases dans le mélanome (Dankort et al. 2009; Combest et al. 2012). Dans ces modèles, le développement d'un mélanome peut alors se faire de façon spontanée ou être induit par des traitements chimiques ou physiques.

Différents modèles ont été développés afin de reproduire les principales altérations génétiques impliquées dans le développement du mélanome, telles que l'activation de BRAF et de



facteurs de croissance, ou la délétion de CDKN2A, TP53 ou PTEN, et évaluer leur implication dans le développement du mélanome (Kuzu et al. 2015).

L'utilisation de souris génétiquement modifiées pour surexprimer le facteur de croissance hépatique HGF a permis par exemple d'étudier la coopération entre les mutations BRAF et PTEN dans le développement du mélanome métastatique (Hooijkaas et al. 2012). Les modèles de souris transgéniques se sont également avérés être des modèles fiables pour prédire l'efficacité d'agents thérapeutiques (Combest et al. 2012).

Par ailleurs, ce type de modèle peut être utilisé pour identifier et imager *in vivo* les premiers stades de la mélanomagenèse, via l'introduction de gènes de fluorescence spécifiquement exprimés par les mélanocytes (Noonan et al. 2001).

Outre les modèles transgéniques murins, des études ont également été conduites chez le poisson zèbre qui possède des mélanocytes, appelés mélanophores. Ce poisson ne développe que rarement des tumeurs de façon spontanée, mais leur développement peut être observé dans des modèles transgéniques, de façon spontanée ou après induction aux ultraviolets (Patton, Mitchell, and Nairn 2010). Des études menées chez des poissons zèbre transgéniques ont par exemple permis de mettre en avant l'activation constitutive de BRAF dans le mélanome (Patton et al. 2005).

L'une des limites majeures associée aux modèles transgéniques réside dans la difficulté de prédire le développement d'un mélanome : dans certains modèles, des tumeurs peuvent se développer dans de nombreux tissus, limitant l'utilisation du modèle pour le mélanome. Par ailleurs, certaines altérations génétiques peuvent avoir des effets délétères sur la capacité de reproduction sur les modèles, rendant l'obtention de certains phénotypes difficile (Kuzu et al. 2015).

## 2.2 Les modèles induits physiquement ou chimiquement

Le développement de tumeurs de mélanome chez la souris peut être induit de différentes façons.

### 2.2.1 *Induction aux ultraviolets (UV)*

Les modèles impliquant l'induction de mélanomes par exposition aux radiations ultraviolettes sont particulièrement pertinents pour simuler la progression naturelle du développement de la pathologie et étudier l'impact des différents types d'UV sur sa progression.

Cependant, la différence de localisation dans la peau des mélanocytes murins et humains engendre un biais particulièrement important dans ce type de modèle : les mélanocytes murins, situés plus profondément dans le derme des souris, sont davantage protégés de

l'exposition aux rayonnements ultraviolets (Becker et al. 2010). Afin de pallier cette limite, ce type d'induction peut être appliqué sur des souris préalablement génétiquement modifiées pour présenter une distribution des mélanocytes plus proche de celle observée dans la peau humaine, via la surexpression de HGF/SF (Kuzu et al. 2015). Des études conduites sur ces modèles ont permis de mettre en évidence le rôle des UVB dans la tumorigenèse du mélanome, notamment lors d'expositions durant l'enfance (De Fabo et al. 2004).

Des facteurs de risques génétiques ont également pu être mis en évidence dans des modèles transgéniques exposés à des radiations UV après inactivation de CDKN2A ou CDK4, ces modifications génétiques entraînant une réduction du temps de latence avant la formation de métastases (Recio et al. 2002).

### 2.2.2 Induction chimique

L'induction de mélanome peut également se faire à l'aide d'agents chimiques. Cette technique est toutefois moins pertinente que l'utilisation des UV dans le contexte de l'étude du développement de la pathologie.

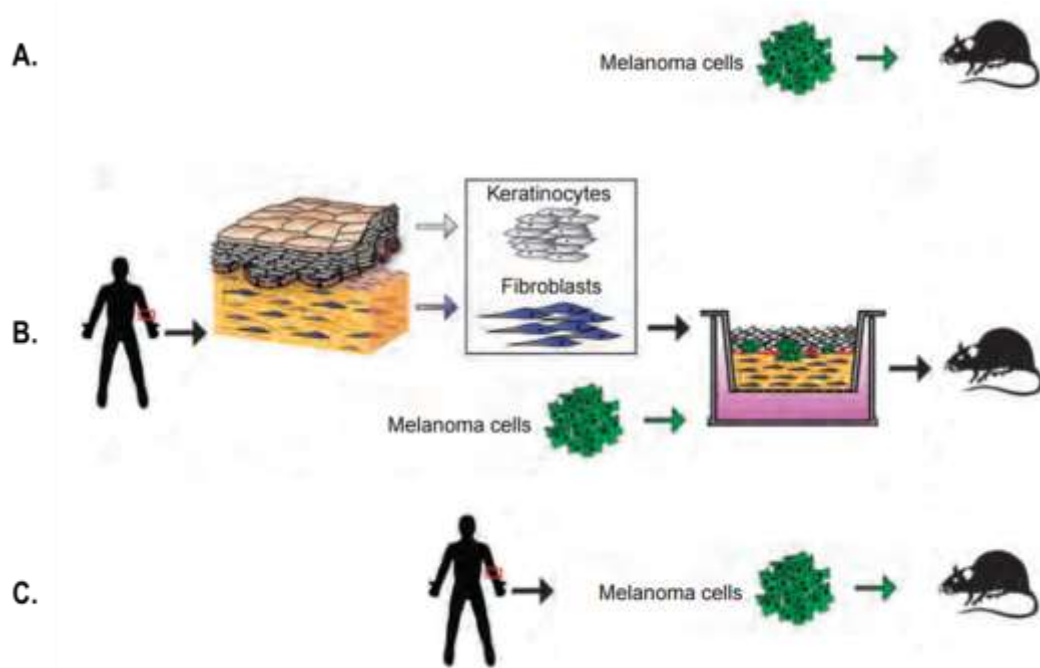
Différents composés chimiques tels que le DMBA ou le TPA peuvent être appliqués de façon topique sur les modèles, provoquant une irritation cutanée et des lésions conduisant au développement d'un mélanome (Kuzu et al. 2015). L'induction chimique peut être utilisée sur des modèles génétiquement modifiés afin d'initier le processus de mélanomagenèse (Dankort et al. 2009).

Ce type de modèle est généralement utilisé en combinaison avec des UV ou sur des modèles transgéniques. Il présente cependant certaines limites, liées notamment à l'absence de pigmentation des lésions développées, et à l'application des agents chimiques, moins homogène que l'irradiation aux UV (Beaumont, Mohana-Kumaran, and Haass 2013).

## 2.3 Les modèles syngéniques

Les modèles syngéniques reposent sur l'implantation de lignées cellulaires de mélanome murin dans des souris immunocompétentes. Différentes lignées ont été établies en culture à partir de rares cas de développement spontané de mélanome murin, telles que les lignées Harding-Passey, les S91 ou la lignée B16, déclinée en 2 lignées de potentiels métastatiques différents (Kuzu et al. 2015)

L'intérêt principal de ce modèle réside dans la possibilité d'étudier le développement du mélanome dans un environnement immunocompétent, dans lequel les cellules tumorales



**Figure 21. Les différents modèles de xénogreffe.**

**A.** Xénogreffe de lignées cellulaires de mélanome.

**B.** Xénogreffe orthotopique de peau humaine.

**C.** Xénogreffe de cellules dérivées de tumeurs de patients (PDX). Adapté de Kiowski et al. 2012.

peuvent interagir avec des cellules immunitaires de leur microenvironnement (McKinney and Holmen 2011).

Ce type de modèle est en revanche entièrement murin et ne permet pas de refléter la pathologie humaine avec fidélité en raison des différences physiologiques existant entre les 2 espèces, telles que des différences d'expression de protéines d'adhésion ou de facteurs de croissance (M. Herlyn and Fukunaga-Kalabis 2010). Par ailleurs, ces lignées, très peu nombreuses, ne sont pas représentatives de la diversité génétique trouvée dans les cellules humaines (Kuzu et al. 2015). Par exemple, l'analyse des mutations portées par les lignées dérivées de B16 a révélé la présence de mutations inactivatrices du gène *Cdkn2a*, mais très peu de mutations activatrices de *BRAF*, qui jouent pourtant un rôle important dans le développement de la pathologie humaine (Melnikova et al. 2004).

## 2.4 Les modèles de xénogreffe

Les modèles de xénogreffe consistent à cultiver et implanter des cellules de mélanome humain dans des souris immunodéficientes. L'implantation des cellules cancéreuses se fait généralement par injection sous-cutanée, bien que l'injection intradermique soit plus adaptée au cas du mélanome afin de reproduire le microenvironnement des tumeurs primaires. Ce type d'injection est en effet particulièrement délicat chez la souris et entraîne systématiquement l'ulcération rapide de la peau des modèles (Kuzu et al. 2015).

Il existe 3 types de modèles de xénogreffe : les xénogreffes de lignées cellulaires, les xénogreffes orthotopiques et les xénogreffes de fragments de tumeurs de patients (Patient Derived Xenograft, PDX) (**Figure 21**).

### 2.4.1 Les xénogreffes de lignées cellulaires

Les xénogreffes de lignées cellulaires sont réalisées à partir de lignées cellulaires de mélanome humain (**Figure 21.A**). Ces modèles sont utilisés pour étudier la croissance des tumeurs et le développement de métastases *in vivo* (Sharma et al. 2005; Huh et al. 2010), mais également pour évaluer la réponse à des drogues (Sharma et al. 2009; Gowda et al. 2014; Posch et al. 2015; Phadke, Sini, and Smalley 2015). Le suivi des cellules cancéreuses peut être réalisé *in vivo* à l'aide de sondes fluorescentes intégrées dans les cellules avant leur implantation (Rozenberg et al. 2010).

De nombreuses lignées cellulaires de mélanome métastatique sont capables de former des métastases de façon spontanée à partir du site de xénogreffe dans des organes distants (Sharma and Robertson 2007; Huh et al. 2010). Cependant, toutes les lignées issues de métastases ne sont pas capables de métastaser dans une xénogreffe. Par exemple, les



lignées WM164 et WM793B, isolées à partir de métastases d'un patient, ne se sont pas révélées capables de métastaser spontanément dans ce type de modèle. Plusieurs passages *in vivo* ont été requis pour permettre d'établir les lignées 1205 Lu et 451 Lu à partir d'une métastase de poumon, révélant la croissance sélective de sous-populations de cellules métastatiques préexistantes dans la tumeur parentale (D. Herlyn et al. 1990; Juhasz et al. 1993).

Afin de faciliter le développement de métastases, les modèles de xénogreffe peuvent également être produits par injection directe des cellules tumorales dans la veine de la queue des souris. Cette approche est fréquemment utilisée, mais ne reflète pas la progression des métastases observée chez un patient (Khanna and Hunter 2005; Y. Wang et al. 2013).

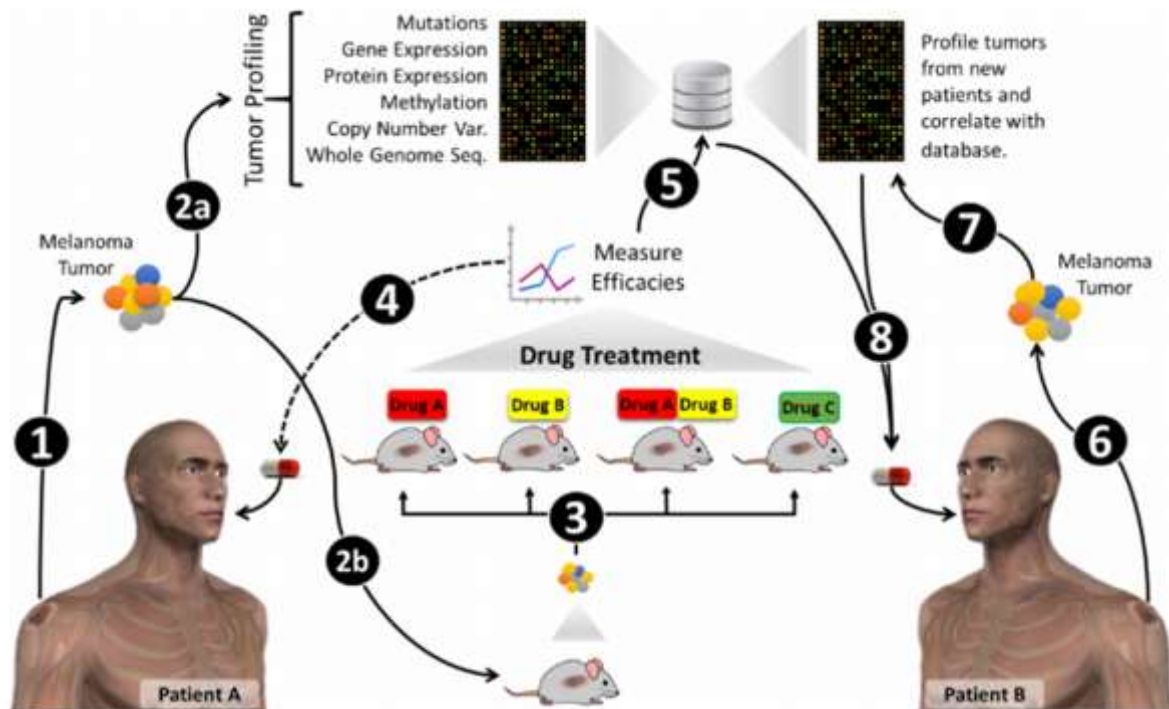
Les xénogreffes de lignées cellulaires sont des modèles généralement peu prédictifs de l'efficacité de composés thérapeutiques et de la réponse à des traitements en phase clinique (Merlino et al. 2013), pour différentes raisons : tout d'abord, les lignées cellulaires sont des modèles établis de longue date dans des conditions éloignées de leur environnement physiologique, ce qui entraîne la sélection de clones peu représentatifs des cellules tumorales d'origine. Par ailleurs, les xénogreffes ne se développent pas dans leur tissu naturel, mais dans un microenvironnement ne présentant pas de système immunitaire fonctionnel (Kuzu et al. 2015).

#### 2.4.2 Les xénogreffes orthotopiques de peau humaine

Une autre approche développée consiste à réaliser une xénogreffe de peau humaine saine sur une souris immunodéficiente, puis implanter des lignées cellulaires de mélanome dans le derme des greffes humaines (Juhasz et al. 1993). Plus récemment, des modèles similaires ont été développés à partir de peau humaine reconstruite ensemencée avec des cellules d'une lignée de mélanome (**Figure 21.B**) (Li, Fukunaga-Kalabis, and Herlyn 2011; Kiowski et al. 2012).

Ce type de modèle permet de mieux reproduire le microenvironnement tumoral et a permis d'observer des schémas de croissance, d'angiogenèse et d'invasion des cellules de mélanome dans le derme similaires à ceux observés chez des patients. Les cellules cancéreuses implantées peuvent également être suivies dans le modèle greffé à l'aide de sondes fluorescentes.

Les modèles de xénogreffe orthotopiques sont en revanche longs à produire (plusieurs mois entre la greffe de biopsie de peau et l'injection des cellules cancéreuses, ou plusieurs semaines dans le cas de la peau reconstruite), et restent éloignés du microenvironnement tumoral dans lequel évoluent normalement les cellules cancéreuses humaines. Par ailleurs, le développement de ces modèles repose sur l'utilisation de lignées cellulaires.



**Figure 22. Utilisation des modèles PDX pour la thérapie personnalisée.**

Des fragments de tumeurs excisées d'un patient sont étudiées à l'aide de techniques d'analyse (2a) et transplantées dans des souris (2b). Différentes stratégies thérapeutiques sont testées sur des modèles PDX (3). La meilleure stratégie thérapeutique est sélectionnée et appliquée au patient (4). Les informations obtenues à partir des analyses de la tumeur sont stockées dans des bases de données (5) et peuvent être utiles pour sélectionner des stratégies thérapeutiques pour de futurs patients (6-8). Tiré de Kuzu et al. 2015.

### 2.4.3 Les xénogreffes de tumeurs dérivées de patients

Les xénogreffes de tumeurs dérivées de patients (PDX) permettent de s'affranchir des limites liées à la nature des lignées cellulaires. Ces modèles sont produits en implantant des fragments de tumeurs viables d'un patient dans une souris immunodéficiente, par injection sous-cutanée (**Figure 21.C**).

Les modèles PDX présentent différents avantages : ils conservent tout d'abord plus de similarités avec les tumeurs trouvées chez les patients que les xénogreffes de lignées cellulaires, et permettent de préserver des caractéristiques cliniques de la tumeur en termes d'histologie, de transcriptome ou encore d'hétérogénéité tumorale (Kuzu et al. 2015). Par ailleurs, la possibilité de créer plusieurs modèles PDX à partir d'une même tumeur permet d'étudier le développement potentiel de plusieurs mécanismes de résistances ou d'évaluer l'efficacité de différentes stratégies thérapeutiques sur une même tumeur (Das Thakur et al. 2013).

Pour ces différentes raisons, le modèle PDX est utilisé depuis plusieurs décennies en recherche préclinique et s'est avéré prédictif de l'effet d'agents thérapeutiques, à des concentrations exploitables en phase de développement clinique. Dans le cas d'évaluation d'agents chimiothérapeutiques, ce modèle a permis de prédire l'efficacité des agents testés à leur concentration maximale tolérée avec une précision de 92% (Kuzu et al. 2015).

Plus récemment, ce modèle a également été utilisé pour étudier la réponse à des composés thérapeutiques de mélanomes métastatiques, évaluer et comprendre le développement de mécanismes de résistance et développer des stratégies de combinaisons de thérapies afin de les prévenir (Bollag et al. 2010; Flaherty et al. 2010) : le modèle HMEX1906, développé à partir d'une tumeur de patient BRAF<sup>T799A</sup> préalablement à tout traitement au vemurafenib, a été traité avec une dose clinique de vemurafenib pendant plusieurs semaines. Ce traitement a conduit à l'inhibition de la voie des MAPK à plus de 80%, de façon similaire aux résultats observés en clinique. Après plusieurs semaines, plusieurs modèles ont développé une résistance au traitement. Ces tumeurs résistantes ont été récupérées pour produire de nouveaux modèles résistants et étudier les mécanismes à l'origine de leur résistance.

Enfin, de nouvelles applications ont été récemment développées, reposant sur la conduite d'études cliniques sur ces modèles en parallèle de celles menées sur des patients, permettant de développer des thérapies personnalisées (**Figure 22**) (Malaney, Nicosia, and Davé 2014; Einarsdottir et al. 2014; Lodhia et al. 2015) : un premier criblage de composés thérapeutiques en monothérapie ou combinés peut être réalisé sur les modèles PDX afin de sélectionner la stratégie la plus efficace et de l'appliquer ensuite au patient. En parallèle, différentes données peuvent être récupérées sur la tumeur, notamment au-travers de techniques de séquençage,



Type	Modèle	Applications	Limites
<i>In vitro</i>	Cultures cellulaires 2D	Principes de la biologie tumorale Pré-screening de drogues	Pas de microenvironnement Faible prédictibilité
	Sphéroïde	Hétérogénéité tumorale Screening de drogues	Pas de microenvironnement
	Modèles organotypiques	Développement du mélanome Efficacité de drogues	Technicité / complexité Microenvironnement simplifié / incomplet
<i>In vivo</i>	Souris syngéniques	Développement du mélanome Immunothérapie	Pathologie murine Faible prédictibilité
	Souris génétiquement modifiées	Développement du mélanome Thérapie ciblée Immunothérapie	Coût Technicité
	Xénogreffes de lignées	Développement tumoral Développement des métastases Thérapies ciblées	Modèle immunodéficient Lignées cellulaires Injection sous-cutanée Faible prédictibilité
	Xénogreffes orthotopiques de peau humaine	Angiogenèse, invasion tumorale	Modèle immunodéficient Lignées cellulaires Technicité Faible prédictibilité
	PDX	Thérapie ciblée Mécanismes de résistance Thérapie personnalisée	Modèle immunodéficient Durée de développement Injection sous-cutanée

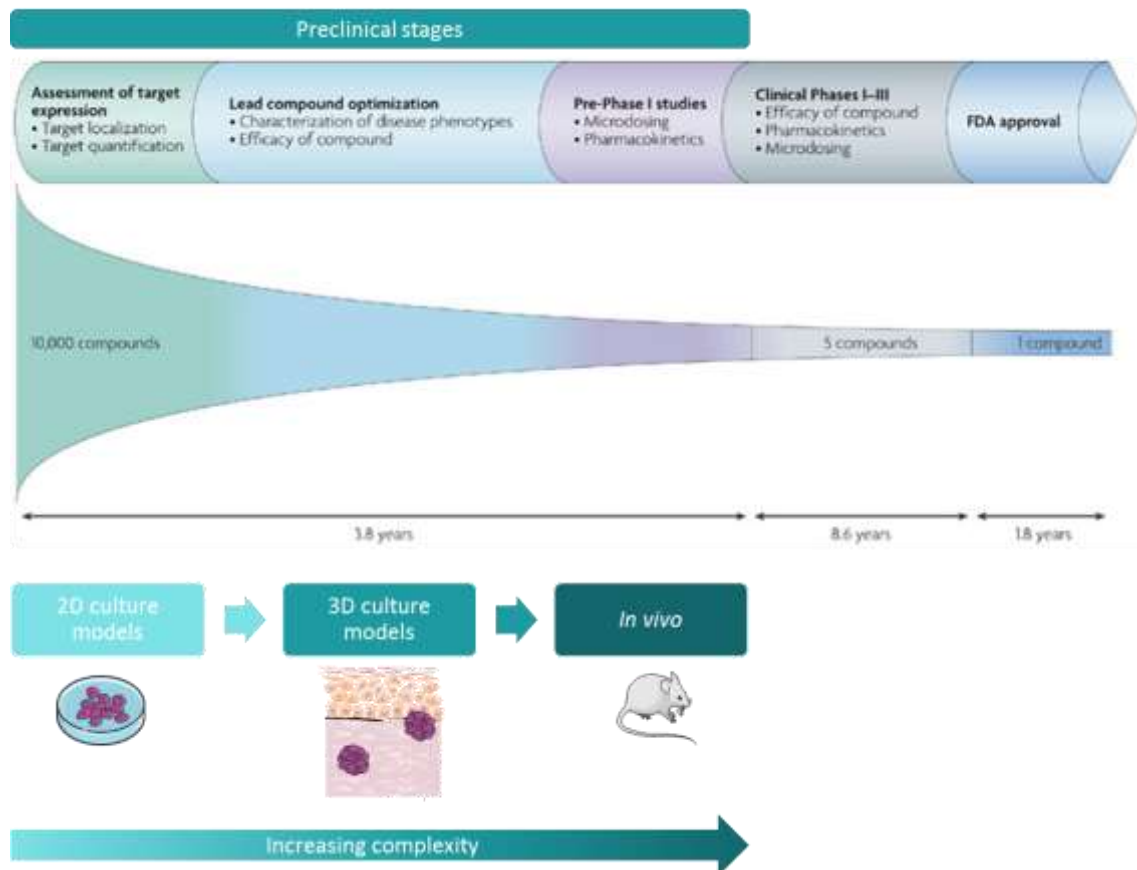
Tableau 3. Applications et limites des différents modèles d'étude du mélanome.

et stockées dans des bases de données pour être ensuite utilisées dans le cadre du traitement de futurs patients.

Bien que le modèle PDX possède de nombreux avantages, il conserve différentes limites (Kuzu et al. 2015). Tout d'abord, ces modèles sont très longs et techniquement difficiles à produire : soumises à un procédé de sélection *in vivo*, seules les tumeurs les plus agressives parviennent à se développer dans ces modèles. Dans le cas où les cellules parviennent à proliférer, il faut compter 3 à 6 mois pour que la tumeur se développe avant de pouvoir utiliser le modèle.

Par ailleurs, ce type de modèle ne peut être développé que dans des souris très fortement immunodéficientes, et nécessite donc des conditions d'expérimentation complexes et coûteuses dans des environnements dépourvus de pathogènes. Ces modèles ne permettent donc pas de tenir compte des réponses immunitaires dans l'évaluation de l'efficacité de traitements ou dans le développement de la tumeur. Des tentatives ont été faites pour maintenir la présence des cellules immunitaires de patients prélevées en même temps que la tumeur, mais ces cellules ne survivent pas durant le développement du modèle (Bankert, Egilmez, and Hess 2001; Hylander et al. 2013). Pour cette même raison, ce modèle ne peut pas être utilisé pour développer des stratégies d'immunothérapies.

Il existe donc un grand nombre de modèles pour étudier le mélanome. Ces modèles présentent des caractéristiques, des degrés de complexité et des limites différentes (résumés dans le **Tableau 3**), et permettent d'étudier différents aspects de la pathologie ainsi que d'évaluer de façon plus ou moins prédictive l'efficacité de composés thérapeutiques. L'utilisation combinée de ces différents modèles est indispensable afin d'appréhender au mieux les différents facteurs impliqués dans le développement du mélanome et l'origine des mécanismes de résistance qui se développent inévitablement au cours du traitement des patients. L'utilisation de modèles intégrant le microenvironnement tumoral de la façon la plus complète possible est également primordiale afin de prédire de la façon la plus fiable possible l'évolution de la tumeur, le développement de mécanismes de résistance et l'efficacité de traitements thérapeutiques.



**Figure 23. Les différentes étapes du développement d'un composé thérapeutique.**

Des étapes de recherche préclinique et d'études cliniques sont nécessaires au développement d'un composé thérapeutique. Parmi une moyenne de 10 000 composés évalués en début de procédé, seulement 5 entreront en études cliniques, et un seul recevra finalement une autorisation de mise sur le marché. Différents modèles d'étude de complexité différente interviennent lors des stades de recherche préclinique. Adapté de (Willmann et al. 2008; Hirschhaeuser et al. 2010; Fitzgerald et al. 2015).

### 3. Importance des modèles d'étude dans le développement préclinique d'un composé thérapeutique

Le développement d'un nouveau composé thérapeutique est divisé en différentes étapes (**Figure 23**) :

La phase de développement préclinique permet tout d'abord d'identifier les cibles potentielles pour un nouvel agent thérapeutique. Une fois la cible déterminée, un screening est réalisé sur de nombreux agents potentiels afin d'identifier des composés affectant la cible sélectionnée. Des études portant sur le mécanisme d'action, l'efficacité, la pharmacocinétique et la toxicologie sont ensuite réalisées sur différents modèles d'étude, comprenant obligatoirement un rongeur. C'est au cours de cette phase qu'interviennent les différents modèles d'étude présentés précédemment.

La phase de développement clinique est réalisée sur l'homme et est divisée en 3 phases successives : les essais de phase I, menés sur une vingtaine de patients, visent à évaluer la tolérance de l'organisme à la molécule testée ainsi que sa pharmacocinétique. La phase II se déroule chez un plus grand nombre de patients volontaires, permet de déterminer la dose minimale efficace du médicament et d'évaluer les éventuels effets indésirables. Enfin, la phase III permet de comparer l'efficacité du nouveau traitement à celle d'un traitement de référence. Dans le cas du vemurafenib, l'efficacité de la molécule a été comparée à celle de la dacarbazine (Chapman et al. 2011).

La dernière phase d'essais clinique débouche sur la demande de mise sur le marché du médicament développé.

Actuellement, 12 à 15 années de R&D sont en moyenne nécessaires entre la sélection d'une cible thérapeutique et la mise sur le marché d'un nouveau médicament (Willmann et al. 2008) : les étapes de recherche préclinique s'étalent sur 3 à 4 ans, le développement clinique s'étend sur 8 à 9 ans, et enfin 1 à 2 ans sont nécessaires avant l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché.

Au cours des différentes étapes du processus, le nombre de composés candidats diminue : environ 10 000 composés sont initialement considérés. Les étapes de recherche préclinique permettent de sélectionner environ 5 composés pour entrer en phase de développement clinique. A l'issue des phases de développement clinique, seule un composé thérapeutique est sélectionné. Ce taux d'attrition très élevé est actuellement l'un des problèmes majeurs rencontré durant le développement d'un médicament et génère d'importants coûts (Paul et al. 2010). Les pertes les plus élevées engendrés par cette attrition proviennent de l'échec de 35% des composés thérapeutiques entre le passage de la recherche préclinique à la phase I de

tests cliniques d'une part, et de 66% des composés thérapeutiques qui échouent en phase II et voient leur développement interrompu au moment de l'entrée en phase III d'autre part.

L'une des principales raisons de l'échec de composés thérapeutiques en phase I repose sur l'efficacité du composé testé (Waring et al. 2015).

Les progrès réalisés en matière de prédictibilité des modèles d'étude préclinique, liés notamment au développement de modèles organotypiques tridimensionnels intégrant le microenvironnement tumoral et de modèles *in vivo* performants et humanisés tels que les modèles PDX ont permis de limiter les échecs liés à la pharmacocinétique ou la biodisponibilité des molécules transposées à l'Homme, mais ce facteur reste toutefois l'une des principales causes de l'échec de composés thérapeutiques en phase II (Waring et al. 2015).

Différentes solutions sont envisagées pour enrayer l'échec important rencontré durant le développement d'un composé thérapeutique (Moreno and Pearson 2013). L'une d'entre elles repose sur le développement de nouveaux modèles précliniques représentatifs de la biologie tumorale humaine, permettant d'évaluer avec fiabilité l'efficacité de composés thérapeutiques et d'évaluer les risques de développement de résistance afin d'envisager des stratégies de combinaison de molécules, comme par exemple la combinaison d'inhibiteurs de MEK et d'inhibiteurs de BRAF dans le cas du mélanome (Das Thakur et al. 2013). Le développement de modèles organotypiques est une solution attractive, pour un ensemble de raisons économiques et éthiques, en permettant de limiter le nombre d'animaux nécessaires notamment (Pampaloni, Reynaud, and Stelzer 2007).

Une seconde solution évoquée repose sur l'amélioration des techniques d'analyse et d'imagerie afin d'étudier au mieux l'efficacité de composés dans les nouveaux modèles développés et de rendre leur utilisation possible dans le cadre de screening de haut-débit (de Jong, Essers, and van Weerden 2014). En particulier, le développement de l'imagerie *in situ*, est nécessaire pour permettre d'imager de larges échantillons, notamment de la tumeur dans son microenvironnement, sans endommager leur structure (Pampaloni, Reynaud, and Stelzer 2007; Fitzgerald et al. 2015).





# OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif principal de mon projet de thèse a consisté à développer et caractériser un nouveau modèle *ex vivo* de mélanome humain destiné à l'étude du mélanome, composé de la tumeur et de son microenvironnement. La stratégie envisagée a reposé sur la combinaison de deux modèles existants : le modèle multicellulaire de sphéroïde, qui permet de reproduire l'organisation tridimensionnelle et l'hétérogénéité d'une tumeur solide, et le modèle d'explant de peau cultivé *ex vivo* NativeSkin®, qui représente le microenvironnement naturel dans lequel les cellules de mélanome se développent.

Ce projet s'est articulé autour des objectifs suivants:

1. Développer une procédure d'implantation reproductible et efficace pour implanter un sphéroïde produit à partir d'une lignée de mélanome dans le derme d'un explant de peau humaine, et ainsi permettre l'obtention du modèle organotypique OncoSkin® ;
2. Développer des outils d'analyse pour étudier le devenir du sphéroïde implanté, notamment en utilisant la microscopie à feuille de lumière pour imager le sphéroïde directement au sein de l'explant de peau et suivre son évolution en trois dimensions ;
3. Analyser le devenir du sphéroïde implanté dans le modèle OncoSkin®.





# RESULTATS



## Partie 1 : Développement d'un modèle de mélanome humain *ex vivo*

Afin développer un modèle *in vitro* complexe de mélanome humain, intégrant la tumeur dans son microenvironnement physiologique, la peau, le premier objectif de mes travaux a consisté à développer une stratégie permettant de positionner un sphéroïde unique de lignée de mélanome au sein d'un explant de peau humaine, le modèle NativeSkin®, dans des conditions expérimentales permettant par la suite le suivi de son évolution au sein du modèle, par fluorescence. La première partie de ce manuscrit est consacrée à la présentation des travaux de mise au point qui ont conduit à l'établissement d'une procédure pour la production du modèle OncoSkin®.

La méthodologie envisagée repose sur l'implantation d'un sphéroïde unique par biopsie de peau par injection. Afin d'atteindre cet objectif, j'ai testé différentes stratégies d'injection et développé une méthodologie d'analyse permettant de visualiser le sphéroïde implanté au sein de l'explant entier. Les résultats obtenus sur ces travaux de mise au point sont présentés sur modèles basés sur l'implantation de sphéroïdes de la lignée de mélanome humain WM 266-4 de 800µm de diamètre.

### 1. Présentation des stratégies testées pour l'implantation d'un sphéroïde unique dans une biopsie de peau

Nous avons souhaité développer une procédure reproductible pour implanter un sphéroïde dans le derme d'un explant de peau et préservant l'intégrité de l'explant et du sphéroïde.

Afin de limiter les dommages causés au tissu cutané, nous avons choisi d'implanter le sphéroïde en passant par le derme des explants et non par l'épiderme, la structure du derme étant plus élastique et déformable que celle de l'épiderme, renforcée entre autres par la barrière physique que représente la couche cornée.

Le principe de la méthodologie envisagée étant d'injecter le sphéroïde dans le derme, nous avons testé l'impact de deux paramètres sur la réalisation et la réussite de l'implantation: l'état de la solution d'injection d'une part, qui peut-être liquide, visqueuse ou gélifiée, et la technique d'injection du sphéroïde selon l'état de la solution d'injection d'autre part, pour conserver au mieux sa structure et optimiser le rendement d'implantation, c'est-à-dire obtenir le plus de biopsies dans lesquelles un sphéroïde unique est implanté et maintenu.

Afin de tester l'impact de l'état de la solution d'injection, les implantations ont été réalisées en PBS comme solution liquide, tandis que les implantations en solutions visqueuse et gélifiée ont été réalisées en gélatine 100 mg/mL et 250 mg/mL respectivement. La gélatine a été choisie pour sa facilité de manipulation et sa biocompatibilité. En effet, elle est visqueuse à 37°C et solidifie à température ambiante. Par ailleurs, elle est principalement constituée de



**Figure 24. Schémas de montage des différentes techniques d'implantation.**

Dans le premier montage, le sphéroïde, schématisé par une sphère rouge, est aspiré dans l'aiguille et injecté dans le derme d'une biopsie de peau à l'aide d'une seringue. Dans le second montage, le sphéroïde est poussé hors de l'aiguille dans le derme à l'aide d'un piston.

collagène dénaturé, ce qui en fait un composé biocompatible, le collagène étant l'un des composants majoritaires de la matrice extracellulaire du derme.

Les différents essais techniques réalisés ont conduit à l'identification de deux montages différents d'implantation en fonction de l'état de la solution (**Figure 24**).

Le premier montage est adapté à l'injection du sphéroïde dans une solution liquide ou visqueuse. Dans ce montage, la solution qui contiendrait le sphéroïde est injectée à l'aide d'une aiguille biseautée (18G) montée sur une seringue de 1 mL. Un petit volume de solution (compris entre 5 et 15  $\mu$ L) liquide ou visqueuse peut être injecté à l'aide de cette technique sans saturer le derme (la solution reste dans le derme et ne s'écoule pas hors de l'explant après injection).

Le second montage permet l'implantation du sphéroïde dans une solution visqueuse ou gélifiée : le sphéroïde est préalablement enrobé dans un petit volume de solution à l'état liquide et aspiré dans une aiguille biseautée à l'aide d'une seringue classique. L'aiguille est ensuite maintenue à l'horizontale pendant quelques minutes à température ambiante pour permettre la solidification de la solution. Une fois la solution prise, la seringue est démontée de l'aiguille, et le sphéroïde enrobé est implanté à l'aide d'un piston inséré directement dans l'aiguille, et poussé jusqu'à ce que la totalité de la capsule solide soit éjectée.

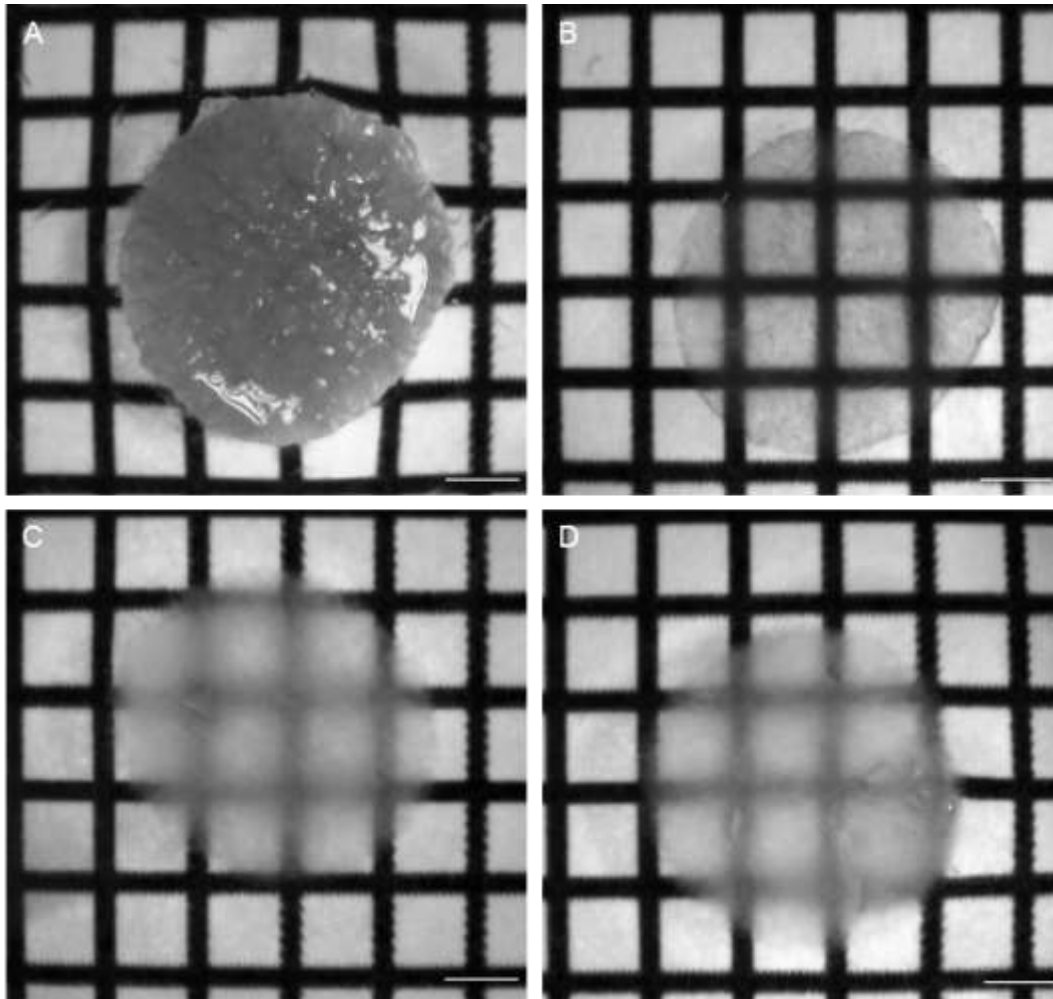
## **2. Impact des différentes conditions d'implantation sur l'intégrité des sphéroïdes après implantation**

### **2.1 Développement d'une méthode d'analyse globale des sphéroïdes au sein des explants de peau**

Afin d'analyser l'état des sphéroïdes au sein des explants de peau après implantation, j'ai développé une méthodologie permettant de visualiser les sphéroïdes de façon globale dans les explants entiers combinant le marquage fluorescent des sphéroïdes et la transparence des explants après implantation.

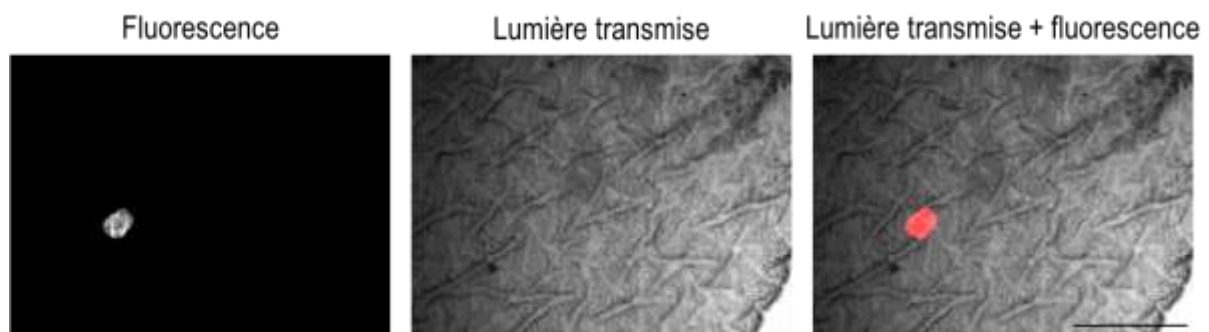
Pour permettre leur identification dans le tissu, les sphéroïdes ont été marqués avec une sonde fluorescente cytoplasmique avant leur implantation, permettant de distinguer de façon certaine les cellules du sphéroïde de celles de la peau, dont la structure présente une certaine autofluorescence.

Une limite forte à l'observation en microscopie optique des tissus réside en leur opacité, associée à l'importante hétérogénéité de leurs indices de réfraction, conduisant à une diffraction de la lumière. Afin de pouvoir visualiser la fluorescence du sphéroïde, les biopsies de peau, initialement opaques, ont été transparentisées après fixation. Différentes stratégies de



**Figure 25. Comparaison de différentes techniques pour la transparence de biopsies de peau.**

Des biopsies de 8 mm fixées en formaline ont été progressivement déshydratées par des incubations dans des bains successifs d'éthanol (B et D) ou dans du tétrahydrofurane (C) puis immergées dans une solution de BABB (B et C) ou de DBE (D). Une biopsie contrôle non transparentisée a été laissée en PBS (A). Images prises au microscope en lumière transmise 48h après immersion dans le solvant de transparence. Echelles : 2 mm.



**Figure 26. Observation des sphéroïdes après implantation au sein des explants de peau en macroscopie.**

Images d'un modèle implanté avec un sphéroïde de la lignée WM-266-4 en lumière transmise et en fluorescence. La combinaison des 2 illuminations permet de co-visualiser le sphéroïde et l'explant de peau. Barre d'échelle 200  $\mu$ m.

transparisation (« optical clearing ») sont décrites et utilisées pour permettre l'imagerie d'embryons ou d'organes entiers (Ertürk et al. 2012; Azaripour et al. 2016). D'une manière générale, ces techniques consistent à homogénéiser les indices de réfraction des différents composants d'un tissu en substituant ses composés aqueux par des composés organiques ayant un indice de réfraction proche de celui des lipides. Ceci a pour conséquence de rendre le tissu optiquement transparent. Ces techniques sont basées sur la déshydratation de l'échantillon puis sont incubation dans un solvant organique. L'application de ces techniques à la transparisation d'explants de peau humaine n'ayant jamais été expérimentée, différents solvants ont été testés pour déshydrater les explants de peau puis les transpariser. Les explants de peau ont été fixés immédiatement après implantation, déshydratés progressivement par bains successifs d'éthanol ou de tétrahydrofuran (THF), puis immergés dans une solution d'alcool de benzyle et benzoate de benzyle (BABB) ou de di-benzyle éther (DBE) (**Figure 25**).

Les résultats obtenus montrent que **la déshydratation en éthanol puis transparisation dans une solution de BABB permet d'obtenir une transparisation complète des biopsies de peau (Figure 25A, manuscrit en préparation)**, alors qu'elle n'est que très partielle avec les autres techniques testées. Cette condition a donc été retenue et employée dans le reste du projet pour permettre l'imagerie des sphéroïdes implantés au sein du tissu.

## 2.2 Analyse de l'intégrité des sphéroïdes au sein des explants en fonction des stratégies d'implantation

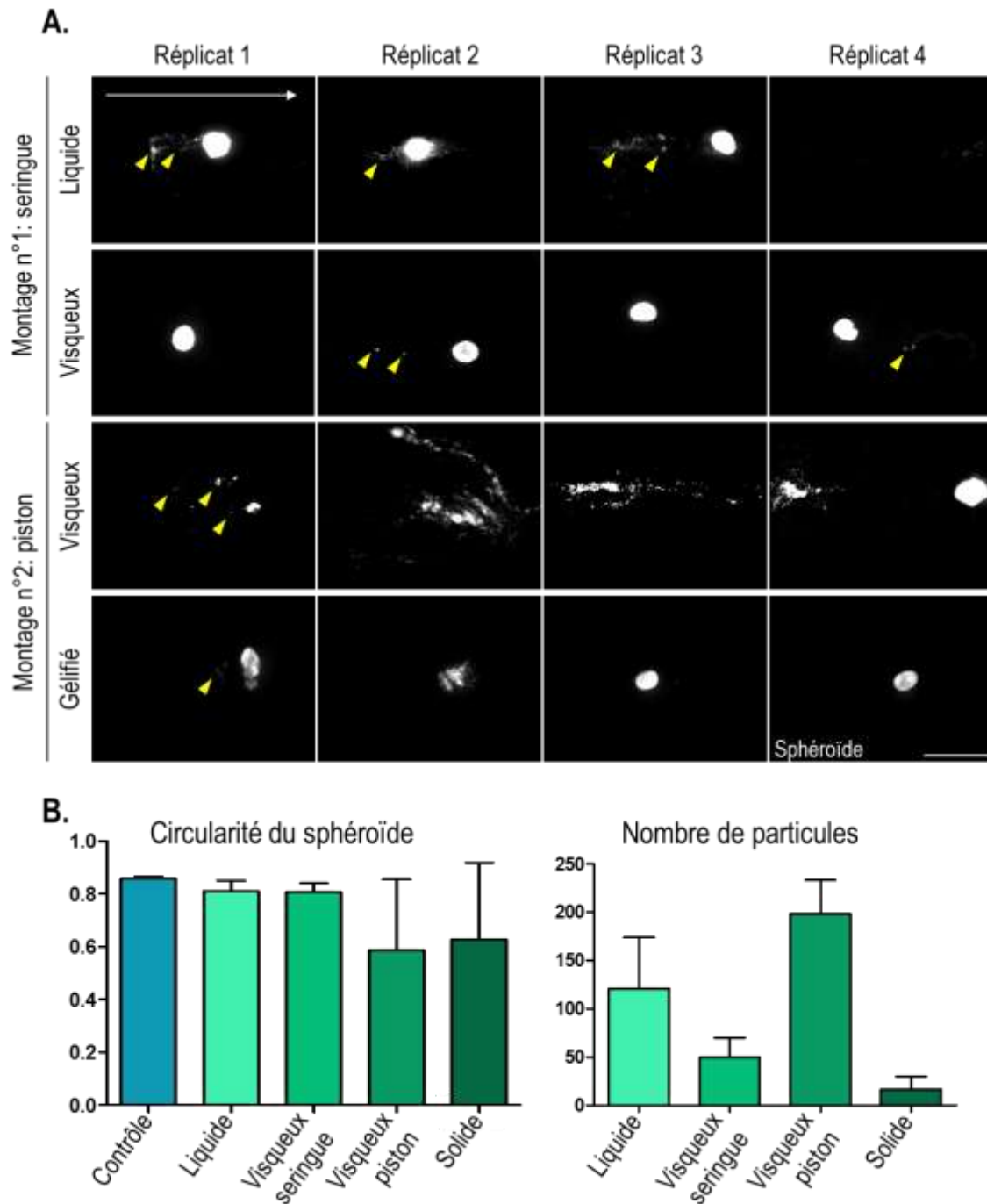
Des sphéroïdes de la lignée WM-266-4 ont été implantés dans des biopsies de peau selon les stratégies précédemment présentées. Les modèles générés ont été fixés immédiatement après implantation et transparisés (**cf Matériels et Méthodes section 4.1**). La présence et l'état des sphéroïdes au sein des biopsies de peau ont été analysés par macroscopie de fluorescence qui permet d'avoir une visualisation en deux dimensions de la totalité du volume de l'explant et la visualisation de l'aire projetée du sphéroïde.

La transparisation des explants de peau implantés a rendu leur observation facile : à l'échelle macroscopique, l'observation combinée de la peau en lumière transmise et du sphéroïde en fluorescence a permis de très rapidement localiser les sphéroïdes implantés dans les explants, et d'évaluer leur état après implantation (**Figure 26**).

Cette technique d'analyse a été utilisée pour évaluer le potentiel des différentes conditions d'implantation précédemment fixées selon deux critères :

- La présence du sphéroïde dans les biopsies après implantation
- L'intégrité du sphéroïde après implantation





**Figure 27. Comparaison du résultat de différentes techniques d'implantation des sphéroïdes de WM-266-4.**

Des sphéroïdes de la lignée WM-266-4 ont été marqués par incubation avec la sonde fluorescente CMTMR® puis implantés dans des biopsies de peau de 11 mm de diamètre dans des solutions liquide, visqueuse et gélifiée, et selon 2 techniques d'implantation différentes. Immédiatement après implantation, les explants de peau implantés ont été fixés, transparisés et analysés en macroscopie de fluorescence. **(A)** Des images de la fluorescence des sphéroïdes (en blanc sur les photos) ont été prises sous un microscope. La flèche blanche indique la trajectoire suivie par l'aiguille lors de l'implantation. Les têtes de flèches blanches indiquent la présence de cellules fluorescentes isolées et détachées des sphéroïdes. Echelle : 2 mm. **(B)** Diagramme en barre présentant les valeurs moyennes + écart à la moyenne de la circularité et du nombre de cellules isolées pour les différentes conditions testées (6 réplicats par conditions). La condition contrôle est définie pour des sphéroïdes non implantés.

Dans le cas de l'injection en solution liquide, le sphéroïde n'est pas systématiquement présent dans les biopsies de peau, tandis qu'il est systématiquement retrouvé dans chaque échantillon avec les trois autres techniques (**Figure 27A**). Nous avons par la suite observé que cette absence pouvait être liée à un blocage du sphéroïde dans l'espace mort situé entre l'aiguille et la seringue et était observée de façon répétable lorsque le sphéroïde était injecté dans une solution liquide.

Par ailleurs, une altération plus ou moins importante de l'intégrité du sphéroïde est observable selon les conditions : l'implantation à l'aide d'un piston dans une solution visqueuse entraîne une altération de la structure du sphéroïde dans la majorité des cas. Son intégrité est également altérée de façon moins importante et non systématique lors de l'implantation en solution gélifiée. En revanche, la perte de structure du sphéroïde est très limitée lorsqu'il est injecté en PBS ou en gélatine visqueuse : le sphéroïde paraît légèrement plus déformé quand il est injecté en PBS, et des cellules semblent s'en détacher au moment de l'implantation, des petits amas fluorescents étant visibles autour du site d'implantation et majoritairement localisés dans la trajectoire suivie par l'aiguille lors de l'implantation (**Figure 27A**).

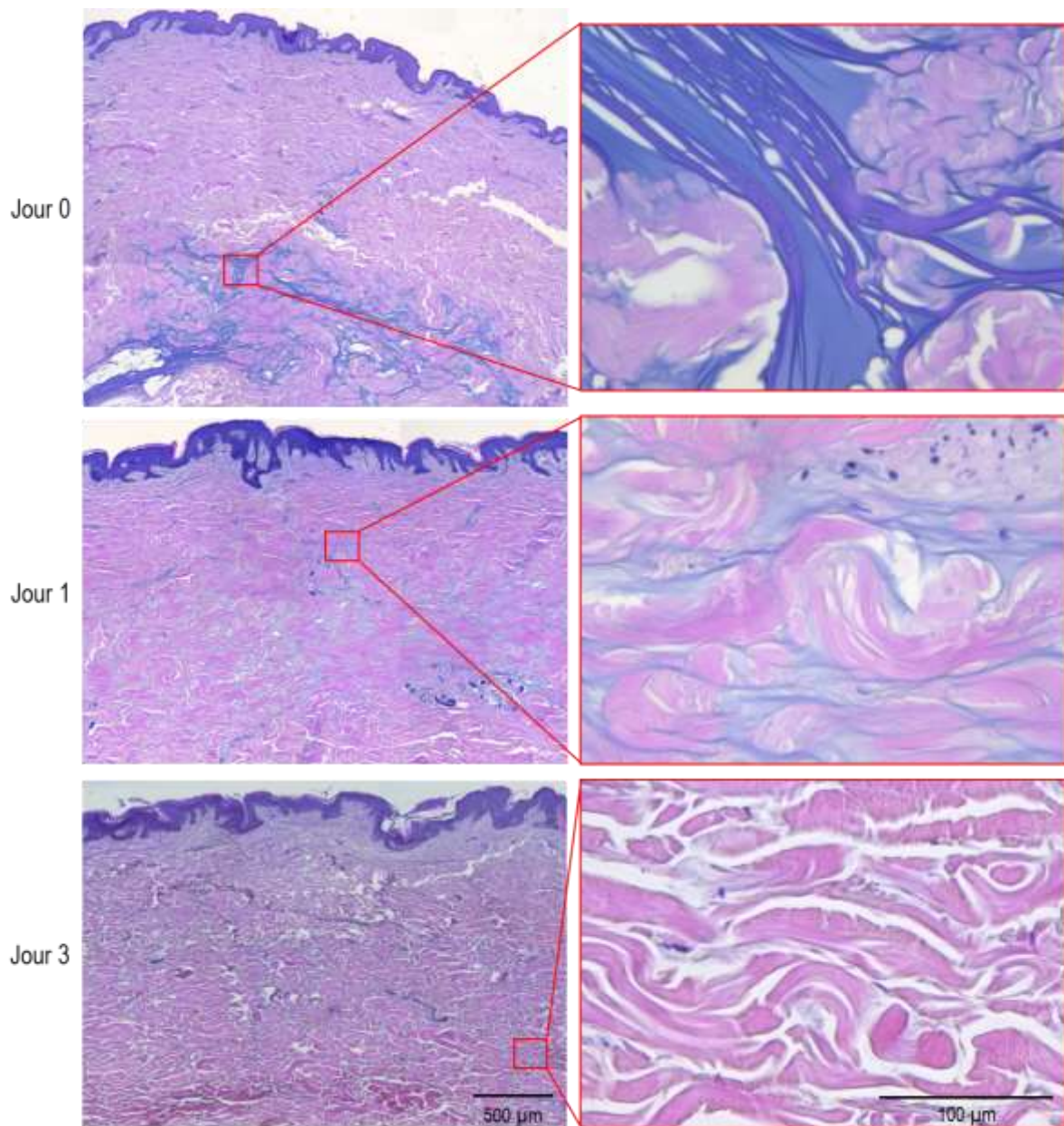
Afin de mieux caractériser ces observations macroscopiques, deux critères, représentatifs de l'intégrité du sphéroïde ont été analysés sur les images obtenues (**Figure 27B**) :

- la circularité du sphéroïde, permettant d'évaluer la préservation de sa structure.
- le nombre de particules fluorescentes présentes sur chaque image, permettant d'évaluer la quantité de cellules s'étant détachées du sphéroïde au cours de l'implantation.

L'analyse de la circularité des sphéroïdes implantés indique que leur structure est préservée lors de leur injection à l'aide d'une seringue, en solution liquide comme en solution visqueuse, tandis qu'une plus grande variabilité est observée lors de l'implantation en solutions visqueuse et gélifiée avec un piston, avec une diminution de leur circularité.

L'analyse du nombre de particules détectées pour chaque condition souligne quant à lui le détachement d'un nombre important de cellules du sphéroïde lors de son implantation en gélatine avec un piston ou en PBS. Les implantations en solution gélifiée à l'aide d'un piston et en solution visqueuse avec une seringue permettent de limiter la dispersion des cellules sans complètement la prévenir (**Figure 27B**).

Ces résultats indiquent ainsi que l'implantation en solution gélifiée avec un piston permet de limiter le détachement des cellules du sphéroïde, mais a un impact important sur sa structure. A l'inverse, les injections en solutions liquide et visqueuse à l'aide d'une seringue entraînent un détachement de cellules plus important, surtout en solution liquide, mais ont un impact moindre sur la structure des sphéroïdes. L'implantation en solution visqueuse avec un piston détruit quant à elle systématiquement le sphéroïde.



**Figure 28. Evolution de la gélatine injectée en culture.**

10-15  $\mu\text{L}$  de gélatine visqueuse ont été injectés dans le derme d'explants de peau. Les modèles NativeSkin® obtenus ont été cultivés 0, 1 ou 3 jours puis fixés en formaline. Une coloration à l'hématoxyline et éosine a été réalisée sur des coupes en paraffine de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Des images de la structure de la peau ont été prises à faible (5X) et fort (40X) grossissements. Les rectangles rouges délimitent les régions sur lesquelles une image à plus fort grossissement a été prise.

Au vu de ces résultats, **l'injection dans un petit volume de gélatine visqueuse semble la technique d'implantation la plus adaptée pour implanter de façon reproductible un sphéroïde intègre.**

Cette technique est par ailleurs la plus rapide des techniques testées : l'injection en PBS est plus difficile à réaliser et le volume de solution plus difficilement maîtrisable, les sphéroïdes ne flottant pas dans la solution ; l'implantation à l'aide d'un piston est quant à elle plus chronophage. Ces différents facteurs abondent dans le sens du choix de cette technique d'implantation.

### **3. Evaluation du taux de réussite d'implantation en gélatine visqueuse**

Le taux de réussite de l'implantation d'un sphéroïde dans une biopsie de peau dans la condition précédemment retenue a été évalué. Pour ce faire, 20 sphéroïdes ont été implantés dans le derme de 20 biopsies dans un petit volume de gélatine visqueuse à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue. Les modèles ont été fixés immédiatement après implantation puis transparisés avant d'être imagés au microscope puis analysés. Parmi les 20 sphéroïdes implantés, 18 ont été observables dans les explants de peau. **L'implantation en gélatine visqueuse est donc réussie dans 95% des cas.**

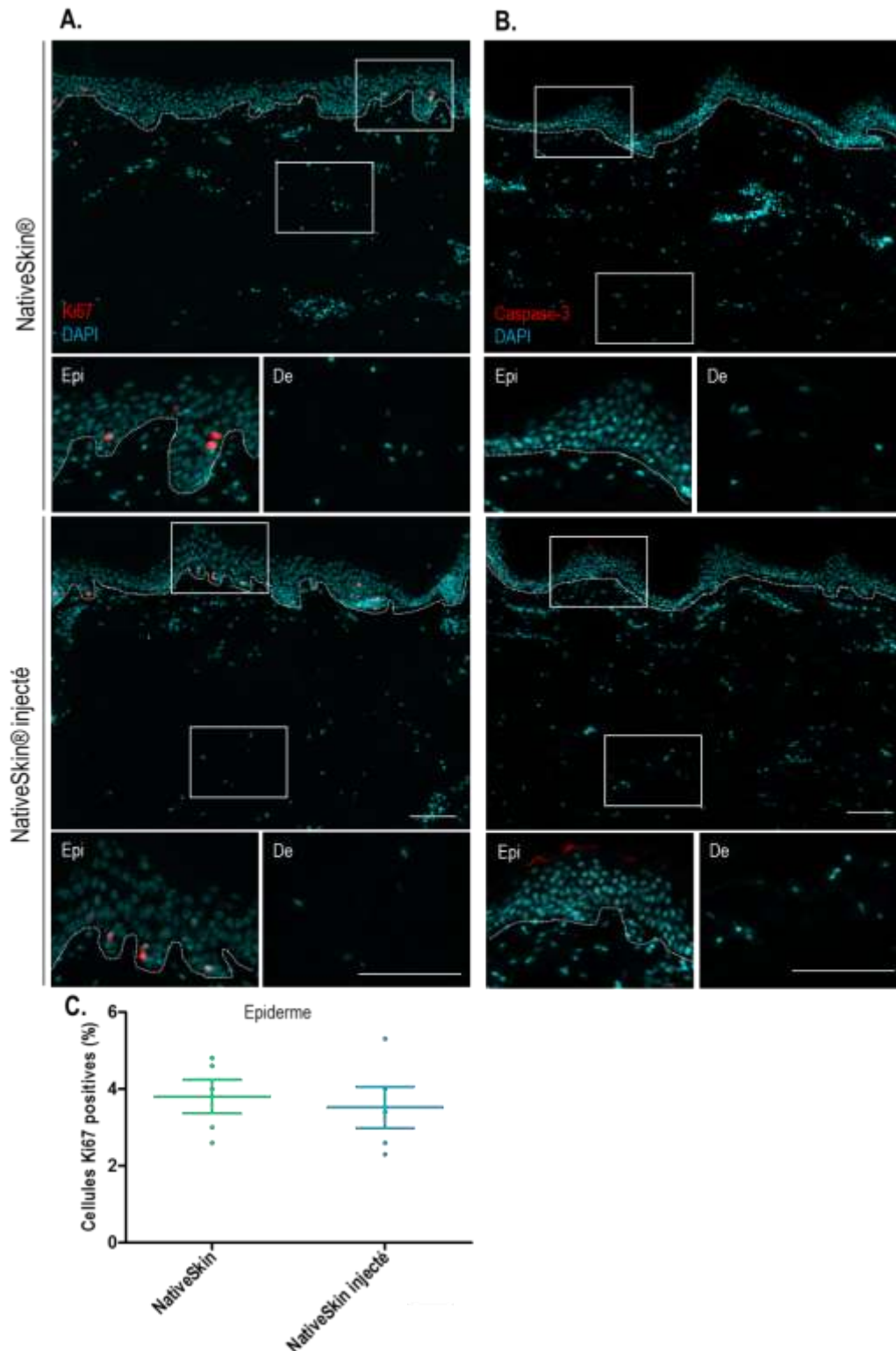
La cause probable des 5% d'échec a pu par la suite être estimée : si le biseau de l'aiguille est enfoncé trop profondément dans le derme et transperce entièrement la biopsie, même très légèrement, le sphéroïde peut s'échapper par la cavité créée à l'extrémité de l'explant au moment de l'injection de la solution. Cet événement reste cependant très ponctuel, et peut être prévenu en faisant attention à ce facteur au moment de l'injection.

### **4. Analyse de l'impact de l'injection de gélatine sur la viabilité cellulaire au sein des explants de peau**

Avant de valider la technique d'implantation en gélatine visqueuse, l'impact de l'injection de gélatine dans le derme des modèles NativeSkin® a été évalué. Les données bibliographiques indiquent que la gélatine est un composé biocompatible, ce qui suggère que son injection ne devrait pas altérer la viabilité des explants de peau (D. P. Clark, Hanke, and Swanson 1989). Un volume de gélatine visqueuse similaire à celui injecté lors de l'implantation d'un sphéroïde dans des explants de peau a été injecté dans des biopsies de peau. Les modèles NativeSkin® injectés ont ensuite été maintenus en culture pendant 3 jours.

Immédiatement après implantation, les colorations à l'hématoxyline et éosine révèlent la présence de gélatine dans le derme des explants de peau, caractérisée par une coloration à





**Figure 29. Caractérisation de l'expression des marqueurs de prolifération et d'apoptose Ki67 et caspase-3 dans les modèles NativeSkin® 24h après injection de la gélatine.**

Des modèles NativeSkin® standard ou injectés avec 10  $\mu$ L de gélatine visqueuse ont été cultivés pendant 24h avant d'être fixés en formaline et inclus en paraffine. Des marquages en immunofluorescence à l'aide d'anticorps dirigés contre Ki67 (A) ou la caspase-3 clivée (B) ont été réalisés sur des coupes de 5  $\mu$ m d'épaisseur. Les rectangles blancs délimitent les régions sur lesquelles un grossissement de l'épiderme (\*) ou du derme (\*) a été effectué. Les pointillés délimitent la jonction dermo-épidermique. Echelles : 100  $\mu$ m. (C) Le pourcentage de cellules marquées Ki67 dans l'épiderme de chacun des 5 réplicats a été reporté sur un graphique, sur lequel la moyenne et l'écart à la moyenne ont également été représentés.

l'hématoxyline plus prononcée, associée au pH légèrement acide de la gélatine (**Figure 28**). Ces fragments de gélatine forment des filaments relativement épais qui s'intègrent dans les fibres du derme sur plusieurs millimètres d'épaisseur. Après un jour de culture, plus aucun amas de gélatine n'est observable. En revanche, de fines fibres d'une couleur violette moins prononcée sont visibles et réparties de façon plus homogène dans le derme des explants. Après 3 jours de culture, plus aucun résidu de gélatine n'est retrouvé dans les explants de peau (**Figure 28**).

Ces observations indiquent tout d'abord que la gélatine se dissémine dans le derme des biopsies au moment de l'implantation, suggérant que dans le cas de l'implantation d'un sphéroïde, elle ne formera pas une capsule compacte autour de ce dernier, mais permettra d'étudier son évolution directement au contact de la matrice extracellulaire, et non au travers d'une couche de gélatine, et ce même très peu de temps après son implantation.

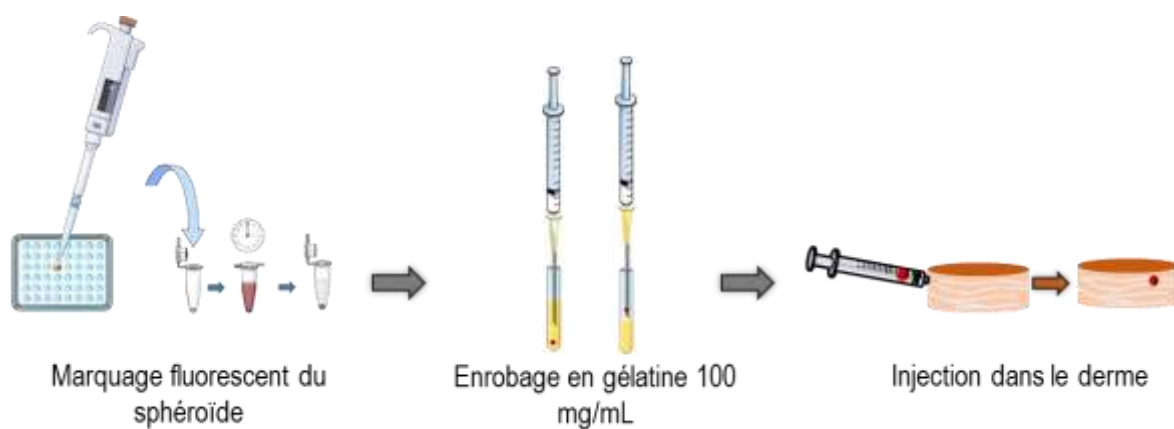
Par ailleurs, la gélatine disparaît rapidement au cours de la culture. Cette disparition pourrait être induite par l'action des gélatinases de la peau, ou simplement être liée à sa dilution progressive, la gélatine restant visqueuse à 37°C.

L'effet de l'injection de gélatine visqueuse dans le derme des modèles NativeSkin® sur leur viabilité a ensuite été évalué après un jour de culture en immunofluorescence sur coupes histologiques (**Figure 29**). Cette analyse a été réalisée sur 3 donneurs indépendants.

L'analyse des résultats révèle que le marqueur de prolifération Ki67 est exprimé par environ 4% des cellules de l'épiderme, localisées plus particulièrement dans la couche basale (**Figure 29A**). Aucune cellule du derme ne semble exprimer ce marquage, indiquant que seul un faible pourcentage de cellules de l'épiderme prolifère dans le modèle après un jour de culture (**Figure 29C**). Un profil d'expression similaire du marqueur est observable dans les modèles injectés avec la gélatine visqueuse, suggérant que l'injection de gélatine n'a pas d'effet négatif sur la prolifération cellulaire au sein du modèle NativeSkin®.

Les résultats de l'immunofluorescence de la forme activée de la caspase-3 indiquent qu'aucune cellule n'entre en apoptose dans les modèles standards après un jour de culture. De la même façon, aucun signal spécifique n'est observé dans les modèles injectés avec de la gélatine (seul un faible marquage aspécifique est parfois observable sur certaines zones de la couche cornée), révélant que l'injection de gélatine n'induit pas d'apoptose dans les modèles de peau après 1 jour de culture (**Figure 29B**).

**L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'injection de gélatine n'a pas d'impact sur la viabilité des modèles de peau ex vivo.**



**Figure 30. Schéma récapitulatif de la procédure d'obtention du modèle OncoSkin®.**

## 5. Procédure d'obtention du modèle OncoSkin®

L'ensemble des résultats obtenus nous a amené à valider la procédure d'implantation des sphéroïdes au sein du modèle NativeSkin® pour développer un modèle de mélanome *ex vivo*, appelé OncoSkin®. Ce modèle est cultivé d'une façon similaire à celle mise en œuvre dans le modèle NativeSkin® : les explants de peau implantés sont enrobés dans une matrice nourricière gélifiée et cultivés dans un insert de culture, à l'interface entre l'air et le milieu de culture.

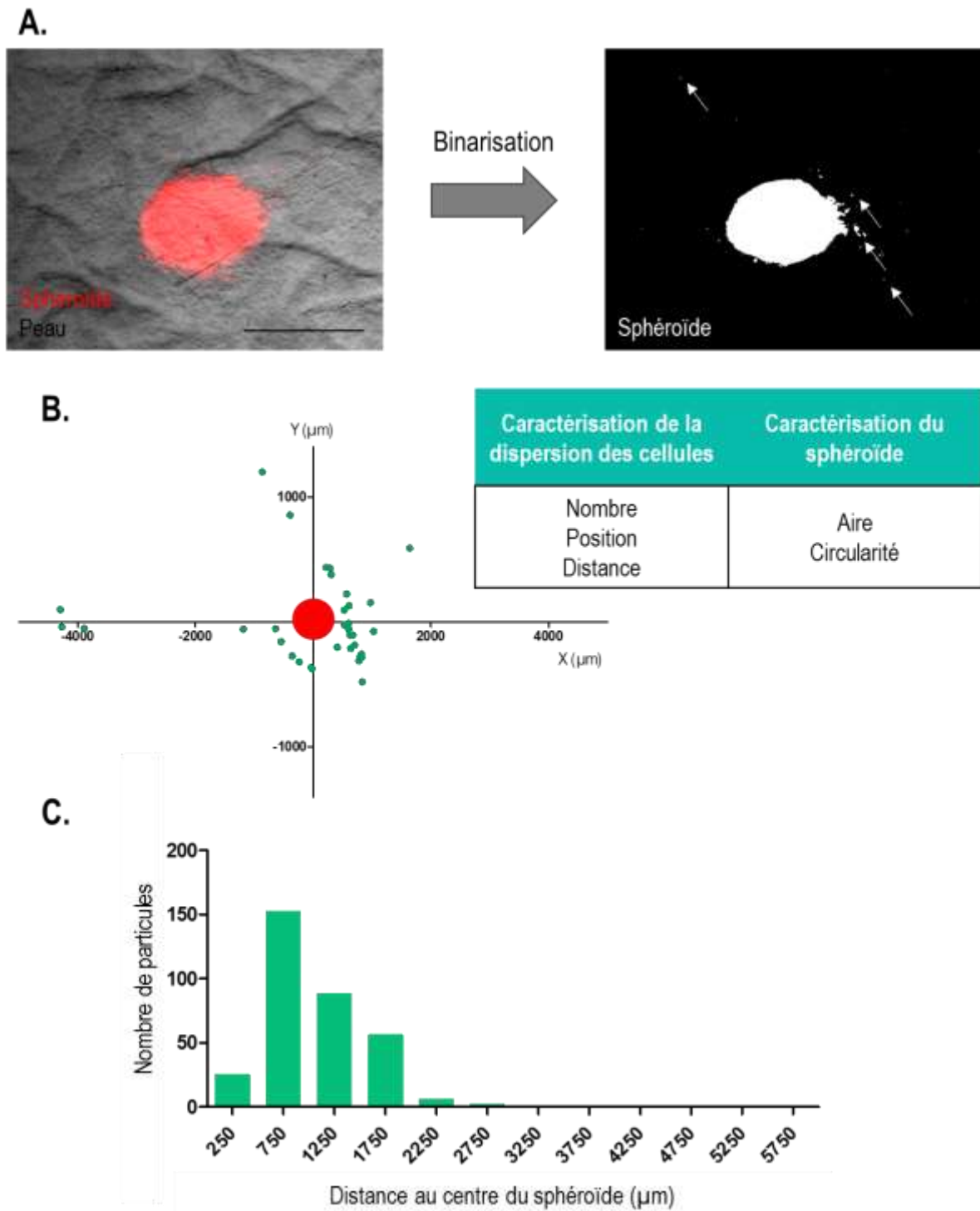
Au cours de cette procédure (schématisée en **Figure 30**), les sphéroïdes sont tout d'abord marqués à l'aide d'une sonde fluorescente cytoplasmique, afin de permettre leur identification dans la peau après injection sans engendrer de cytotoxicité.

Les sphéroïdes sont ensuite enrobés dans une solution de gélatine 100 mg/mL, maintenue à 37°C à l'état visqueux jusqu'à leur injection dans un petit volume de solution (de l'ordre de 15 µL) dans le derme des explants de peau, à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille biseautée.

Cette procédure a fait l'objet du dépôt d'un brevet le 10 février 2015, pour laquelle une extension PCT a été demandée en février 2016 (cf. **Annexe 1**).

- Le modèle OncoSkin® a été développé en implantant un sphéroïde unique de cellules tumorales dans le derme d'explants de peau humaine.
- Une procédure d'implantation a été spécifiquement développée pour produire le modèle de façon reproductible et a fait l'objet d'un dépôt de brevet.





**Figure 31. Procédure d'analyse de la migration des cellules du sphéroïde dans les explants de peau.**

Un modèle OncoSkin® implanté avec un sphéroïde de la lignée WM-266-4 a été fixé immédiatement après implantation puis transparaïsé. Des images de la fluorescence du sphéroïde et de la peau en lumière transmise ont été acquises au microscope (A). Un seuil a ensuite été appliqué sur l'image de la fluorescence du sphéroïde. À partir de cette image binarisée, la position de chaque particule a été récupérée et tracée sur un graphe (B). La distance de chaque particule détectée par rapport au centre du sphéroïde a été calculée et la distribution des particules en fonction de leur distance au sphéroïde a été tracée sur un histogramme (C). Barre d'échelle : 1 mm.

## Partie 2 : Application du modèle OncoSkin® à l'étude du mélanome : développement de stratégies d'analyse

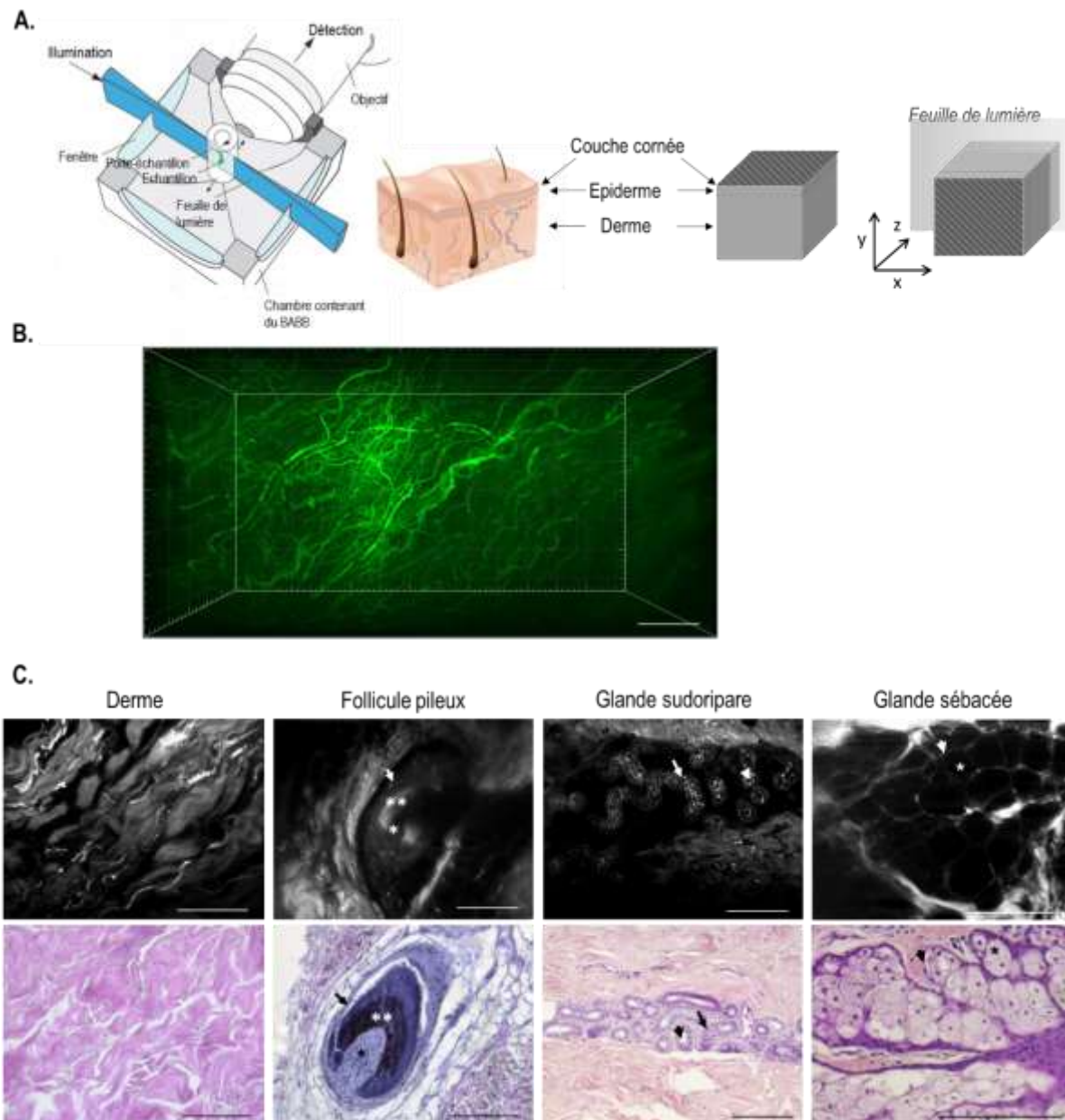
L'objectif initialement fixé de ce projet est la commercialisation d'un modèle OncoSkin® permettant d'une part l'étude du mélanome et de son développement au sein de la peau, et d'autre part l'évaluation du potentiel thérapeutique de candidats médicaments.

Dans cette optique, le modèle a été développé pour permettre l'analyse de différents paramètres d'étude : outre les traditionnelles analyses histologiques et biochimiques pouvant être effectuées sur le modèle, le marquage fluorescent des sphéroïdes avant leur implantation et la transparençisation de l'explant permet d'identifier les cellules du sphéroïde de celles de la peau et d'accéder à la totalité du volume du modèle OncoSkin®. Cette caractéristique rend possible le suivi de la dispersion des cellules du sphéroïde dans le derme des explants de peau, mais également celui du volume du sphéroïde au cours de sa culture dans la peau.

### 1. Analyse de la migration des cellules tumorales à l'échelle macroscopique

Durant la phase initiale de développement du modèle OncoSkin®, la réussite de l'implantation de sphéroïdes dans les biopsies de peau a été évaluée à l'aide d'images macroscopiques de la fluorescence du sphéroïde au sein des explants de peau après transparençisation. Il est apparu au cours de ces analyses que cette technique permet d'évaluer l'intégrité de sa structure et de distinguer les cellules détachées du sphéroïde au cours de l'implantation. Cette méthode, appliquée sur des explants à différents temps après implantation, pourrait donc permettre d'évaluer l'aspect général du sphéroïde mais également la migration des cellules du sphéroïde dans la peau. Nous avons donc caractérisé sur les images obtenues la dispersion des cellules au sein des explants.

La combinaison des images acquises en lumière transmise et en fluorescence permet tout d'abord de localiser le sphéroïde au sein de la biopsie (**Figure 31A**). L'image de la fluorescence peut ensuite être exploitée afin d'évaluer d'une part l'aspect général de la micro-tumeur et de caractériser quantitativement sa circularité et son aire, et d'autre part la dispersion de ses cellules au sein de l'explant de peau. Une fois l'image binarisée, la position de chaque point de signal, correspondant à une cellule ou un amas de cellules, peut être récupérée et représentée graphiquement (**Figure 31B**), permettant ainsi une comparaison visuelle rapide de la quantité et de la position des cellules ayant migré hors du sphéroïde. A partir de ces données, **la distribution de la dispersion des cellules peut également être évaluée, permettant de caractériser les distances de migration des cellules.**



**Figure 32. Identification de la structure du derme et d'annexes cutanées dans des explants de peau humaine à l'aide de leur autofluorescence au SPIM.**

Des biopsies de peau ont été fixées en formaline puis transparentées. **(A)** Schémas de montage du SPIM (adapté de Huisken et al. 2004) et de l'orientation des biopsies de peau transparentées par rapport à la feuille de lumière. **(B)** Une acquisition de l'autofluorescence des fibres du derme a été réalisée sur une profondeur de 500  $\mu\text{m}$  (excitation à 491 nm, filtre d'émission 510/20). La visualisation volumique du stack sous Imaris® est présentée. **(C)** Des sections optiques du derme, du bulbe d'un follicule pileux ( flèche : gaine épithéliale, \* papille dermique, \*\* tige pileuse), d'une glande sudoripare (flèche : conduit sudoripare, tête de flèche : lumière du conduit) et d'une glande sébacée (tête de flèche et \* : membrane et cytoplasme des cellules sécrétrices de sébum respectivement) ont extraites d'acquisitions au SPIM de l'autofluorescence de la peau (excitation 491 nm, filtre d'émission 510/20) et sont comparées à leur structure en coloration Hématoxyline et Eosine réalisée sur des coupes en paraffine de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Barres d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

**L'ensemble de ces données permet ainsi d'obtenir rapidement des informations sur l'aspect général du sphéroïde implanté et la dispersion des cellules qui le constituent dans le derme des explants de peau.** Appliquée au cours de la culture du modèle dans des conditions standard ou dans le cadre de l'évaluation de l'effet d'un composé thérapeutique, cette méthode d'analyse pourrait permettre d'évaluer l'évolution du sphéroïde implanté dans des conditions standard de culture ou l'effet d'un composé thérapeutique sur l'invasion des cellules tumorales dans le microenvironnement sain et l'aire de la micro-tumeur. La simplicité de cette technique d'analyse rend son utilisation parfaitement possible dans le cadre d'une analyse de molécules thérapeutiques.

## **2. Analyse en trois dimensions de l'évolution du volume de la micro-tumeur**

Une seconde technique d'analyse du modèle à l'échelle microscopique a été développée au cours de ce projet, reposant sur l'imagerie des modèles OncoSkin® transparisés par microscopie à feuille de lumière sur un SPIM (Selective Plane Illumination Microscope) (**Figure 32A**). Cette méthode a été sélectionnée parmi les différentes techniques de microscopie existantes pour les possibilités car elle permet d'imager rapidement en trois dimensions et en profondeur de larges échantillons avec une résolution à l'échelle cellulaire ou sub-cellulaire (Lorenzo et al. 2011).

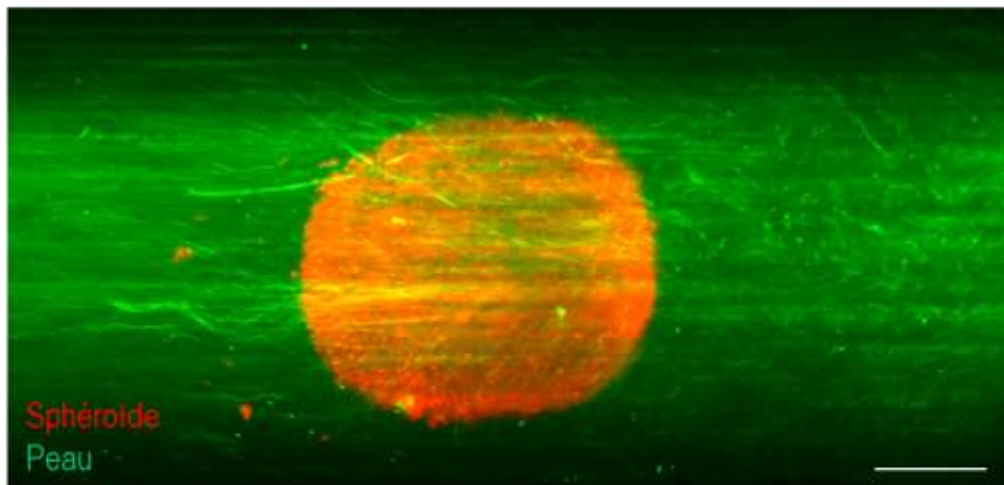
Nous avons tout d'abord évalué le potentiel de cette technologie sur des explants de peau transparisés puis appliqué cette technique à l'imagerie du modèle OncoSkin® afin de pouvoir caractériser l'évolution du volume du sphéroïde implanté avec précision.

### **2.1 Application de la microscopie à feuille de lumière à l'imagerie d'explants de peau**

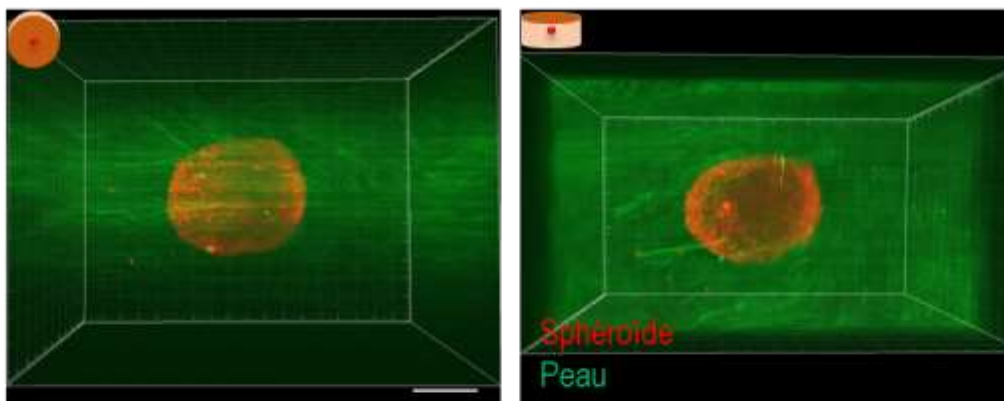
Nous avons tout d'abord évalué la faisabilité d'imager en microscopie à feuille de lumière des biopsies de peau humaine *ex vivo*.

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'imagerie du derme, les sphéroïdes implantés dans le modèle OncoSkin® étant localisés dans ce compartiment cutané. Des biopsies de peau ont été fixées puis transparisées avant d'être imagées au SPIM. Les échantillons ont été orientés de façon à ce que la feuille de lumière traverse le derme des biopsies uniquement (**Figure 32A**). Après plusieurs tests, ce positionnement des biopsies s'est en effet révélé être le plus adéquat pour imager le derme avec une bonne résolution, l'épiderme restant plus difficile à traverser malgré sa transparisation.

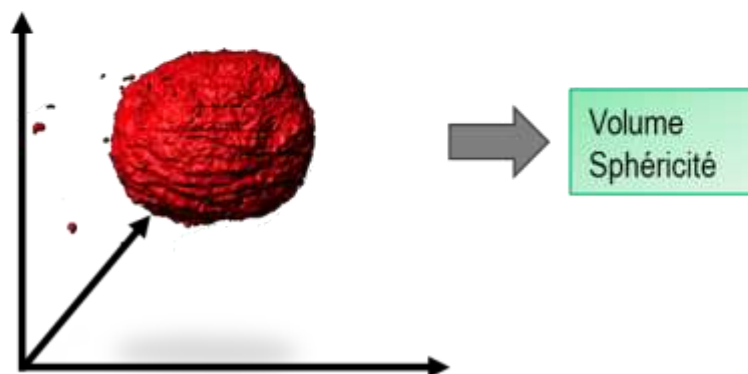
A.



B.



C.



**Figure 33. Co-visualisation de l'autofluorescence de la peau et de la fluorescence d'un sphéroïde de HCT116 en 3 dimensions à l'aide du SPIM.**

Un explant de peau a été implanté avec un sphéroïde de la lignée HCT116 et fixé en formaline immédiatement après implantation, puis transparaïsé. Une double acquisition de l'autofluorescence de la peau (excitation 491 nm, filtre d'émission 510/20) et de la fluorescence du sphéroïde (excitation 532 nm, filtre d'émission 593 LP) a été réalisée au SPIM sur une profondeur de 1 mm. Une projection d'intensité maximale de cette acquisition est présentée (A), ainsi que des visualisations volumiques sous 2 angles d'orientation différents obtenues avec le logiciel Imaris®. Une segmentation de la structure du sphéroïde a été réalisée avec le logiciel Imaris® (C). Barres d'échelle : 200  $\mu$ m.



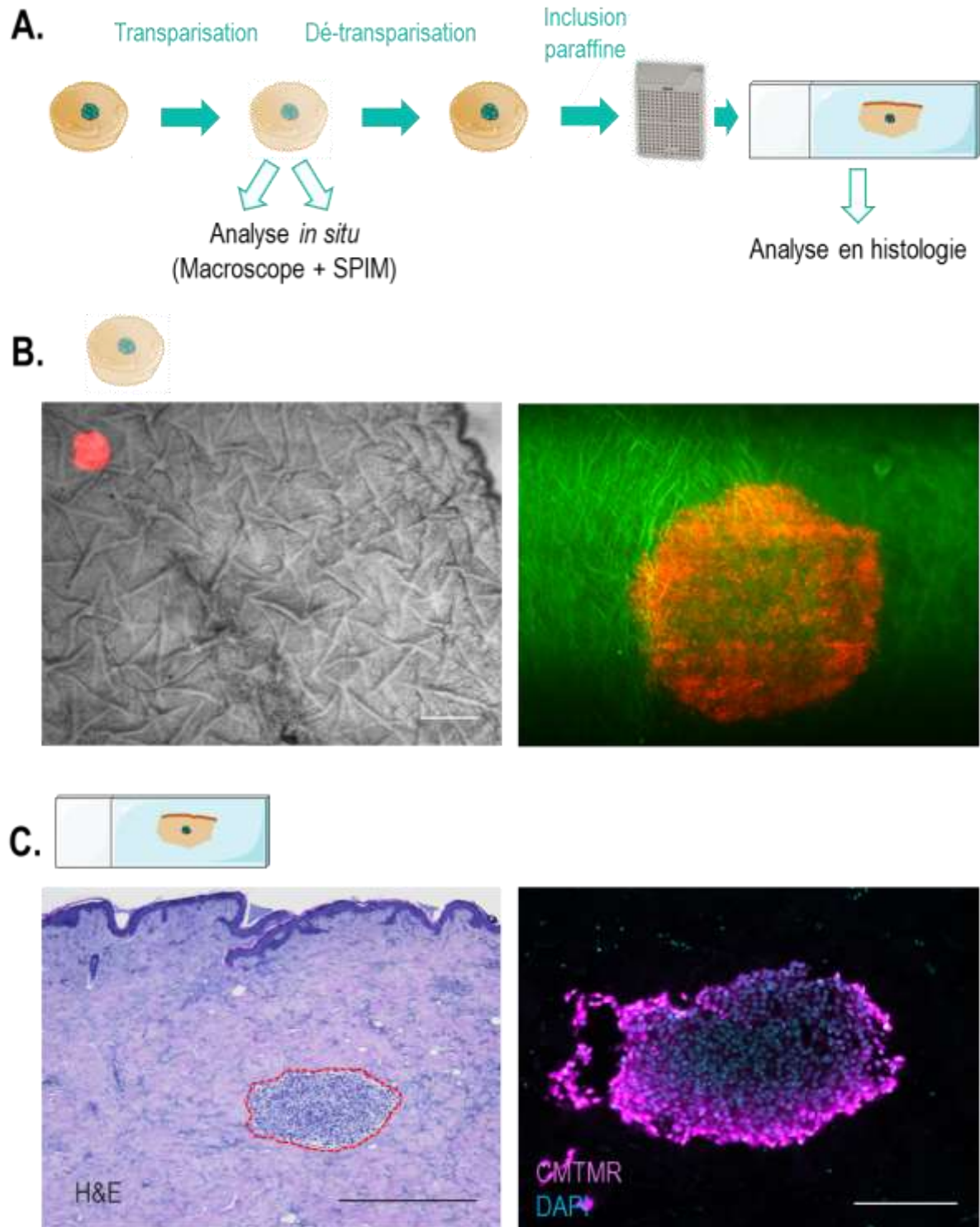
Les échantillons ont été excités à 491 nm et imagés sur 500 µm de profondeur (**Figure 32B**). Sur les acquisitions réalisées, différents types de structures sont identifiables en autofluorescence. Tout d'abord, les différentes fibres constituant la matrice extracellulaire du derme présentent une autofluorescence qui leur est propre, permettant d'observer les fibres de collagène, assemblées en fibres larges, et les fibres élastiques, plus fines et caractérisées par un signal plus intense. L'image en 3 dimensions du volume de l'acquisition permet de visualiser l'organisation des fibres d'une façon globale.

L'exploration du derme des explants de peau a ensuite permis d'observer différentes annexes, identifiables par comparaison avec des colorations H&E réalisées sur des coupes en paraffine (**Figure 32C**). Différents constituants du bulbe de follicules pileux ont ainsi été caractérisés : la papille dermique (**Figure 32C \***), localisée au centre de la structure, ne présente pas d'autofluorescence particulière. A l'inverse, la tige pileuse (**Figure 32C \*\***), entourant la partie supérieure de la papille dermique, est caractérisée par une forte autofluorescence. La gaine épithéliale interne est quant à elle visualisée grâce à une fluorescence plus faible. D'autres annexes telles que les glandes sudoripares (**Figure 9.C.e**) sont également visualisées en autofluorescence. Les conduits entrelacés présentant une cavité non fluorescente en leur centre sont clairement identifiables. De la même façon, la structure acinaire des glandes sébacées est caractérisée par un réseau présentant une autofluorescence entourant des alvéoles non fluorescentes, correspondant aux cellules contenant du sébum (**Figure 32C**).

**Nous avons ainsi montré qu'il est possible d'imager au SPIM le derme d'explants de peau humaine après transparisation et d'identifier les différentes structures qui le constituent à l'aide de leur autofluorescence** (manuscrit en préparation).

## 2.2 Analyse en microscopie à feuille de lumière du modèle OncoSkin®

Les conditions d'imagerie d'explants de peau au SPIM ont été appliquées à l'imagerie des modèles OncoSkin® implantés avec un sphéroïde après transparisation (**Figure 33**). Le modèle du sphéroïde d'adénocarcinome colorectal HCT116, couramment étudié au sein de l'équipe, a été choisi pour réaliser cette étude. Des acquisitions ont été réalisées sur la totalité de l'épaisseur du sphéroïde aux longueurs d'onde 491nm pour visualiser l'autofluorescence de la peau et 532 nm pour visualiser le sphéroïde marqué grâce au marqueur CMTMR®. Cette technique permet de visualiser l'ensemble du sphéroïde et de son microenvironnement.



**Figure 34. Combinaison des analyses macroscopique, en trois dimensions et en histologie pour étudier l'évolution d'un sphéroïde de la lignée HCT116 implanté.**

**A.** Représentation schématique des différentes phases du procédé d'analyse. **B.** Les analyses de la structure du sphéroïde implanté au microscope et au SPIM sont réalisées sur des modèles transparisés (barres d'échelle : 1 mm). **C.** Les échantillons sont ensuite dé-transparisés et inclus en paraffine. Une coloration Hématoxyline et Eosine (barre d'échelle : 1 mm) et une contre coloration des noyaux au DAPI (barre d'échelle : 200  $\mu$ m) ont été réalisées sur des coupes de 10  $\mu$ m d'épaisseur. Sur la coloration H&E, des pointillés rouges délimitent la structure du sphéroïde.

Par ailleurs, les piles d'images acquises peuvent être visualisées en trois dimensions, permettant d'évaluer la structure du sphéroïde implanté sur la totalité de son volume et d'observer une éventuelle déformation (**Figure 33B**). A partir de ces images, la structure du sphéroïde peut être segmentée, donnant accès à la quantification de différents paramètres de volume et de forme (**Figure 33C**).

**Les modèles OncoSkin® peuvent ainsi être analysés en trois dimensions à l'aide de la microscopie à feuille de lumière, permettant l'évaluation précise du volume et de la forme des sphéroïdes implantés.**

### **3. Caractérisation du devenir de la micro-tumeur en histologie**

Les analyses précédemment décrites du modèle OncoSkin® à l'échelle macroscopique et en 3 dimensions fournissent des informations générales sur la morphologie du sphéroïde et la migration des cellules qui le constituent, mais ne fournissent pas à elles seules d'informations sur la viabilité du sphéroïde ou l'expression de marqueurs spécifiques. Afin d'accéder à ces données, ces analyses peuvent être complétées par la caractérisation du modèle en histologie.

Dans ce but, un procédé de dé-transparisation des modèles OncoSkin® a été mis au point afin de permettre leur inclusion en paraffine (**Figure 34A**). Les modèles OncoSkin® sont ensuite intégralement coupés en série. Le sphéroïde est identifié au sein du derme à l'aide de son marquage fluorescent (**Figure 34C**). Les coupes contenant une section du sphéroïde peuvent alors être analysées en histologie, afin de caractériser la structure du sphéroïde, à l'aide par exemple de colorations à l'hématoxyline et éosine (**Figure 34C**), sa viabilité, ou l'expression de marqueurs spécifiques.

**Ce procédé permet ainsi de caractériser un même échantillon aux différentes échelles macroscopique, microscopique et en histologie.**

- Un procédé d'analyse a été développé pour permettre la caractérisation d'un même échantillon aux échelles macroscopique, microscopique et en histologie.
- La transparence des explants de peau a été mise au point pour permettre l'imagerie rapide des modèles à l'échelle macroscopique et l'imagerie du sphéroïde implanté en 3 dimensions.
- L'imagerie de l'autofluorescence de la peau par microscopie à feuille de lumière permet d'explorer la structure du derme et des annexes cutanées.





## Partie 3 : Caractérisation de la viabilité cellulaire du sphéroïde au sein du modèle OncoSkin®

Une fois le modèle OncoSkin® développé, nous nous sommes intéressés à son évolution en culture, et plus particulièrement à celle du sphéroïde implanté.

### 1. Caractérisation de la viabilité cellulaire des sphéroïdes de cellules de la lignée WM-266-4 implantés

L'objectif final du projet est de pouvoir proposer le modèle OncoSkin® avec différentes lignées cellulaires ou cultures primaires. Dans le cadre du développement du modèle et de sa caractérisation, la lignée de mélanome humain WM-266-4 a tout d'abord été sélectionnée. Ce choix a été porté par différents arguments.

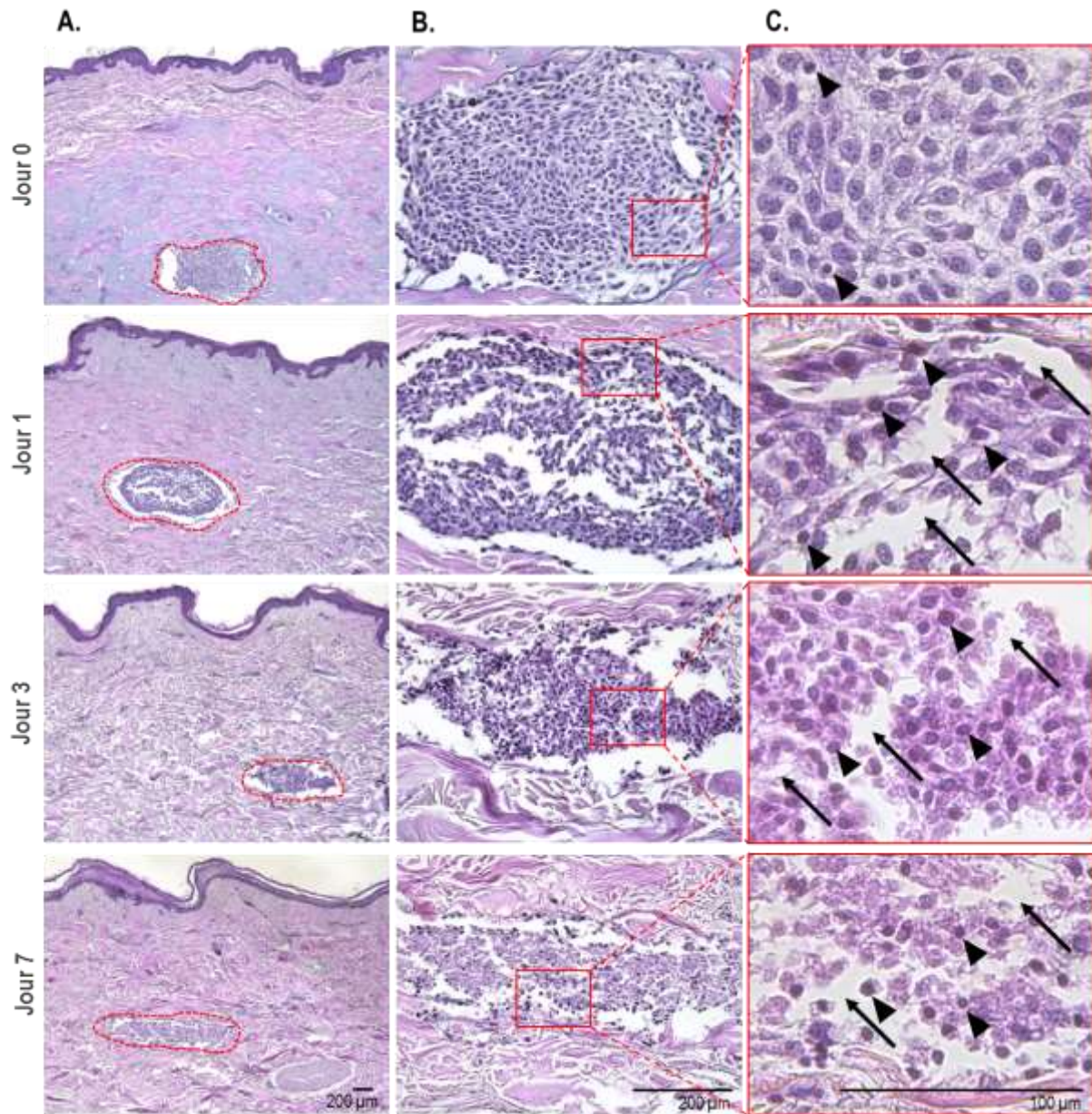
Tout d'abord, cette lignée forme des sphéroïdes dans des conditions de culture simples – aucun supplément n'est nécessaire à leur milieu de culture en 2D pour leur permettre de former des sphéroïdes en puits de plaque 96 puits.

Par ailleurs, cette lignée, issue d'une métastase cutanée, a été établie à partir du même patient que la lignée WM-115, établie à partir de la tumeur primaire à un stade plus précoce de la pathologie. Bien que ces deux lignées possèdent des profils mutationnels similaires pour les mutations étudiées les plus majoritairement dans le cas du mélanome (les gènes BRAF, CDKN2A et PTEN sont notamment mutés), il pourra être intéressant de comparer leur évolution au sein du modèle OncoSkin®.

Afin de favoriser la viabilité du sphéroïde dans les explants de peau, nous avons choisi de cultiver dans un premier temps les modèles OncoSkin® avec le milieu de culture habituel des sphéroïdes, c'est-à-dire le milieu DMEM complémenté avec 10 % de SVF, plutôt que le milieu des modèles NativeSkin®, qui ne contient pas de sérum et ne permet pas la croissance des sphéroïdes *in vitro* (résultats non présentés).

La viabilité du sphéroïde au sein du modèle OncoSkin® a été évaluée en duplicats sur 3 expériences indépendantes durant sept jours de culture au moyen de différentes techniques en histologie :

- L'évaluation de la structure du sphéroïde à l'aide d'une coloration à l'hématoxyline et éosine
- L'évaluation de la prolifération des cellules du sphéroïde avec le marqueur Ki67



**Figure 35. Evolution de la structure du modèle OncoSkin® en culture.**

Les modèles OncoSkin® implantés avec un sphéroïde de la lignée WM-266-4 ont été cultivés 0, 1, 3 ou 7 jours puis fixés en formaline et inclus en paraffine. Une coloration à l'hématoxyline et éosine a été réalisée sur des coupes de 10 µm d'épaisseur. **A.** Les pointillés rouges délimitent le contour des sphéroïdes implantés. **B.** Les rectangles rouges entourent une zone du sphéroïde sur laquelle un zoom est effectué pour permettre d'observer la morphologie des cellules. **C.** Les têtes de flèche pointent des noyaux pycnotiques, tandis que les flèches soulignent les interstices au sein du sphéroïde et entre le sphéroïde et le derme des explants.

- L'évaluation de la mortalité cellulaire au sein du sphéroïde avec un marqueur d'apoptose, la Caspase-3 active

Pour chacun de ces paramètres, les résultats obtenus sur un réplicat représentatif de l'état du sphéroïde sont présentés (**Figures 35 à 37**).

### 1.1 Evaluation de la structure du sphéroïde

Les colorations Hématoxyline et Eosine réalisées mettent tout d'abord en évidence la présence systématique d'un sphéroïde dans le derme des modèles analysés immédiatement après implantation (**Figure 35**). Des résidus de gélatine, marqués par une coloration violette, sont systématiquement visibles dans les modèles fixés le jour de l'implantation. Leur répartition semble homogène dans le derme des explants et n'empêche pas le sphéroïde implanté d'être au contact de la peau.

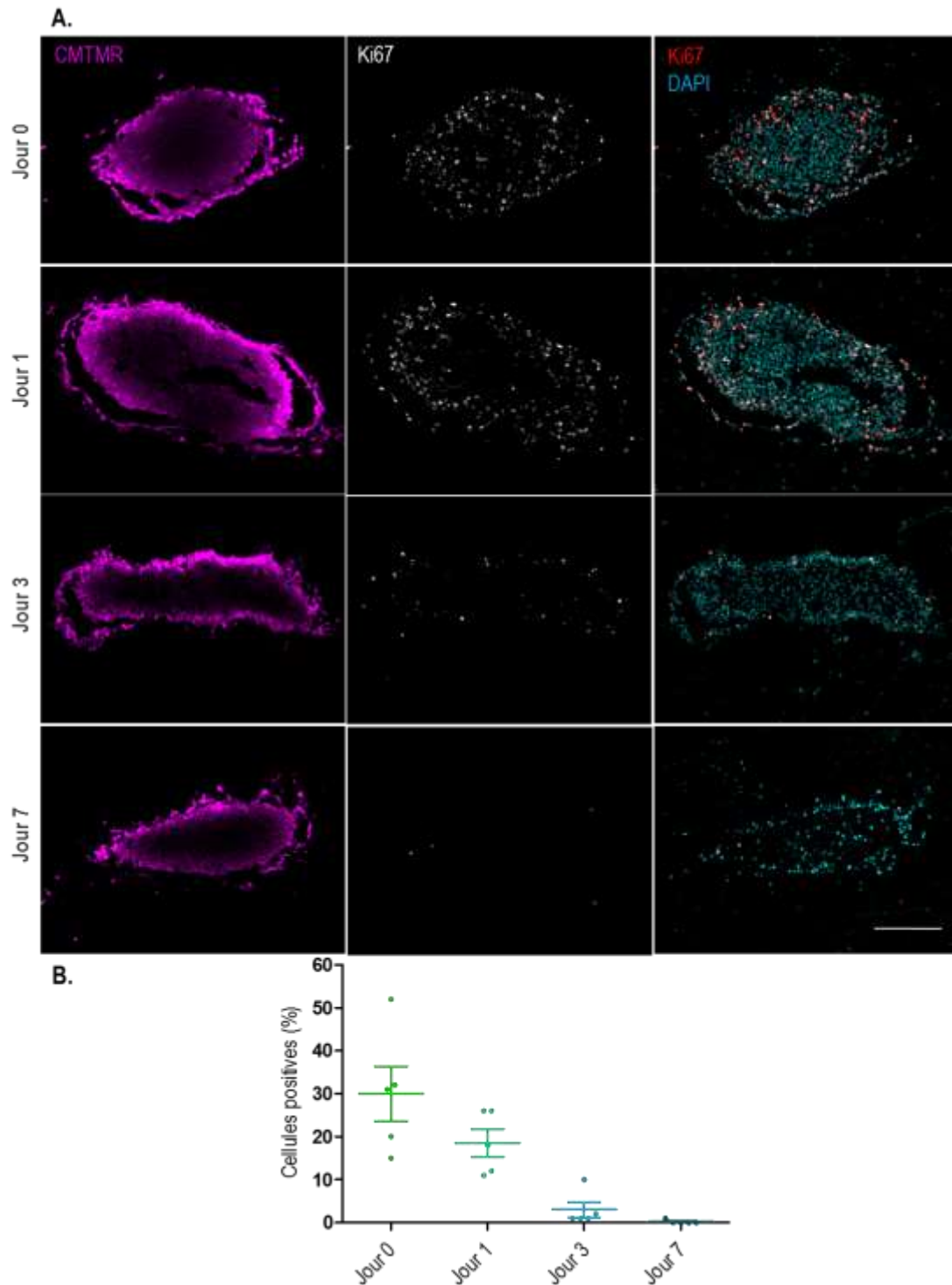
Les cellules des sphéroïdes fixés après leur implantation (**Figure 35, jour 0**) présentent une morphologie normale : leur cytoplasme est visible et homogène autour des noyaux, marqués d'une coloration violette plus prononcée. Par ailleurs, aucun espace vide n'est observable au sein du sphéroïde. Ces différents éléments morphologiques indiquent que le sphéroïde est intègre et viable après implantation.

Après un jour de culture (**Figure 35, jour 1**), l'analyse visuelle de la structure des sphéroïdes montre un changement important de la morphologie des cellules qui le constituent : leurs cytoplasmes sont moins visibles et semblent rétractés, et la majorité des noyaux arbore une coloration plus foncée et paraît plus condensée. Ces changements morphologiques sont caractéristiques du phénomène de pycnose, survenant lors de la mort des cellules.

Par ailleurs, la structure du sphéroïde semble également perdre son intégrité : les images des colorations révèlent la présence d'interstices entre le sphéroïde et le derme d'une part, et de fentes au sein de la structure même du sphéroïde d'autre part. Ces artefacts sont induits par le procédé de déshydratation et d'inclusion en paraffine des échantillons et particulièrement exacerbés lorsque ceux-ci sont fragilisés. L'observation de ce changement de structure semble donc indiquer que le sphéroïde se dégrade dans le derme des explants de peau.

Ces différents phénomènes sont également observables de façon similaire après 3 et 7 jours de culture des modèles OncoSkin® (**Figure 35, jours 3 et 7**).

De plus, après 7 jours de culture, la structure générale du sphéroïde apparaît plus claire que sur les autres points de la cinétique, semblant indiquer une densité cellulaire plus faible au sein de sa structure (**Figure 35, jour 7**).



**Figure 36. Evaluation de la prolifération des cellules du sphéroïde implanté en culture.**

Les modèles OncoSkin® implantés avec un sphéroïde de la lignée WM-266-4 ont été cultivés 0, 1, 3 ou 7 jours puis fixés en formaline et inclus en paraffine. Le marquage de Ki67 en immunofluorescence a été réalisé sur des coupes de 10 µm d'épaisseur. **A.** Gauche : fluorescence du CMTMR permettant de visualiser le sphéroïde. Milieu : Immunofluorescence anti-Ki67. Droite : Signal de fluorescence correspondant au marqueur Ki67 (rouge), les noyaux sont visualisés grâce à un marquage avec du DAPI (bleu). **B.** Le graphe représente le pourcentage de cellules WM266-4 Ki67 positives. Chaque point correspond à une coupe d'un sphéroïde différent et la moyenne et l'écart à la moyenne sont représentés. Barre d'échelle : 200 µm.



**L'ensemble de ces observations suggère une altération de la viabilité des sphéroïdes implantés : ceux-ci perdent en effet très rapidement l'intégrité de leur structure, et une grande partie des cellules qui les constituent semble ne pas survivre.**

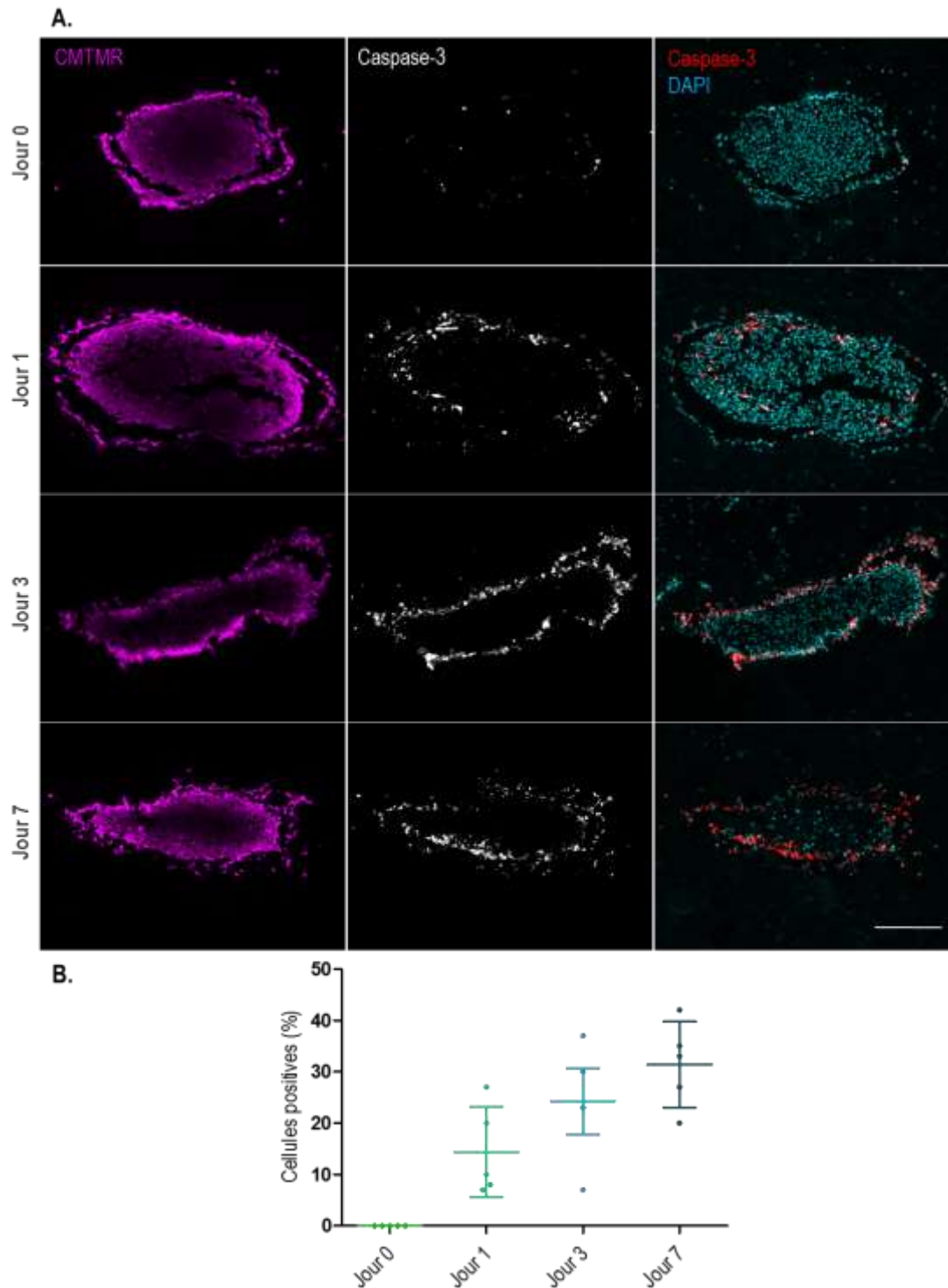
Enfin, il est également intéressant de noter qu'au cours de chaque expérience conduite, les sphéroïdes subissent une déformation systématique de leur structure : de forme circulaire au moment de leur implantation, elle s'aplatit une fois les sphéroïdes cultivés dans les modèles OncoSkin®. Cette déformation s'effectue toujours parallèlement à l'épiderme. Ce phénomène est visible de façon légère dès un jour de culture, et semble s'accroître avec des temps de culture plus longs.

### 1.2 Evaluation de la prolifération des cellules du sphéroïde

L'étude de l'expression du marqueur de prolifération Ki67 semble cohérente avec les phénomènes observés sur la coloration Hématoxyline et Eosine (**Figure 36**).

Immédiatement après implantation, un grand nombre de cellules positives pour Ki67 est détecté au sein du sphéroïde, indiquant que le sphéroïde est viable et que la majorité des cellules qui le constituent prolifèrent au moment de son implantation (**Figure 36A, jour 0**). Cependant, après 1 jour de culture, une diminution de l'intensité du marquage est observée. Cette observation suggère une perte de la prolifération des cellules du sphéroïde. Après 3 jours de culture, seulement un nombre réduit de cellules est encore faiblement marqué. Après 7 jours de culture, plus aucune cellule marquée n'est détectée (**Figure 36A, jours 1, 3 et 7**). Ces observations semblent donc indiquer que les cellules du sphéroïde perdent rapidement leur capacité à proliférer dans le modèle OncoSkin®.

La quantification du nombre de cellules positives au sein du sphéroïde confirme ces observations : environ 30% des cellules du sphéroïde sont marquées immédiatement après implantation. Ce ratio chute rapidement à 20% après 1 jour de culture, pour atteindre moins de 10% après 3 jours. Après 7 jours de culture, plus aucune cellule n'est marquée (**Figure 36B**). **Ces résultats permettent donc de conclure que les cellules du sphéroïde cessent très rapidement de proliférer après leur implantation.**



**Figure 37. Evaluation de l'expression de la caspase-3 dans les cellules du sphéroïde implanté en culture.**

Les modèles OncoSkin® implantés avec un sphéroïde de la lignée WM-266-4 ont été cultivés 0, 1, 3 ou 7 jours puis fixés en formaline et inclus en paraffine. Le marquage de la forme active de la caspase-3 en immunofluorescence a été réalisé sur des coupes en paraffine de 10 µm d'épaisseur. **A.** Gauche : fluorescence du CMTMR permettant de visualiser le sphéroïde. Milieu : Immunofluorescence anti-caspase-3 active. Droite : Signal de fluorescence correspondant au marqueur caspase-3 active (rouge), les noyaux sont visualisés grâce à un marquage avec du DAPI (bleu). **B.** Le graphe représente le pourcentage de cellules WM-266-4 caspase-3 active positives dans les 5 assises cellulaires périphériques. Chaque point correspond à une coupe d'un sphéroïde différent et la moyenne et l'écart à la moyenne sont représentés. Barre d'échelle : 200 µm.

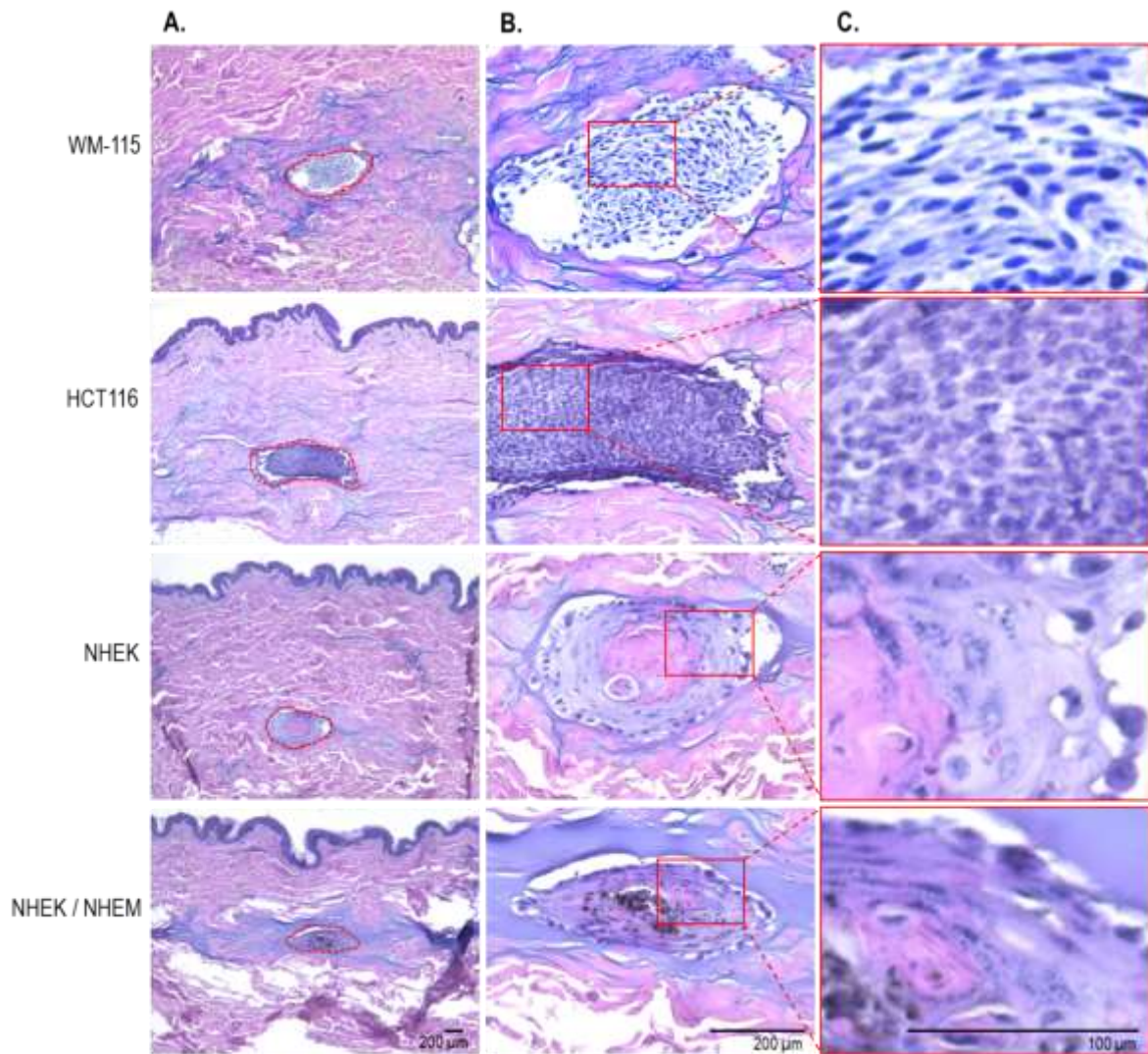
### 1.3 Evaluation de la mortalité cellulaire au sein du sphéroïde

L'analyse de l'expression de la forme active de la caspase-3 en immunofluorescence au sein des cellules du sphéroïde implanté indique qu'au moment de l'implantation, seulement quelques cellules du sphéroïde apparaissent marquées (**Figure 37**). Après seulement 1 jour de culture du modèle OncoSkin®, un signal plus important est détecté, principalement au niveau des cellules situées à la périphérie du sphéroïde et en contact direct avec la peau. Ce marquage de la couronne extérieure du sphéroïde est également observable après 3 et 7 jours de culture des modèles. Quelques cellules détachées du sphéroïde, identifiées à l'aide de leur marquage cytoplasmique au CMTMR, sont détectées après 7 jours de culture. Ces cellules expriment également la caspase-3 active (**Figure 37A, jours 1, 3 et 7**).

Une quantification du nombre de cellules marquées au niveau de la couronne extérieure des sphéroïdes a été réalisée. Pour cela, les cellules des 5 assises cellulaires le plus périphériques ont été prises en compte. Immédiatement après implantation, aucun marquage n'est détecté dans les couches périphériques des sphéroïdes. Après 1 jour de culture, environ 15% de ces cellules présentent un marquage positif. Le pourcentage de cellules positives au marquage ne cesse ensuite d'augmenter, jusqu'à s'étendre à plus de 30% des cellules de la périphérie des sphéroïdes (**Figure 37B**).

**Ces résultats semblent indiquer que les sphéroïdes implantés entrent en apoptose après seulement 24h de culture. Ce phénomène n'a jamais été observé sur les sphéroïdes contrôle maintenus en culture dans des puits de plaque 96 puits (résultats non montrés).**





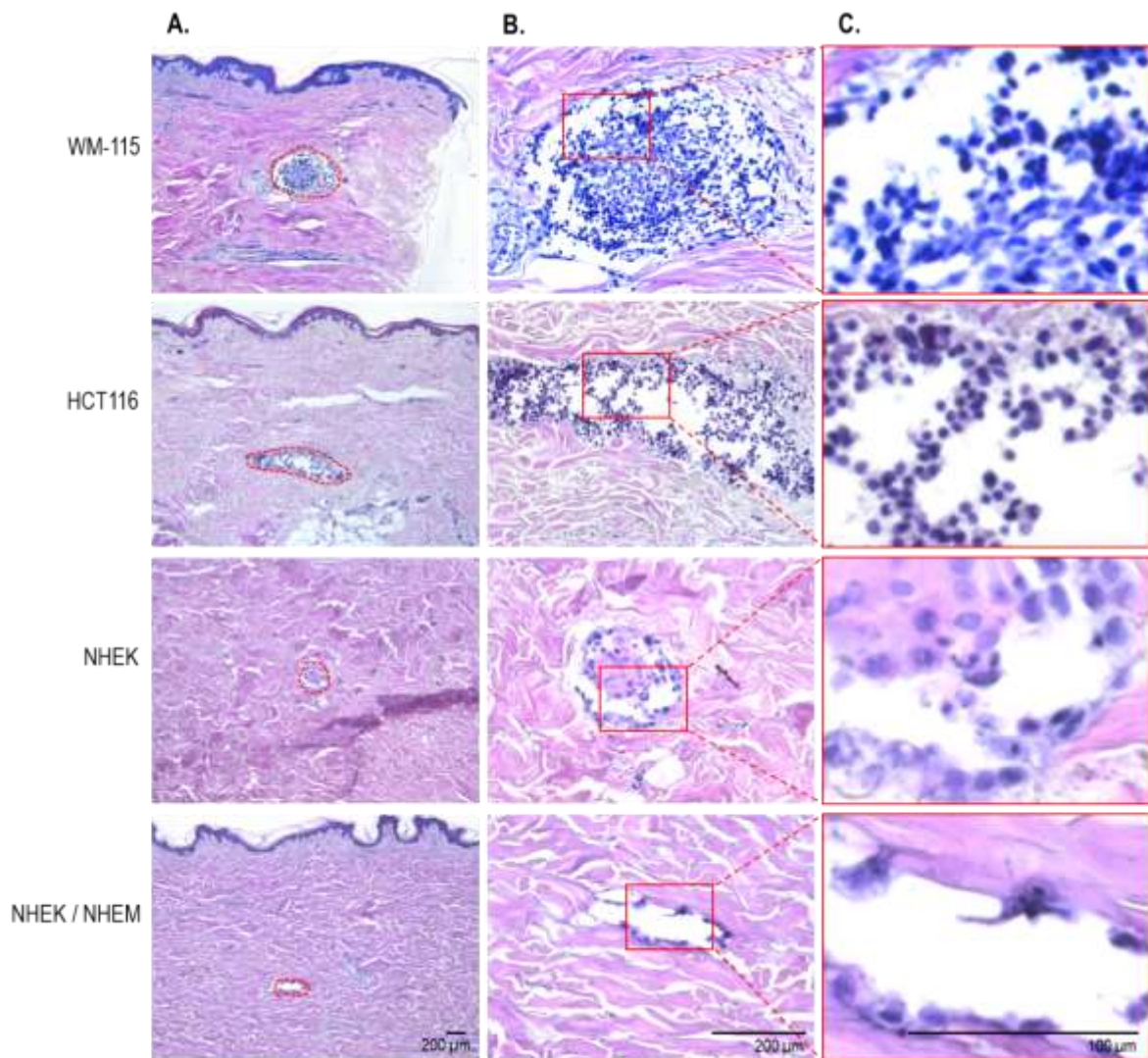
**Figure 38. Evaluation de la structure des sphéroïdes de différentes lignées dans le modèle OncoSkin® non cultivé.**

Des sphéroïdes de la lignée WM-115, de la lignée HCT116, de kératinocytes primaires NHEK et de kératinocytes et mélanocytes primaires NHEK / NHEM ont été implantés dans des explants de peau. Les modèles OncoSkin® ont été fixés en formaline immédiatement après implantation avant d'être inclus en paraffine. Une coloration à l'hématoxyline et éosine a été effectuée sur des coupes de 10 µm d'épaisseur. **A.** Les pointillés rouges délimitent le contour des sphéroïdes implantés. **B.** Les rectangles rouges entourent une zone du sphéroïde sur laquelle **C.** un zoom est effectué pour permettre d'observer la morphologie des cellules.

## 2. Evaluation de la viabilité de sphéroïdes des lignées de mélanome WM-115, d'adénocarcinome colique HCT116 et de cellules primaires de kératinocytes et de mélanocytes après implantation

Nous nous sommes interrogés sur le caractère spécifique des résultats obtenus avec la lignée de WM-266-4. Afin de déterminer si seule cette lignée perd sa viabilité une fois implantée dans le modèle OncoSkin®, celui-ci a été produit à partir d'autres lignées ou cultures cellulaires : des sphéroïdes de la lignée de mélanome non métastatique WM-115, d'adénocarcinome colique HCT116, et de cultures primaires de kératinocytes normaux NHEK ou kératinocytes et mélanocytes primaires NHEK / NHEM ont ainsi été implantés et analysés immédiatement après implantation, ou après 3 jours de culture. Ce second point de cinétique a été fixé à partir des résultats précédemment obtenus avec la lignée WM-266-4 : la perte de prolifération des cellules du sphéroïde et l'apoptose massives des couches périphériques y sont particulièrement observables, et la peau montre toujours des signes de viabilité.

Les colorations à l'hématoxyline et éosine réalisées sur chaque modèle immédiatement après implantation révèlent tout d'abord la présence d'un sphéroïde dans le derme de chaque modèle (**Figure 38**). La morphologie des cellules de ces sphéroïdes semble révéler leur intégrité : les cytoplasmes ne sont pas rétractés, les noyaux ne semblent pas particulièrement rétractés. Par ailleurs, aucun interstice n'est observable au sein des sphéroïdes. Un espace est marqué entre le sphéroïde et le derme des biopsies de peau, suggérant que ces sphéroïdes récemment implantés ne se sont pas encore intégrés dans la structure de la peau. Ces résultats semblent donc indiquer que les sphéroïdes de chacun des différents types cellules implantés sont intègres et viables au moment de leur implantation. Ces observations confirment par ailleurs la possibilité de produire un modèle OncoSkin® avec des sphéroïdes de différents types cellulaires.



**Figure 39. Evolution de de la structure des sphéroïdes de différentes lignées dans le modèle OncoSkin® cultivé 3 jours.**

Les modèles OncoSkin® implantés avec des sphéroïdes de la lignée WM-115, de la lignée HCT116, de kératinocytes primaires NHEK et de kératinocytes et mélanocytes primaires NHEK / NHEM ont été cultivés 3 jours puis fixés en formaline et inclus en paraffine. Une coloration à l'hématoxyline et éosine a été effectuée sur des coupes de 10 µm d'épaisseur. **A.** Les pointillés rouges délimitent le contour des sphéroïdes implantés. **B.** Les rectangles rouges entourent une zone du sphéroïde sur laquelle **C.** un zoom est effectué pour permettre d'observer la morphologie des cellules.



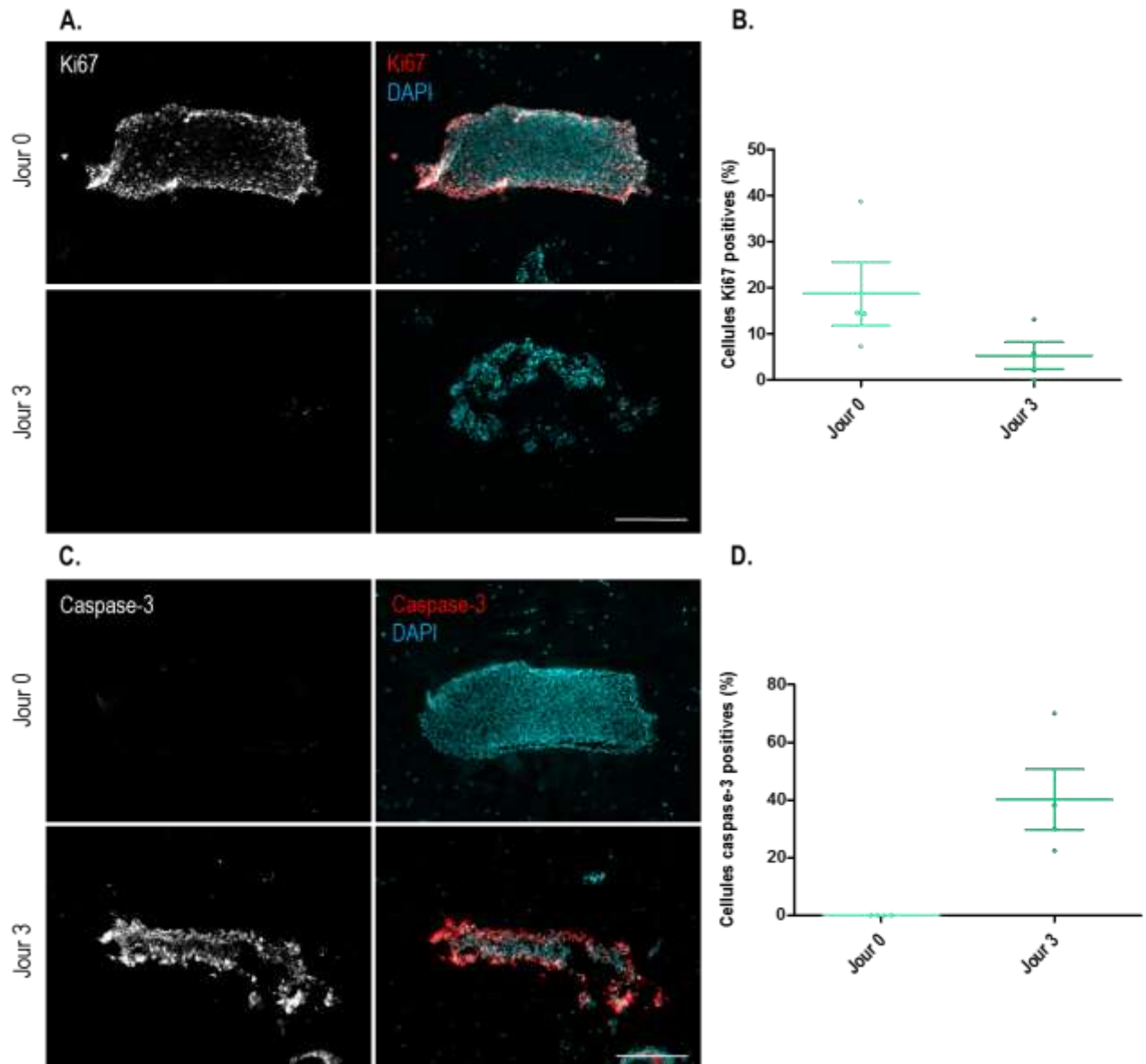
L'analyse histologique des modèles fixés après 3 jours de culture révèle des changements morphologiques importants et similaires à ceux observés lors de l'implantation de sphéroïdes de la lignée WM-266-4 (**Figure 39**), et ce pour chacun des types cellulaires implantés : les noyaux des cellules des sphéroïdes de WM-115 et HCT116 apparaissent rétractés et condensés, montrant des signes de pycnose. Les nombreux interstices visibles dans la structure des sphéroïdes révèlent par ailleurs leur perte de cohésion. Les noyaux des sphéroïdes de kératinocytes primaires NHEK présentent quant à eux une morphologie similaire à celle des sphéroïdes analysés immédiatement après implantation, mais de nombreux interstices sont observables au sein de leur structure. Enfin, seules quelques cellules de la périphérie des sphéroïdes mixtes NHEK / NHEM sont observables sur les coupes des modèles, le centre des sphéroïdes s'étant détaché du reste du modèle, laissant supposer que ces sphéroïdes sont très fragilisés et probablement constitués à ce stade essentiellement de cellules mortes.

Ces résultats ont été complétés par l'analyse de l'expression de marqueurs de prolifération et d'apoptose en immunofluorescence dans le cas de la lignée HCT116 uniquement, au cours de 2 expériences menées de façon indépendante (**Figure 40**).

Immédiatement après implantation, 20% des cellules des sphéroïdes expriment en moyenne le marqueur de prolifération Ki67. Ces cellules sont majoritairement situées à la périphérie du sphéroïde. Aucune cellule n'est positive pour la forme active de la caspase-3, indiquant qu'aucune d'elles n'est apoptotique. Après 3 jours de culture, moins de 10% des cellules expriment encore le marqueur Ki67, tandis que 40% des cellules des assises cellulaires périphériques des sphéroïdes expriment un signal important pour la forme active de la caspase-3. Ces résultats indiquent donc que les cellules des sphéroïdes de HCT116 ne prolifèrent plus après 3 jours de culture dans le modèle OncoSkin®. De plus, les cellules des couches extérieures des sphéroïdes entrent en apoptose.

Ces résultats confirment donc la perte de viabilité rapide des sphéroïdes de HCT116 après implantation, supposée après l'analyse des colorations Hématoxyline et Eosine.

**L'ensemble de ces résultats suggère que les différents types cellulaires implantés subissent la même perte de viabilité que les WM-266-4 durant leur culture modèle OncoSkin®. Ce phénomène ne semble donc pas être spécifique à une lignée cellulaire.** Toutefois, les expériences ayant mené à ces résultats n'ont été conduites qu'une fois dans le cas des WM-115, NHEK et NHEK / NHEM et nécessiteraient d'être reproduites et complétées



**Figure 40. Caractérisation de l'expression des marqueurs de prolifération et d'apoptose Ki67 et caspase-3 dans les sphéroïdes HCT116 implantés.**

Les modèles OncoSkin® implantés avec un sphéroïde de la lignée HCT116 ont été cultivés 0 ou 3 jours puis fixés en formaline et inclus en paraffine. Les marquages de Ki67 **A.** et de la caspase-3 active **C.** en immunofluorescence ont été réalisés sur des coupes en paraffine de 10 µm d'épaisseur. **B.** Le graphe représente le pourcentage de cellules WM-266-4 Ki67 positives évalué sur la totalité des cellules des sphéroïdes. Chaque point correspond à une coupe d'un sphéroïde différent et la moyenne et l'écart à la moyenne sont représentés. **D.** Le graphe représente le pourcentage de cellules WM-266-4 caspase-3 active positives dans les 5 assises cellulaires périphériques. Chaque point correspond à une coupe d'un sphéroïde différent et la moyenne et l'écart à la moyenne sont représentés. Barre d'échelle 200 µm.

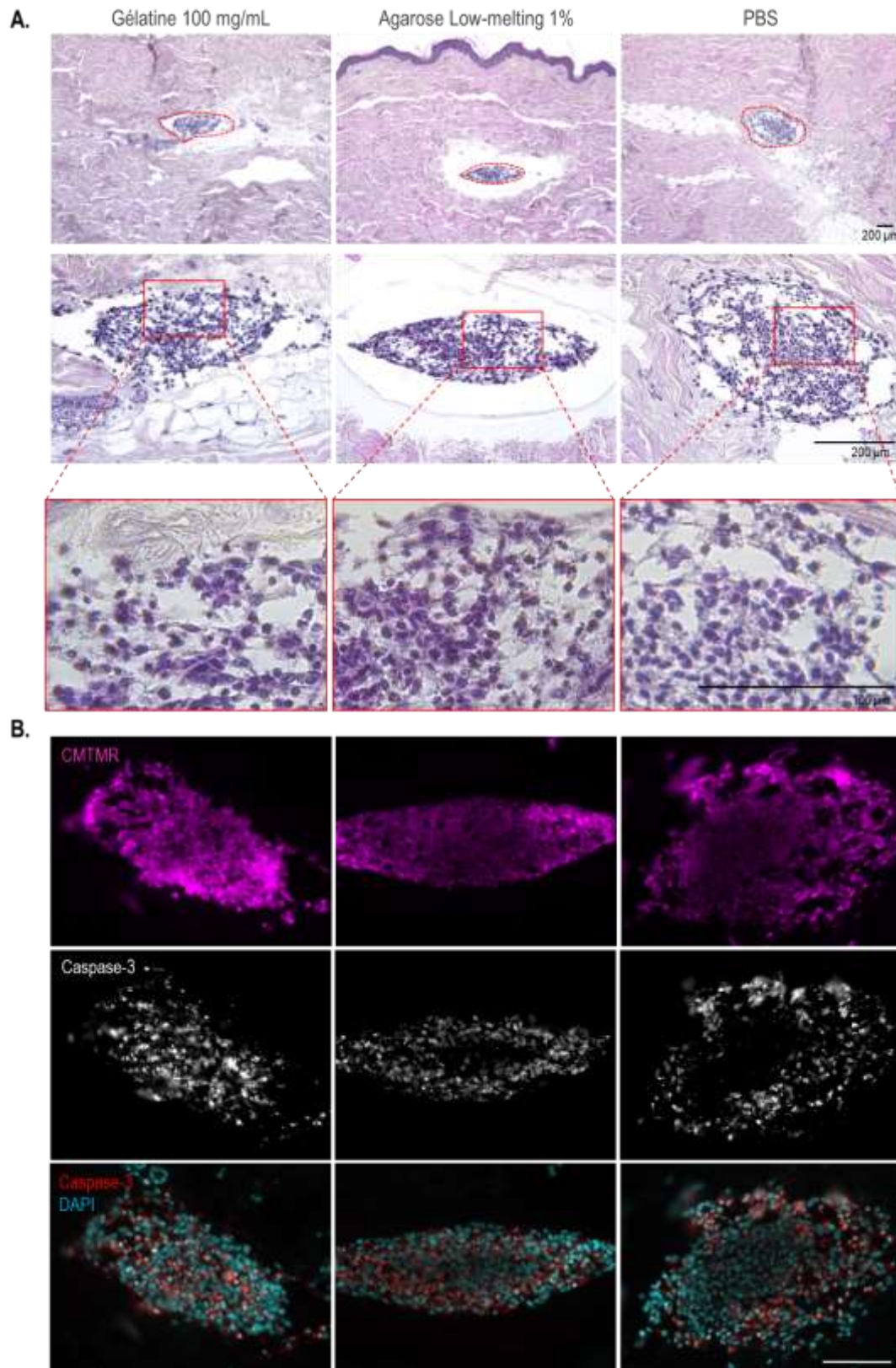
par l'analyse de marqueurs de prolifération et d'apoptoses afin de confirmer ces premières observations.

**La caractérisation du modèle au cours du temps en histologie a mis en évidence une diminution rapide de la prolifération des cellules du sphéroïde et l'apoptose massive des cellules situées à sa périphérie. Ces résultats ont été observés de façon similaire avec différents types cellulaires.**

Parmi les différents scénarii envisagés quant à l'évolution du sphéroïde implanté dans le modèle OncoSkin®, nous n'avions pas formulé l'hypothèse que les cellules qui le constituent rentreraient aussi massivement en apoptose.

Afin de mieux comprendre ce phénomène inattendu, mon travail a par la suite consisté à tenter d'identifier les facteurs pouvant être impliqués dans la mortalité des sphéroïdes implantés.

- Les sphéroïdes implantés dans le modèle OncoSkin® perdent rapidement leur capacité à proliférer et une apoptose massive est observée au niveau des cellules de leur périphérie.
- Ces résultats ont été observés de façon similaire avec différents types cellulaires.



**Figure 41. Comparaison de la morphologie et de la viabilité de sphéroïdes de WM-266-4 implantés dans différentes solutions 3 jours après implantation.**

Des sphéroïdes de la lignée WM-266-4 ont été implantés dans des explants de peau en utilisant les solutions indiquées. Les explants ont ensuite été maintenus en culture pendant 3 jours puis fixés et inclus en paraffine. **A.** Coloration H&E sur des coupes de 10 µm d'épaisseur. **B.** Signal de fluorescence correspondant au marqueur CMTMR (haut, violet) et au marquage en immunofluorescence de la Caspase-3 (milieu, niveaux de gris). Les noyaux sont visualisés par un marquage au DAPI (bas, bleu) (barre d'échelle : 200 µm).

## Partie 4 : Evaluation de l'impact des facteurs environnementaux sur l'évolution du sphéroïde dans le modèle OncoSkin®

Différentes hypothèses ont été formulées afin de déterminer les facteurs à l'origine de la mortalité observée dans les sphéroïdes après leur implantation dans le modèle OncoSkin®. L'impact de différents paramètres développé ci-dessous a été évalué sur la lignée WM-266-4 après 3 jours de culture des modèles OncoSkin®.

### 1. Impact des conditions d'implantation

La technique d'implantation précédemment développée a tout d'abord été remise en question. En particulier, nous avons étudié l'impact de deux paramètres pouvant être impliqués dans la perte de viabilité des sphéroïdes :

- la solution d'implantation
- la taille des sphéroïdes implantés

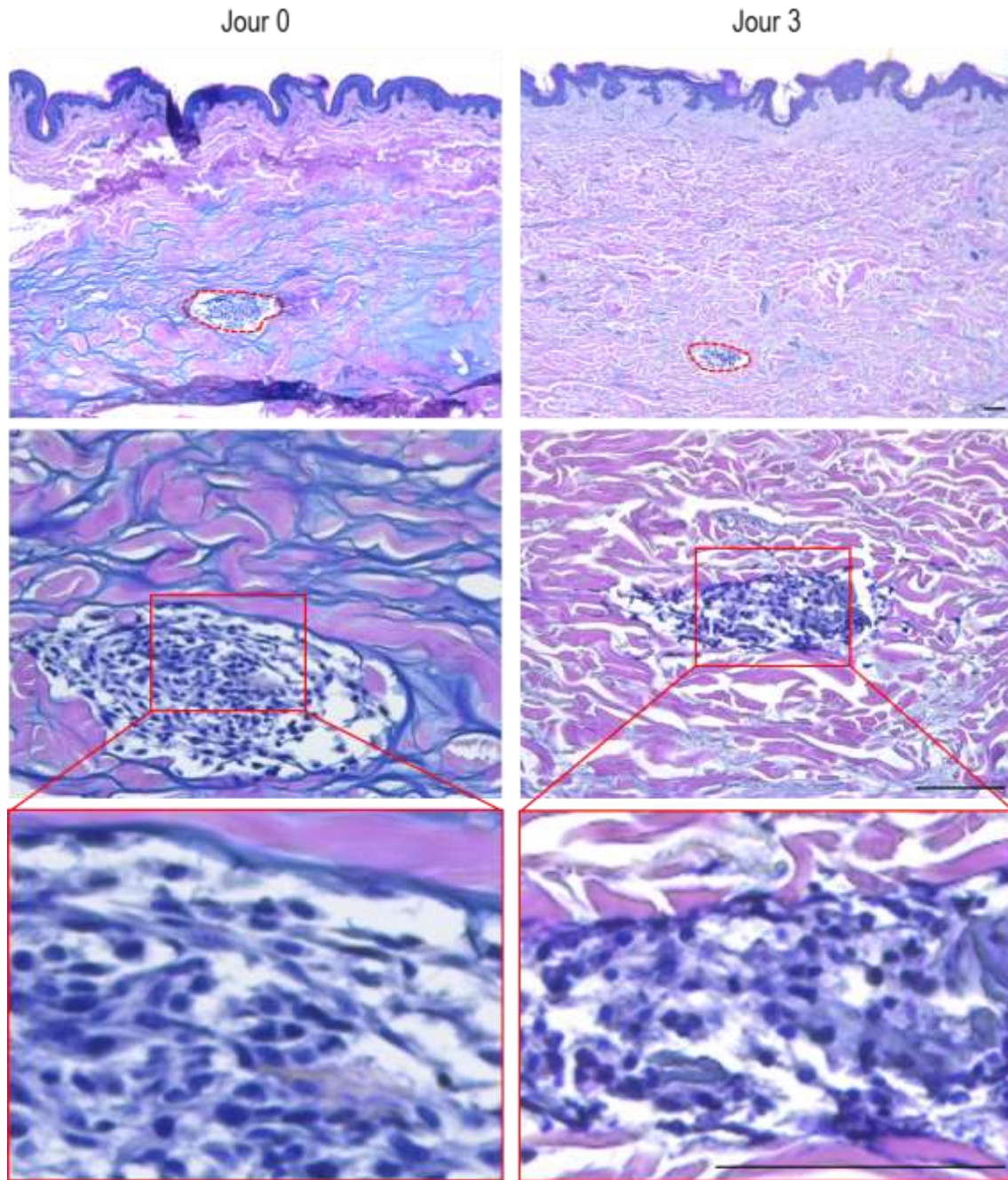
#### 1.1 Impact de la solution d'implantation

Afin d'évaluer l'impact potentiel de la gélatine sur la viabilité des sphéroïdes dans le modèle OncoSkin®, des sphéroïdes ont été implantés dans des solutions de gélatine 100 mg/mL, d'agarose Low-Melting 1% ou de PBS, puis les modèles ont été maintenus en culture pendant 3 jours (**Figure 41**).

L'analyse des colorations H&E réalisées sur des modèles cultivés trois jours suggère une perte de viabilité similaire dans les trois conditions testées (**Figure 41A**). Dans chaque cas, les cellules du sphéroïde montrent des signes importants de pycnose et la perte de l'intégrité de la structure du sphéroïde est visible. On observe également de façon intéressante que dans le cas de l'implantation en agarose 1%, le sphéroïde reste emprisonné dans la solution d'agarose, qui n'a pas été dégradée ou diluée au cours de la culture. Le sphéroïde n'est donc pas au contact de la peau, mais présente les mêmes changements morphologiques que ceux directement en contact avec les fibres du derme (**Figure 41A**).

Ces premières observations ont été confirmées par le marquage en immunofluorescence de la forme active de la caspase-3 (**Figure 41B**) : dans chacune des trois conditions, un marquage massif des cellules de la périphérie des sphéroïdes est détecté, indiquant que les cellules des sphéroïdes entrent en apoptose indépendamment de la solution dans laquelle ils sont implantés.





**Figure 42. Caractérisation de la morphologie de petits sphéroïdes de WM-266-4 3 jours après implantation.** Des sphéroïdes de la lignée WM-266-4 ont été implantés dans des biopsies de peau après 4 jours de culture (300  $\mu\text{m}$  de diamètre). Immédiatement après implantation ou après 3 jours de culture, les modèles OncoSkin® obtenus ont été fixés en formaline puis inclus en paraffine. Une coloration H&E a été réalisée sur des coupes de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les pointillés rouges délimitent le contour des sphéroïdes implantés. Les rectangles rouges entourent une zone du sphéroïde sur laquelle un zoom a été effectué. Barres d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

**Ces résultats suggèrent donc que la solution d'implantation des sphéroïdes n'est pas à l'origine de la mortalité observée au sein des sphéroïdes implantés.**

### 1.2 Impact de la taille des sphéroïdes

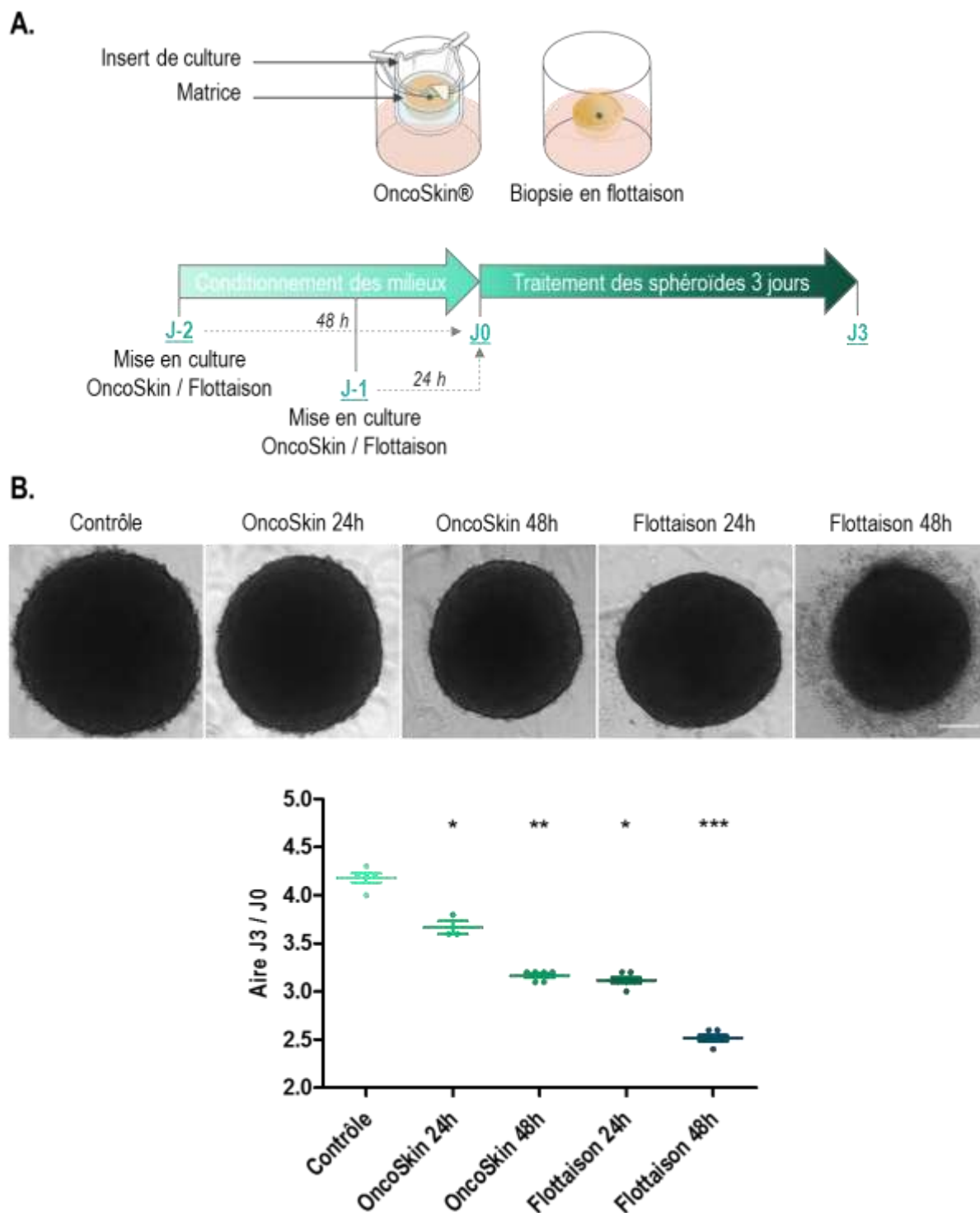
Au cours de la croissance de sphéroïdes en suspension, leur volume augmente et leur structure évolue en terme d'organisation cellulaire: les gradients de prolifération et d'accessibilité des nutriments sont moins prononcés dans des petits sphéroïdes que dans des plus grands. Les travaux réalisés dans l'équipe suggèrent également que les contraintes mécaniques s'exerçant au sein des sphéroïdes sont également différentes selon leur croissance (données non publiées).

Dans les travaux présentés précédemment, les sphéroïdes de la lignée WM-266-4 ont été implantés 7 jours après leur production lorsqu'ils mesurent environ 800 µm de diamètre. Afin d'évaluer l'impact de la taille des sphéroïdes sur leur viabilité après implantation, des sphéroïdes cultivés seulement 4 jours ont été implantés alors qu'ils mesuraient environ 300 µm de diamètre (**Figure 42**). L'analyse de la morphologie de ces modèles en coloration H&E révèle un manque de cohésion des sphéroïdes dès le jour de leur implantation : de nombreux interstices sont observables au sein de leur structure. Après trois jours de culture, la structure du sphéroïde reste similaire à celle observée immédiatement après implantation. Certains noyaux situés en périphérie du sphéroïde semblent par ailleurs être plus condensés, indiquant une possible pycnose.

Ces observations morphologiques semblent suggérer que les sphéroïdes de plus petite taille sont moins structurés que ceux habituellement implantés, ce qui pourrait les rendre plus fragiles au procédé d'implantation. Il est difficile de conclure sur l'évolution de la viabilité de ces sphéroïdes après implantation étant donnée leur perte d'intégrité au moment de l'implantation.

**Ces résultats suggèrent qu'il est préférable d'implanter des sphéroïdes de taille importante afin d'éviter la fragilisation de leur intégrité au moment de leur implantation.**

**D'après les différents résultats obtenus, aucun des deux paramètres évalués ne semble être spécifiquement à l'origine de la mortalité observée au sein des sphéroïdes implantés.**



**Figure 43. Impact des facteurs sécrétés par les modèles implantés sur la croissance des sphéroïdes de WM-266-4.**

**A.** Schéma présentant les conditions de culture des modèles OncoSkin® pour l'obtention des milieux conditionnés et la chronologie de l'expérience. **B.** Des sphéroïdes de 7 jours de la lignée WM-266-4 ont été cultivés 3 jours en plaque 96 puits dans leur milieu de culture (Contrôle), avec du milieu conditionné par des modèles OncoSkin® (OncoSkin 24h ou 48h) ou des biopsies implantées en flottaison pendant 24h ou 48h (Flottaison 24h ou 48h). Les images représentent les sphéroïdes après 3 jours de culture dans chacune de ces conditions. Le graphe présente le rapport des aires des sphéroïdes après 3 jours (J3) / aire au temps initial de l'expérience (J0). Chaque point correspond à un sphéroïde, la moyenne et l'écart à la moyenne des valeurs sont également présentés. Barre d'échelle : 200  $\mu$ m.

## 2. Impact des facteurs sécrétés par le modèle OncoSkin®

Une hypothèse est que l'arrêt de prolifération et la mortalité cellulaire par apoptose observés dans les jours qui suivent l'implantation soient la conséquence de l'action de facteurs sécrétés par les cellules du derme après l'implantation.

Afin de tester cette hypothèse, des sphéroïdes ont été cultivés dans leur milieu de culture habituel préalablement conditionné au contact de biopsies de peau implantées avec un sphéroïde de la lignée WM-266-4.

Deux conditions différentes ont été mises en place pour conditionner les milieux de culture. Dans une première condition, le milieu de culture d'un modèle OncoSkin® a été prélevé 24h ou 48h après implantation.

Les modèles OncoSkin® sont cultivés selon le même procédé que les modèles NativeSkin® développés par la société Genoskin (**Figure 43A**) : les biopsies de peau implantées sont incluses dans une matrice gélifiée qui enrobe le derme et maintient l'épiderme à l'interface de l'air. Cette matrice est coulée dans un insert de culture qui est déposé en suspension dans un puits, au contact du milieu de culture.

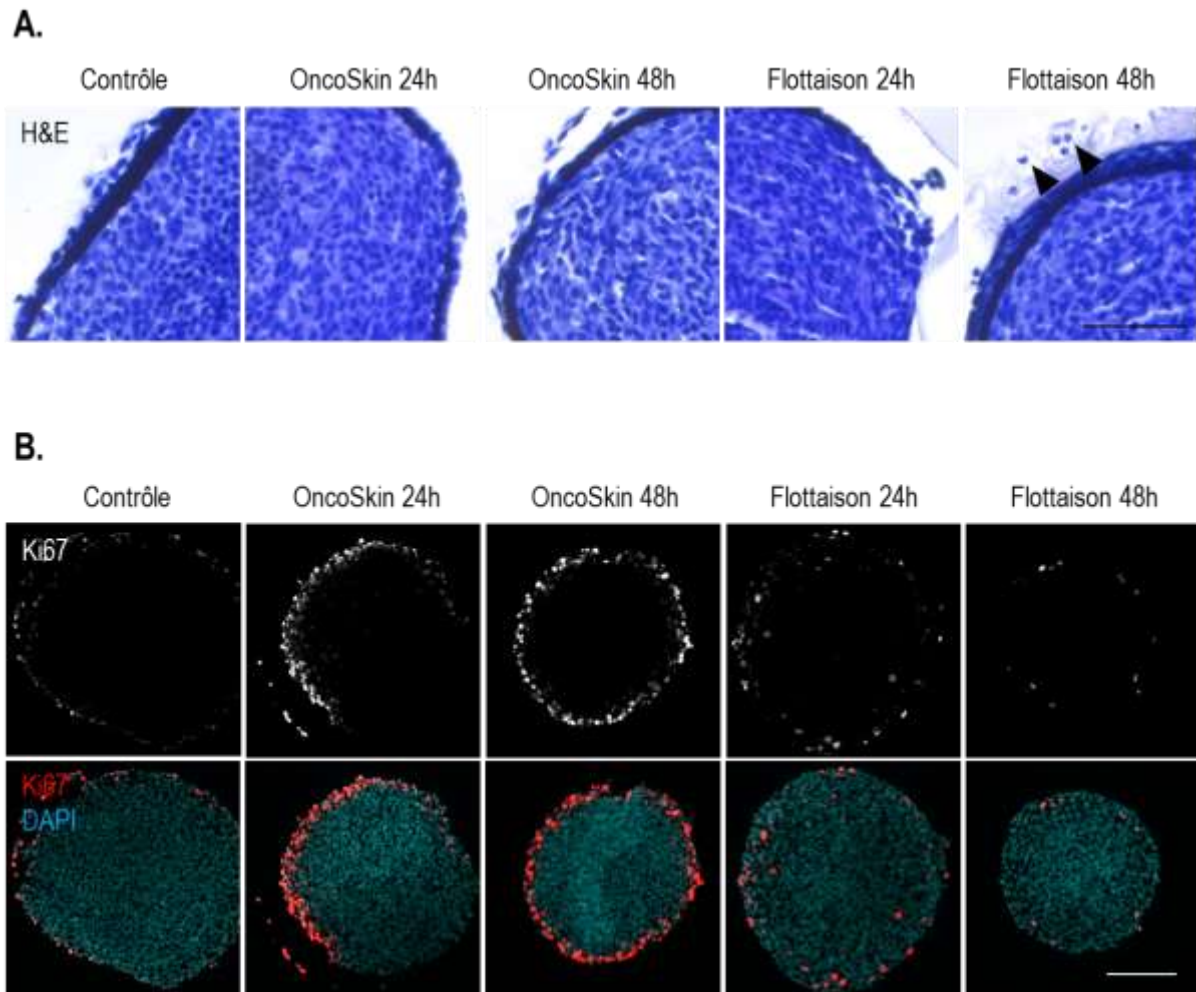
Afin de s'affranchir d'éventuels problèmes de diffusion et/ou de dilution des facteurs sécrétés au-travers de la matrice et de la paroi de l'insert jusqu'au milieu, la deuxième condition correspond à un milieu conditionné par un explant de peau implanté et maintenu en culture directement en flottaison. Le milieu est prélevé après 24h ou 48h (**Figure 43A**).

Une fois les différents milieux conditionnés produits, des sphéroïdes de 7 jours ont été remis en culture dans un volume identique pour chaque condition, pendant trois jours de culture.

Les images en lumière transmise acquises après trois jours de culture révèlent une augmentation significativement moins importante de l'aire projetée des sphéroïdes cultivés en milieux conditionnés que les sphéroïdes contrôles, sans que leur croissance soit toutefois totalement interrompue (**Figure 43B**).

Dans les deux conditions expérimentales testées, les milieux conditionnés durant 48h ont un impact plus important sur la croissance des sphéroïdes (augmentation d'aire d'un rapport de 3,2 contre 3,6 et de 2,5 contre 3,1 dans le cas des modèles OncoSkin® et en flottaison respectivement). Par ailleurs, les milieux conditionnés par les biopsies implantées en flottaison ont un impact beaucoup plus important sur la croissance des sphéroïdes que ceux produits avec les modèles OncoSkin® (augmentation de leur aire 3,1 fois contre 3,6 fois et 2,5 fois contre 3,2 fois avec 24h et 48h de conditionnement respectivement). Ces observations suggèrent que les explants de peau implantés produisent des facteurs sécrétés qui inhibent la croissance des sphéroïdes. Les différences observées en fonction des conditions expérimentales et des durées de conditionnement des milieux vont également dans le sens de cette hypothèse avec un effet plus important à 48h et des milieux conditionnés par les





**Figure 44. Caractérisation en histologie de l'effet des sécrétions des modèles OncoSkin® sur les sphéroïdes de WM-266-4.**

Les sphéroïdes cultivés 3 jours dans du milieu standard ou conditionné ont été fixés en formaline et inclus en paraffine. **A.** Coloration H&E réalisée sur des coupes de 10 µm d'épaisseur. Les têtes de flèches pointent les cellules pycnotiques. Barre d'échelle : 100 µm. **B.** Marquage de Ki67 en immunofluorescence réalisé sur des coupes de 10 µm d'épaisseur. Haut : Signal de fluorescence correspondant au marquage en immunofluorescence de Ki67 (niveaux de gris). Bas : Les noyaux sont visualisés par un marquage au DAPI (bleu), le marquage Ki67 apparaît en rouge. Barre d'échelle : 200 µm.

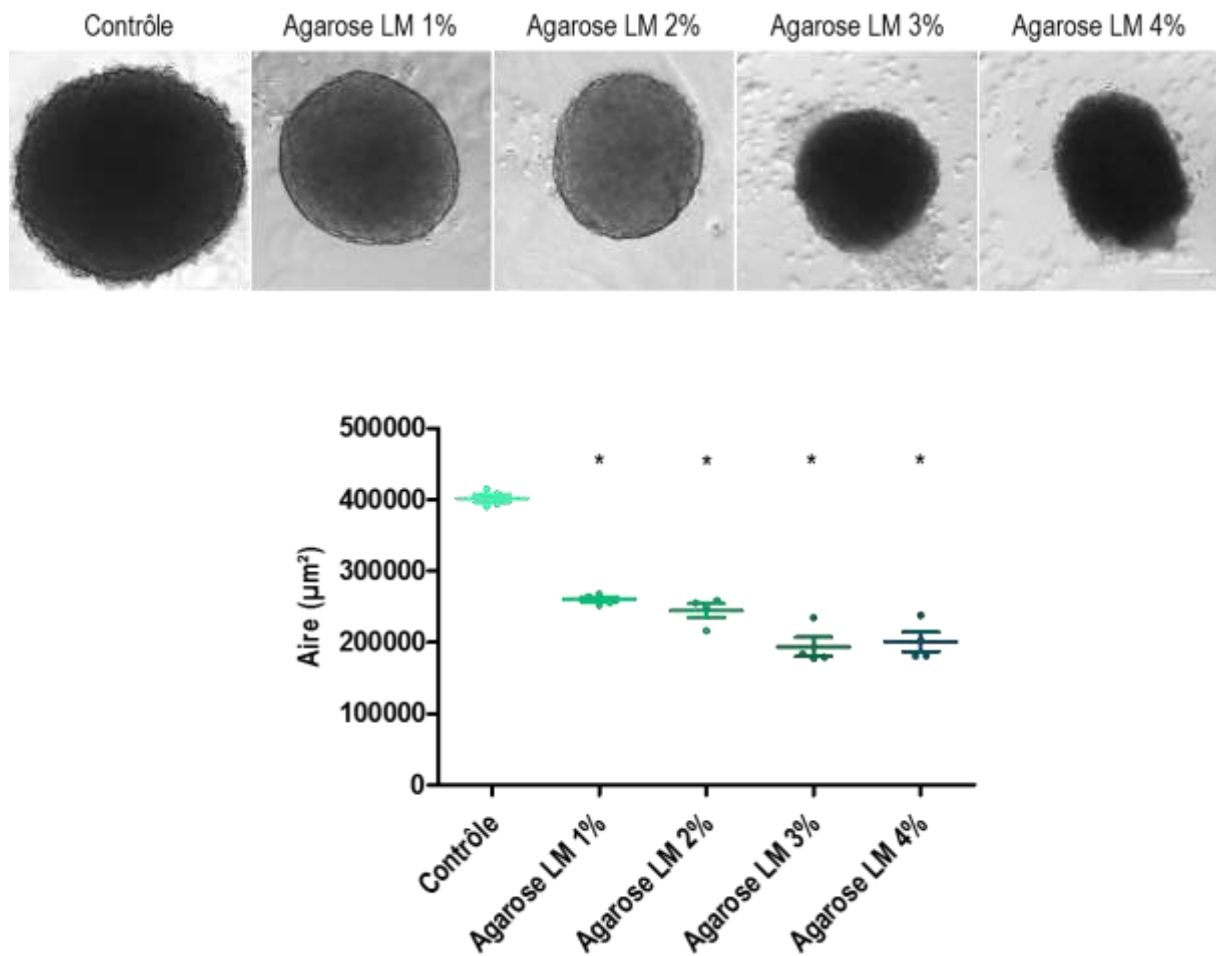
explants en flottaison qui pourrait être la conséquence d'une présence de facteurs sécrétés plus importante.

Enfin, une couronne de cellules détachées est également observable autour des sphéroïdes cultivés 3 jours dans le milieu conditionné 48h par les biopsies en flottaison, suggérant une mortalité de ces cellules. La structure de ces sphéroïdes reste toutefois préservée, indiquant que cette mortalité pourrait être limitée aux couches périphériques des sphéroïdes (**Figure 43B**).

Ces différentes observations laissent à penser que les sécrétions de la peau ont un impact délétère sur la croissance des sphéroïdes, en touchant en particulier les cellules des assises extérieures, sans toutefois engendrer de perte de structure ou de mortalité massive.

La conservation de la structure des sphéroïdes a été confirmée à l'aide d'une coloration H&E réalisée sur des coupes en paraffine (**Figure 44A**) : les sphéroïdes de chacune des différentes conditions présentent une structure cohésive. Sur les coupes, il est possible d'observer que la morphologie des cellules situées à la périphérie des sphéroïdes cultivés en milieu conditionné par les biopsies implantées en flottaison durant 48h est différente de celles des autres conditions : la rétraction de leurs noyaux, associée au gonflement de leurs cytoplasmes, pourrait révéler leur mortalité.

Afin d'analyser si la différence de croissance observée était la conséquence d'une différence de prolifération cellulaire au sein des sphéroïdes, une immunofluorescence du marqueur de prolifération Ki67 a été réalisée sur des coupes en paraffine de ces différents sphéroïdes (**Figure 44B**). Le marquage obtenu sur les sphéroïdes contrôles est limité aux cellules des assises cellulaires les plus périphériques des sphéroïdes, ce qui est cohérent avec la taille qu'ils ont atteinte à l'issue de la culture. Les coupes de sphéroïdes cultivés en milieu conditionné 24h ou 48h par les modèles OncoSkin® présentent un marquage plus intense et sur un nombre plus important d'assises cellulaires que les sphéroïdes contrôle. Cette observation peut être liée à la différence de taille des sphéroïdes entre les deux conditions. En revanche, les sphéroïdes cultivés en présence du milieu conditionné par les biopsies en flottaison présentent un nombre plus faible de cellules marquées que les sphéroïdes contrôles et OncoSkin®. Ces résultats montrent que le milieu conditionné par les biopsies en flottaison a un effet anti-prolifératif, suggérant que des facteurs sécrétés par les explants de peau implantés inhibent la prolifération des cellules WM266-4 au sein des sphéroïdes. Aucune analyse quantitative n'a été réalisée afin d'appuyer ces observations, ces résultats préliminaires n'ayant été obtenus qu'au cours d'une seule expérience.



**Figure 45. Impact de la contrainte mécanique sur la croissance des sphéroïdes de WM-266-4.**

Des sphéroïdes de 7 jours de la lignée WM-266-4 ont été enrobés en agarose Low-melting 1%, 2%, 3% ou 4% ou laissés en culture (Contrôle) et cultivés 3 jours. Les images représentent les sphéroïdes après 3 jours de culture dans chacune de ces conditions. Le graphe présente le rapport des aires des sphéroïdes après 3 jours (J3) / aire au temps initial de l'expérience (J0). Chaque point correspond à un sphéroïde, la moyenne et l'écart à la moyenne des valeurs sont également présentés. Barre d'échelle : 200 µm.

Le marquage de la forme active de la caspase-3 en immunofluorescence a également été réalisé et n'a révélé aucune cellule apoptotique dans aucune des différentes conditions étudiées (résultats non présentés).

**L'ensemble de ces résultats suggère donc que des facteurs sécrétés par les biopsies de peau implantées ralentissent la croissance des sphéroïdes sans toutefois induire d'apoptose massive ni de perte de leur structure. Aucune analyse n'ayant été réalisée sur les cellules de la périphérie s'étant détachées des sphéroïdes au cours de leur culture, il n'est pas possible de conclure de façon certaine sur leur mortalité.**

Ces résultats restent préliminaires et nécessiteraient d'être confirmés sur d'autres expériences indépendantes puis approfondis.

### **3. Impact de la contrainte mécanique sur la viabilité des sphéroïdes**

Dans les modèles OncoSkin®, il a précédemment été observé que les sphéroïdes subissaient rapidement une déformation importante, qui pourrait être la conséquence d'une adaptation à la contrainte mécanique induite par le derme environnant après implantation (**Figure 35**).

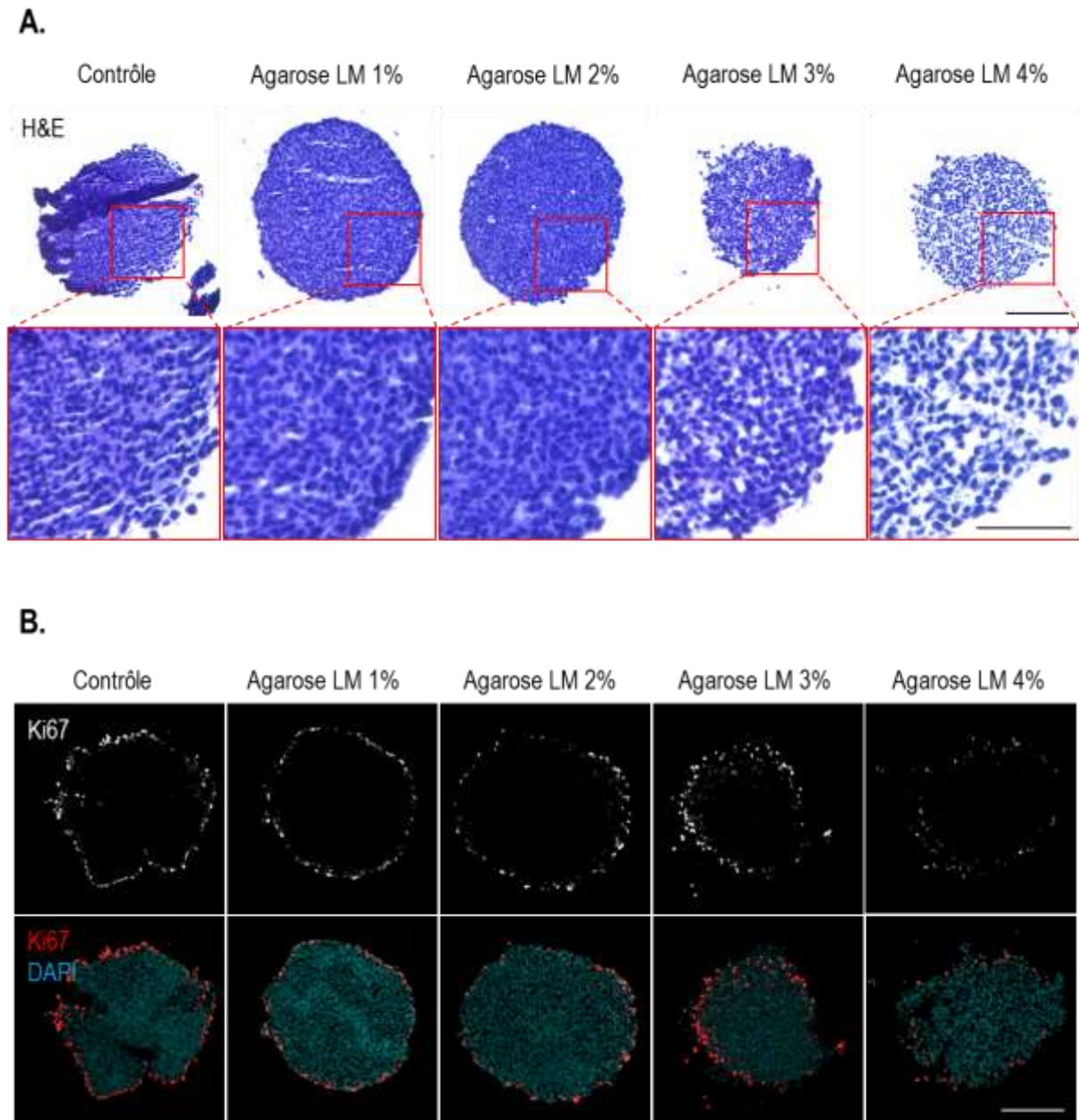
Afin d'évaluer l'impact que pourrait avoir ce stress mécanique sur la viabilité cellulaire au sein des sphéroïdes, des sphéroïdes ont été enrobés dans des solutions d'agarose Low-Melting Point de concentrations variant de 1 à 4%. Une fois ces solutions solidifiées, des cylindres d'agarose de 11 mm de diamètre et de 3 mm d'épaisseur (dimensions similaires à celles des explants de peau) contenant les sphéroïdes ont été prélevés et cultivés durant 3 jours.

Des images en lumière transmises acquises après 3 jours de culture révèlent tout d'abord une diminution de l'aire des sphéroïdes d'autant plus importante que la concentration d'agarose est élevée (**Figure 45**).

L'analyse de l'organisation cellulaire sur des coupes histologiques révèle une altération de l'organisation des sphéroïdes en fonction de la concentration d'agarose utilisée (**Figure 46A**) : les sphéroïdes de la condition contrôle présentent une périphérie moins structurée que ceux cultivés dans 1 et 2% d'agarose. Pour chacune de ces 3 conditions, l'observation de la morphologie des cellules ne révèle pas de perte de viabilité ni de cohésion. En revanche, les sphéroïdes cultivés en agarose 3% montrent une perte de cohésion, révélée par les nombreux interstices observables au sein de leur structure.

Cette perte de cohésion est encore accentuée dans 4% d'agarose et semble être associée à une diminution de la densité cellulaire des sphéroïdes et une rétractation des noyaux des cellules qui les composent, indiquant potentiellement leur perte de viabilité. L'analyse en immunofluorescence du marqueur de prolifération Ki67 révèle une expression par les cellules





**Figure 46. Caractérisation en histologie de l'effet de la contrainte mécanique sur les sphéroïdes de WM-266-4.**

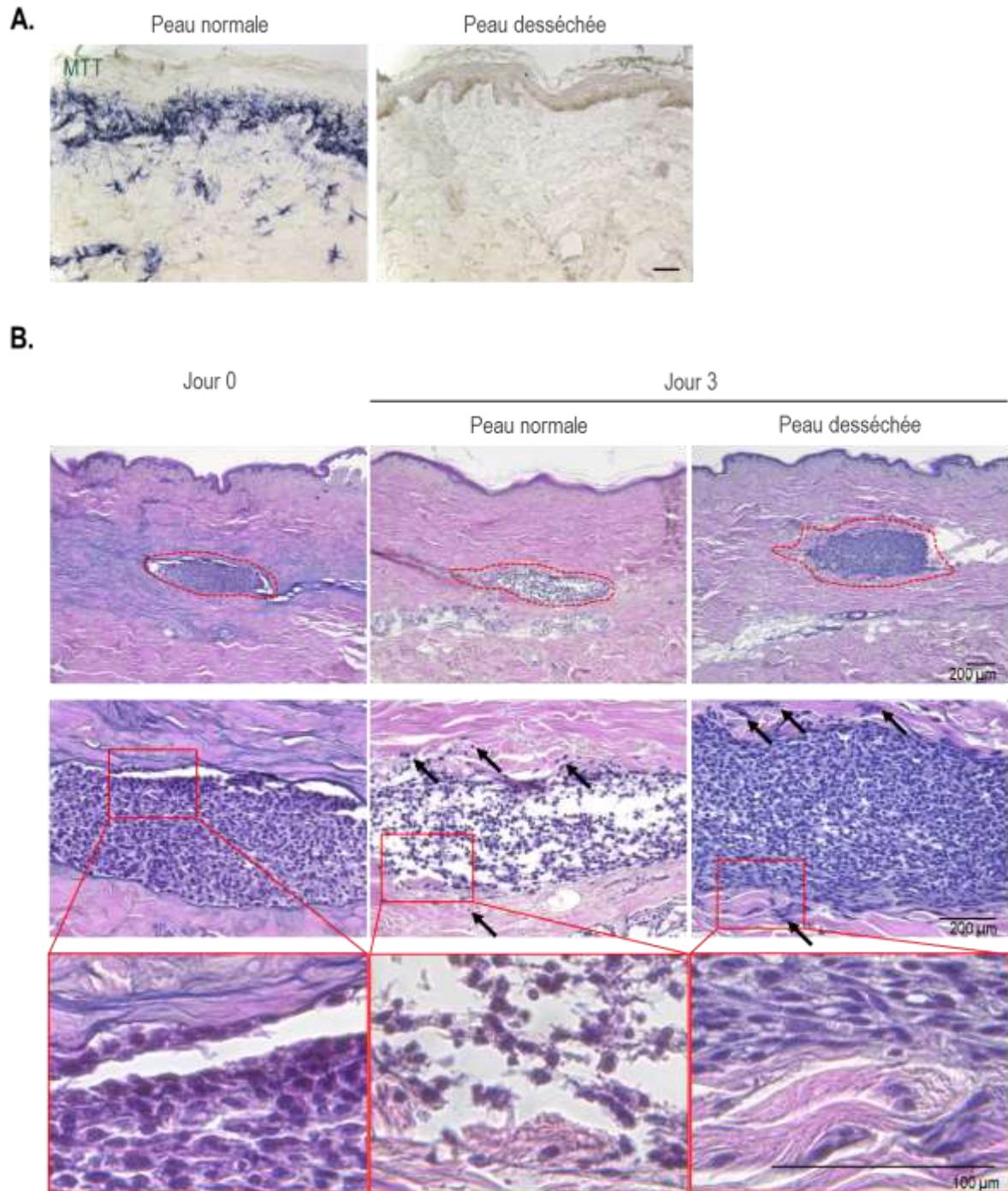
Les sphéroïdes cultivés 3 jours en agarose ou de façon standard ont été fixés en formaline et inclus en paraffine. **A.** Coloration H&E réalisée sur des coupes de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ ). Les rectangles rouges entourent une zone du sphéroïde sur laquelle un zoom a été effectué (barre d'échelle : 100  $\mu\text{m}$ ). **B.** Marquage de Ki67 en immunofluorescence réalisé sur des coupes de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Haut : Signal de fluorescence correspondant au marquage en immunofluorescence de Ki67 (niveaux de gris). Bas : Les noyaux sont visualisés par un marquage au DAPI (bleu), le marquage Ki67 apparaît en rouge. Barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

des assises périphériques des sphéroïdes. Un profil similaire est observé dans toutes les conditions, à l'exception des sphéroïdes cultivés en agarose 4%, qui semblent présenter un marquage plus faible et limité à un nombre de cellules moins important (**Figure 46B**).

Ces résultats n'ont pas été appuyés par une quantification, l'expérience n'ayant pas été reproduite plusieurs fois de façon indépendante.

De façon étonnante, une analyse de l'induction d'apoptose par immunofluorescence anti-capase3 n'a révélé aucune expression de la forme active de la caspase-3 au sein des sphéroïdes des différentes conditions, suggérant que la culture des sphéroïdes dans les différentes concentrations d'agarose n'induit pas de mort cellulaire par apoptose (résultats non présentés).

**Ces résultats préliminaires semblent donc indiquer que sous l'effet d'une contrainte mécanique importante, les sphéroïdes de la lignée WM-266-4 présentent une perte de cohésion de leur structure et une diminution de prolifération, mais ne subissent pas de mortalité par apoptose.**



**Figure 47. Caractérisation morphologique des sphéroïdes de WM-266-4 implantés dans des biopsies de peau desséchées.**

**A.** Des biopsies fraîches (peau normale) ou laissées 10 jours à 37°C à sec (peau desséchée) ont été incubées avec du sel de tétrazolium (MTT) pour évaluer leur viabilité cellulaire avant d'être fixées en formaline et incluses en paraffine. L'incorporation du MTT a été évaluée sur des coupes de 10  $\mu$ m observées en lumière transmise. **B.** Des sphéroïdes de la lignée WM-266-4 ont été implantés dans des biopsies de peau normale ou desséchée. Immédiatement après implantation ou après 3 jours de culture, les échantillons ont été fixés en formaline et inclus en paraffine. Une coloration H&E a été réalisée sur des coupes de 10  $\mu$ m d'épaisseur. Haut : les pointillés rouges délimitent le contour des sphéroïdes implantés. Milieu : les flèches désignent des cellules détachées du sphéroïde. Les rectangles rouges entourent une zone du sphéroïde sur laquelle un zoom a été effectué (Bas).

#### 4. Impact de la viabilité de l'explant de peau sur le devenir du sphéroïde implanté

Finalement, nous avons tenté de déterminer l'impact que pouvait avoir de façon générale la viabilité et la structure de la peau sur les sphéroïdes implantés en modifiant le modèle utilisé. Pour ce faire, des sphéroïdes ont été implantés dans des biopsies de peau préalablement desséchées. Cette méthode a précédemment été montrée efficace pour faire perdre aux cellules de la peau leur activité métabolique, comme l'indique l'absence d'incorporation du sel de tétrazolium (MTT), tout en préservant la structure générale de la peau (**Figure 47A**).

Cette expérience a été réalisée en duplicats sur 3 donneurs indépendants. Pour chaque analyse, les images d'un échantillon représentatif sont montrées.

Après 3 jours de culture, les sphéroïdes implantés dans une biopsie desséchée montrent une morphologie très différente de celle des sphéroïdes implantés dans une biopsie vivante, et similaire à celle observée immédiatement après implantation (**Figure 47B**): la structure du sphéroïde est intègre, et les cellules qui le constituent sont étendues, aucun signe de pycnose ou de rétraction des cytoplasmes n'est visible, à l'inverse des cellules des sphéroïdes cultivés dans des biopsies vivantes.

L'observation des cellules détachées de la structure du sphéroïde révèle des différences similaires à celles observées au sein des sphéroïdes: dans la peau normale, elles sont rétractées et montrent des signes de pycnose, tandis que dans la peau desséchée, elles sont étendues et semblent viables.

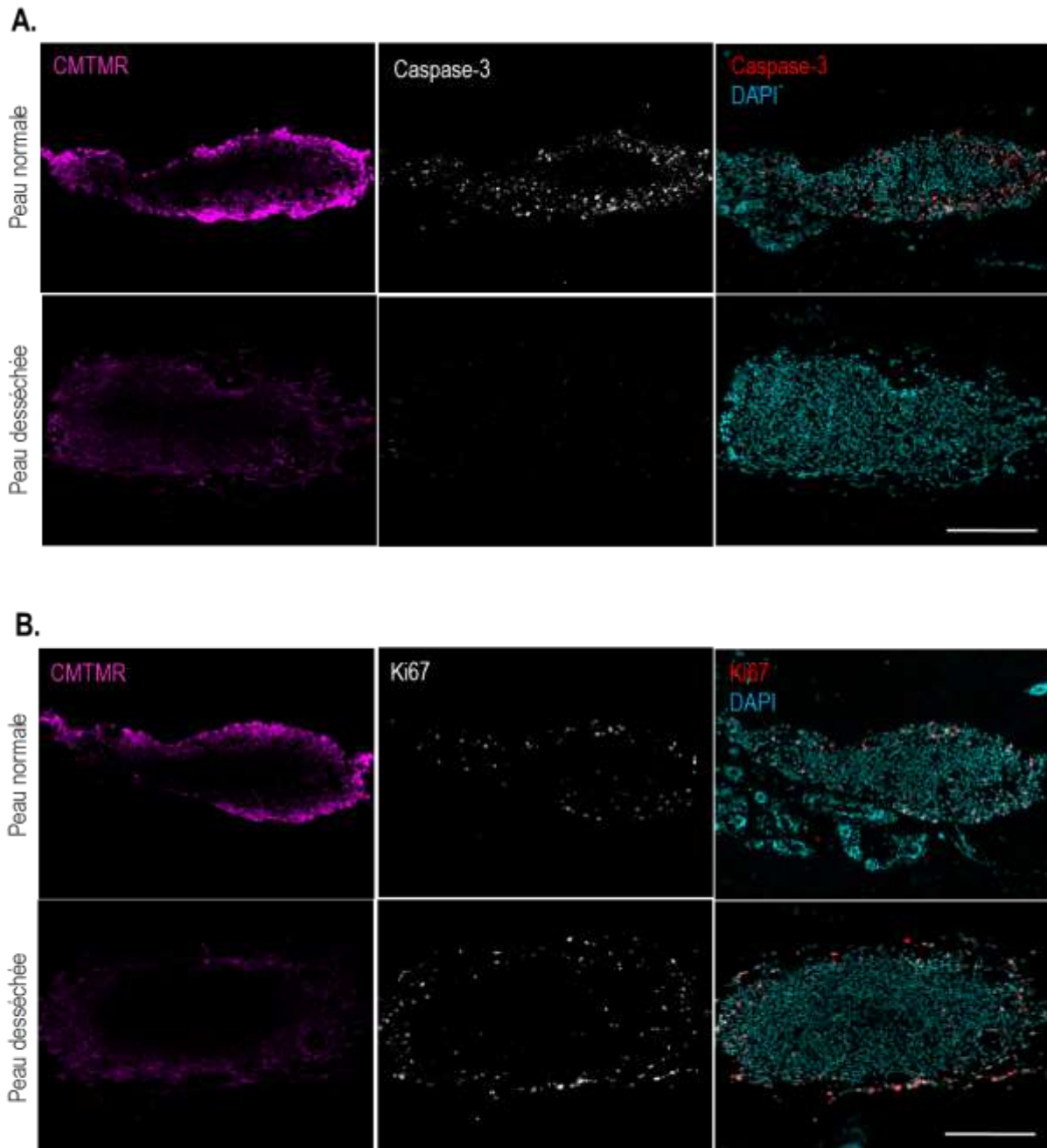
La forme générale des sphéroïdes implantés en peau desséchée présente également un aspect différent de celle observée jusqu'à présent en peau vivante : leur aplatissement semble être systématiquement moins important.

Enfin, il est également intéressant de noter qu'aucun fragment de gélatine n'est plus observable dans le derme des biopsies desséchées après 3 jours de culture.

L'analyse en immunofluorescence des marqueurs de prolifération et d'apoptose Ki67 et caspase-3 active va dans le sens des observations faites sur les colorations H&E (**Figure 48**). Tout d'abord, aucune cellule positive pour la forme active de la caspase-3 n'est détectée dans les sphéroïdes implantés en peau desséchée, indiquant qu'à l'inverse des sphéroïdes implantés en peau normale, ils ne subissent pas d'apoptose massive (**Figure 48A**).

Par ailleurs, l'évolution de la fluorescence du sphéroïde donne des indications sur la prolifération des cellules : le marqueur CMTMR, cytoplasmique, est dilué lors de chaque division cellulaire. Très intense en périphérie du sphéroïde après implantation, il reste fort après 3 jours quand le sphéroïde est cultivé dans une peau normale. A l'inverse, son intensité de fluorescence diminue très fortement après 3 jours de culture en peau desséchée, suggérant que les cellules du sphéroïde se sont divisées (**Figure 48**).





**Figure 48. Evaluation de la viabilité des sphéroïdes implantés en peau desséchée.**

Les modèles OncoSkin® produits à partir de peau normale ou desséchée et implantés avec un sphéroïde de la lignée WM-266-4 ont été cultivés 0 ou 3 jours puis fixés en formaline et inclus en paraffine. Les marquages de la forme active de la caspase-3 **A.** et de Ki67 **B.** en immunofluorescence ont été réalisés sur des coupes de 10 µm d'épaisseur. Gauche : fluorescence du CMTMR permettant de visualiser le sphéroïde (violet). Milieu : signal de fluorescence correspondant aux marqueurs caspase-3 active **A.** ou Ki67 **B.** (niveaux de gris). Droite : signal de fluorescence correspondant aux marqueurs caspase-3 active **A.** ou Ki67 **B.** (rouge), les noyaux sont visualisés grâce à un marquage avec du DAPI (bleu). Barres d'échelle : 200 µm.

L'analyse du marquage obtenu en immunofluorescence contre le marqueur Ki67 révèle la présence de cellules positives dans toutes les conditions, leur nombre semblant toutefois être plus important sur les coupes de sphéroïdes implantés en peau desséchée (**Figure 48B**).

**Les résultats obtenus lors de ces expériences indiquent donc que les sphéroïdes implantés en peau desséchée conservent leur intégrité et leur viabilité, et ne subissent pas d'apoptose massive.**

Cette expérience nous permet par ailleurs enfin d'affirmer que les conditions d'implantation ne sont pas responsables de la mortalité observée dans les modèles OncoSkin® normaux, celles-ci étant restées inchangées au cours de ces différentes expériences.

- La mortalité observée au sein des cellules des sphéroïdes implantés dans le modèle OncoSkin® ne semble pas être liée à la solution utilisée pour les implanter, ni à leur taille.
- Des facteurs sécrétés par le modèle OncoSkin® semblent avoir un impact sur la viabilité des sphéroïdes de la lignée WM-266-4, en particulier au niveau des cellules situées à leur périphérie.
- La contrainte mécanique exercée par de l'agarose sur les sphéroïdes semble induire une déstructuration importante et une diminution de la prolifération des cellules de leur périphérie.
- Les sphéroïdes implantés dans une peau préalablement desséchée ne présentent pas les mêmes modifications morphologiques que lorsqu'ils sont implantés dans une peau normale : les cellules conservent leur viabilité et leur structure, et ne subissent pas la même déformation.



# DISCUSSION ET PERSPECTIVES



Dans cette partie, la discussion et les perspectives du projet sont articulées autour de trois parties.

Dans une première partie, les perspectives générales d'application du modèle OncoSkin® seront développées. Cette partie reposera principalement sur des connaissances théoriques, les travaux menés au cours de ce projet n'ayant pas permis jusqu'à présent de valider un modèle viable.

Les résultats obtenus lors de la caractérisation de la viabilité du modèle seront discutés dans une seconde partie.

Enfin, les perspectives d'application des stratégies d'analyse développées autour du modèle au cours du projet seront discutées dans une dernière partie.

## **Partie 1 : Perspectives d'applications et d'amélioration du modèle OncoSkin® comme modèle d'étude préclinique**

Le modèle OncoSkin® a été développé dans le but de reproduire de la façon la plus complète possible la complexité de la tumeur et de son microenvironnement en combinant deux modèles d'étude complets, le modèle du sphéroïde et le modèle d'explant de peau humaine cultivé *ex vivo*. Il se positionne ainsi parmi la catégorie des modèles précliniques organotypiques, dont le développement est motivé par la nécessité d'améliorer la prédictibilité de l'efficacité et de la toxicité des composés thérapeutiques afin de limiter les taux d'attrition et les durées de développement élevées actuellement rencontrés lors de leur développement. L'amélioration de la prédictibilité des modèles repose principalement sur leur complexification, permettant de mieux reproduire l'hétérogénéité tumorale d'une part et des interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement d'autre part, dans un contexte tridimensionnel. Ces différentes interactions jouent en effet un rôle majeur dans la résistance des cellules cancéreuses aux stratégies anti-tumorales développées (Correia and Bissell 2012; Roesch 2015).

Dans ce contexte, le modèle OncoSkin® présente différents avantages par rapport aux modèles organotypiques existants.

La première innovation de ce modèle réside dans l'utilisation d'un explant de peau humaine *ex vivo* pour reproduire le microenvironnement tumoral. A ce jour, l'ensemble des modèles organotypiques développés repose sur l'incorporation de cellules de mélanome dans des modèles de peau reconstruite (Beaumont, Mohana-Kumaran, and Haass 2013). Ces derniers reproduisent de façon simplifiée la structure de la peau, alors que la nature *ex vivo* du modèle OncoSkin® lui permet de se rapprocher de la complexité d'une peau normale : l'ensemble des types cellulaires résidents de la peau y est présent, et la matrice extracellulaire y est complète. Cette caractéristique permet d'imaginer une interaction entre les cellules cancéreuses et le tissu plus proche de celle s'établissant *in vivo*. Elle ouvre également des perspectives intéressantes pour étudier la toxicité de traitements sur les cellules du tissu sain avec une bonne prédictibilité.

Par ailleurs, la plupart des modèles organotypiques existants est développée à partir de cellules cancéreuses isolées. L'une des équipes ayant incorporé des sphéroïdes de mélanome dans un modèle organotypique a montré que ce modèle présentait une résistance plus importante à un traitement de chimiothérapie que le même modèle développé à partir de cellules en suspension (Vörsmann et al. 2013). L'implantation des cellules cancéreuses sous formes de sphéroïdes dans le derme des modèles OncoSkin® permet de reproduire

l'hétérogénéité caractéristique d'une tumeur solide et d'apporter un degré supplémentaire de pertinence au modèle pour prédire avec justesse l'efficacité de drogues *in vitro*.

Un autre atout du modèle par rapport aux modèles organotypiques reconstruits repose sur sa simplicité et sa rapidité de mise en œuvre : le développement de modèles de peaux reconstruites requiert une certaine technicité, et plusieurs semaines sont nécessaires à l'obtention d'un modèle complet (Mathes, Ruffner, and Graf-Hausner 2014). Le modèle OncoSkin® peut être utilisé le jour même de sa production, et se cultive dans des conditions standard de culture cellulaire.

L'ensemble de ces différents éléments peut donc laisser penser que le modèle OncoSkin® présente un meilleur potentiel que les modèles organotypiques reconstruits existants pour prédire avec fiabilité l'efficacité et la toxicité de stratégies thérapeutiques lors des phases de recherche préclinique.

Différents aspects du modèle OncoSkin® semblent toutefois pouvoir présenter des limites à son application et méritent d'être discutées.

Tout d'abord, l'approche développée pour produire le modèle repose sur l'implantation des cellules cancéreuses directement dans le derme des explants, et ne permet donc pas d'étudier la première phase de croissance radiale du mélanome, celui-ci se développant à partir de l'épiderme, ni les mécanismes régissant la transition de la phase de croissance radiale à la phase de croissance verticale. Le modèle permet en revanche d'étudier de façon cohérente la phase de croissance verticale de la pathologie et les mécanismes conduisant au développement de métastases cutanées, dont la compréhension s'avère particulièrement intéressante, le stade métastatique étant associé au plus mauvais pronostic vital des patients (Svedman et al. 2016).

Par ailleurs, la nature *ex vivo* du modèle rend son développement dépendant de l'approvisionnement en échantillons biologiques. La quantité de modèles pouvant être produite à partir d'un donneur est limitée par la taille du prélèvement récolté. Cette limite ne permet pas d'envisager l'utilisation du modèle pour des screening de moyen et haut débits en raison de la variabilité inter-donneur du modèle (Mathes, Ruffner, and Graf-Hausner 2014). Ceci suggère plutôt une utilisation de ce modèle au cours des dernières phases de développement préclinique, afin de procéder à une sélection plus fine des drogues pouvant présenter un intérêt thérapeutique parmi une dizaine de candidates.

Cependant, la variabilité liée aux donneurs pourrait être par ailleurs considérée comme un avantage supplémentaire du modèle : elle pourrait permettre de reproduire et d'anticiper la variabilité inter-patient rencontrée durant les phases de développement préclinique, et pourrait trouver des applications pour étudier par exemple les différences de migrations et d'invasion des cellules cancéreuses dans le tissu selon l'âge des patients, ce facteur ayant été identifié

comme ayant un impact dans le développement de métastases dans le cas du mélanome (Balch et al. 2013).

De la même façon, les modèles d'explants de peau ne peuvent être maintenus en culture que sur de courtes périodes. Le modèle NativeSkin® peut ainsi être cultivé pendant 7 jours, la viabilité du tissu et son intégrité étant altérés au-delà de cette limite. Cette courte période peut être suffisante pour étudier le mécanisme d'action d'une drogue sur les cellules cancéreuses, mais ne permettra pas d'étudier l'effet de son application répétée. Une approche permettant d'étudier le développement de mécanismes de résistances pourrait toutefois être développée en traitant les cellules cancéreuses avec une drogue avant de les implanter dans le modèle.

Une autre limite d'application du modèle est associée à sa nature : bien que les cellules immunitaires résidentes de la peau y soient présentes, le modèle n'est pas vascularisé ni attaché à un organisme complet, il ne peut donc pas être utilisé pour étudier l'efficacité de stratégies thérapeutiques reposant sur des approches d'immunothérapie.

Enfin, le modèle OncoSkin® a été développé à partir de sphéroïdes de lignées de mélanome. Celles-ci apportent généralement un plus faible pouvoir prédictif de l'efficacité de composés thérapeutiques que les cellules primaires en raison de leurs conditions d'établissement et de culture détachés de leur microenvironnement, qui les conduisent à s'éloigner de leur phénotype initial. Il pourrait être particulièrement intéressant d'implanter des fragments de tumeurs dérivées de patients dans le modèle OncoSkin® afin de pallier cette limite. La procédure développée pour produire le modèle serait en effet compatible avec l'implantation de ce type d'échantillons. Cette approche pourrait par ailleurs permettre d'élargir le champ des applications du modèle OncoSkin® en envisageant son utilisation dans le cadre d'approches de thérapie personnalisée, au cours desquelles le modèle serait utilisé pour prédire l'efficacité d'une stratégie thérapeutique pour un patient donné au cours des phases d'essais cliniques, à l'image des modèles PDX. Cependant, la durée de culture du modèle risque de présenter encore une fois une limite majeure à ce type d'applications : dans les modèles PDX, le développement des tumeurs xénogreffées peut prendre plusieurs mois, et leur utilisation à des fins de thérapie personnalisée s'étend par la suite également sur plusieurs mois (Kuzu et al. 2015).

L'ensemble de ses caractéristiques confère donc au modèle OncoSkin® un potentiel intéressant en tant que modèle d'étude préclinique du mélanome métastatique. Son utilisation pourrait par exemple s'avérer pertinente pour évaluer l'effet de thérapies ciblées sur la croissance et le potentiel métastatique de tumeurs de différents profils mutationnels. Sa plus grande complexité pourrait lui conférer une meilleure reproductibilité des conditions de

développement du mélanome, et pourrait ainsi apporter une meilleure prédictibilité de l'efficacité et de la toxicité de traitements thérapeutiques que les modèles *in vitro* existants.

Le développement de ce modèle s'inscrit ainsi parfaitement dans les enjeux actuels de recherches de solutions visant à limiter les taux d'attrition élevés associés au développement de nouveaux composés thérapeutiques (Waring et al. 2015) : la sélection d'un nombre plus restreints de candidats-médicaments permettrait d'une part de réduire la quantité d'animaux nécessaires pour les phases d'essais précliniques *in vivo*, et d'autre part de mieux cibler les agents thérapeutiques ayant un réel potentiel en termes d'efficacité et de toxicité lors des phases d'essais cliniques.

Il est toutefois important de souligner le fait que l'ensemble de ces propositions d'applications repose sur des hypothèses formulées à partir de données bibliographiques. Leur confirmation devra s'appuyer sur des étapes de validation expérimentale sur le modèle, réalisées à l'aide de traitements de référence dont l'effet est connu et bien documenté, comme par exemple des inhibiteurs de BRAF tels que le vemurafenib ou le dabrafenib.

Enfin, avant d'étudier le potentiel des différentes applications mentionnées, il est nécessaire de résoudre le problème auquel le développement du modèle se heurte actuellement, à savoir la mortalité rapide des sphéroïdes implantés.



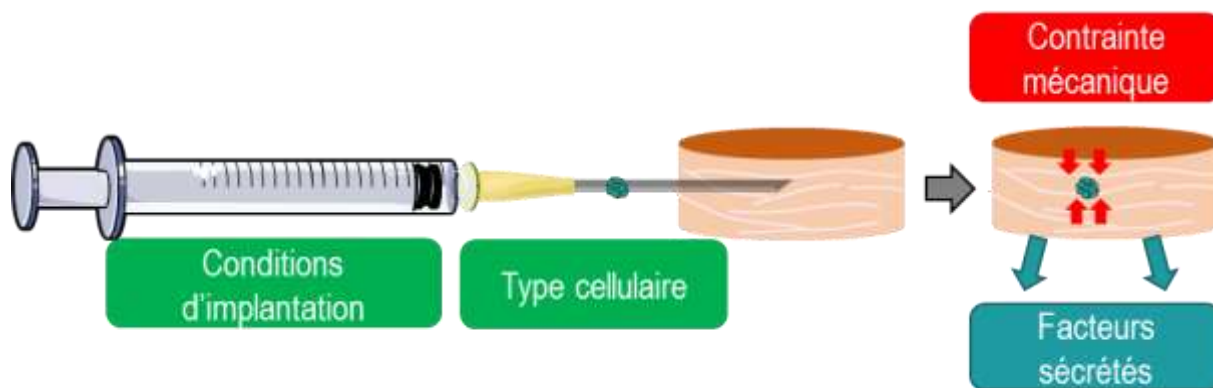


Figure 49. Schéma récapitulatif des différents facteurs pouvant être impliqués dans la mortalité du sphéroïde implanté.

## Partie 2 : Implication de différents facteurs dans la mortalité des sphéroïdes implantés

La caractérisation du modèle OncoSkin®, développé en implantant un sphéroïde dans un explant de peau, a révélé la perte de la structure du sphéroïde implanté, associé à la mortalité par apoptose des cellules le constituant, principalement dans les couches cellulaires périphériques (**cf Résultats, Figures 36 et 37**).

Ce profil d'apoptose n'a jamais été observé lors de la culture des sphéroïdes dans des conditions standard. Différentes hypothèses ont été émises afin de chercher à identifier les facteurs pouvant être impliqués dans ce phénomène (**Figure 49**). Celles-ci peuvent être divisées en deux groupes :

- la mortalité observée peut être liée aux conditions de production du modèle ;
- elle peut être associée à l'une des caractéristiques du microenvironnement dans lequel le sphéroïde se développe après implantation.

### 1. Impact des conditions de production du modèle OncoSkin®

Au cours du projet, l'impact de différents paramètres relatifs à la production du modèle a été évalué, notamment les caractéristiques de la procédure d'implantation développée et le type cellulaire implanté. Ces différentes hypothèses sont discutées dans cette partie.

#### 1.1 Hypothèse 1 : la mortalité des sphéroïdes est liée aux conditions d'implantation

Comme décrit de façon détaillée dans la partie résultats, le modèle OncoSkin® est produit en implantant un sphéroïde d'environ 800 µm dans le derme d'un explant de peau, au sein d'une solution de gélatine visqueuse.

Nous nous sommes tout d'abord interrogés sur le rôle que pouvaient jouer les conditions d'implantation sur la viabilité du sphéroïde, en particulier l'impact de la gélatine. La biocompatibilité de cette dernière est documentée (D. P. Clark, Hanke, and Swanson 1989; Stevens et al. 2002; Koshy et al. 2014), mais l'une des hypothèses pouvant expliquer sa disparition est sa dégradation par les gélatinases de la peau. L'injection de cette solution dans le derme des explants, sans altérer la viabilité de la peau (**cf Résultats, Figure 29**), pourrait entraîner une augmentation de l'activité des protéases responsables du renouvellement de la matrice extracellulaire, la gélatine étant dégradée notamment par les métalloprotéases MMP-2 et 9 (Murphy and Crabbe 1995; Toth and Fridman 2001). Cependant, de nombreuses études ont montré que les métalloprotéases de la matrice extracellulaire, et en particulier les



gélatinases MMP-2 et 9, induisent la croissance tumorale et l'invasion des cellules tumorales (Nyormoi, Mills, and Bar-Eli 2003; O'Grady et al. 2007). Dans le cas du mélanome, l'expression de ces protéases est par ailleurs particulièrement importante au cours du stade métastatique (Hofmann et al. 1999; Redondo et al. 2005). Il semblerait donc peu probable qu'une surexpression de ces protéases dans le modèle implanté soit à l'origine de la mortalité du sphéroïde.

Par ailleurs, des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres solutions d'implantation telles que du PBS ou de l'agarose Low Melting Point, qui n'est pas dégradé par la peau et reste visible autour du sphéroïde après plusieurs jours de culture (**cf Résultats, Figure 41**). Ces expériences semblent suggérer que la mortalité observée des sphéroïdes est indépendante de ce critère.

L'implantation de sphéroïdes de plus petite taille, composés d'un nombre moins important de cellules, n'a pas non plus permis d'observer une amélioration de leur viabilité au sein du modèle (**cf Résultats, Figure 42**). A l'inverse, leur structure semble plus fragilisée par le procédé d'implantation, suggérant que l'implantation de sphéroïdes mieux structurés, d'environ 800 µm, est préférable pour produire le modèle.

## 1.2 Hypothèse 2 : la mortalité des sphéroïdes est dépendante du type cellulaire implanté

Initialement, des sphéroïdes produits à partir de la lignée de mélanome WM-266-4 ont été implantés. Ce choix a été guidé par la pertinence de cette lignée vis-à-vis de la procédure de production du modèle OncoSkin®. Elle a en effet été développée à partir d'une métastase cutanée de mélanome, il était donc pertinent de penser qu'elle pourrait se développer après implantation dans le derme des explants de peau. Après avoir observé l'apoptose massive à laquelle les sphéroïdes issus de cette lignée étaient soumis, nous avons implanté des sphéroïdes produits à partir d'autres types cellulaires afin de déterminer si ce comportement était spécifiquement lié à cette lignée ou non.

Des sphéroïdes produits à partir de cellules de la lignée de mélanome primaire WM-115 ont été implantés. Cette lignée a été établie à partir d'une tumeur primaire de mélanome en phase de croissance radiale, encore localisée au niveau de l'épiderme de la peau. Il est donc moins pertinent de l'implanter dans le derme que des sphéroïdes de cellules de la lignée WM-266-4, mais ces deux lignées provenant du même patient et possédant des profils de mutations similaires, nous avons souhaité comparer leur évolution après implantation.

Des sphéroïdes de la lignée d'adénocarcinome humain HCT116 ont également été implantés dans des explants de peau. Cette lignée est en effet couramment utilisée et disponible dans

le laboratoire, et ce type de cancer est connu pour former des métastases dans la peau (Hu et al. 2009), son implantation s'avérait donc pertinente dans ce contexte.

Par ailleurs, nous avons implanté des sphéroïdes produits à partir de kératinocytes et mélanocytes primaires. Bien que ces types cellulaires ne soient pas naturellement localisés dans le derme, nous souhaitons évaluer la viabilité de cellules non cancéreuses et issues de cultures primaires après implantation.

Dans ces différents cas, la caractérisation des sphéroïdes implantés a révélé des changements morphologiques similaires à ceux observés dans le cas de l'implantation des WM-266-4, et une apparition de cellules apoptotiques dans les couches extérieures du sphéroïde plus particulièrement dans le cas des sphéroïdes produits à partir de cellules HCT116.

L'ensemble des résultats obtenus semble donc suggérer que le phénomène de mortalité observé est indépendant de la lignée. Cependant, il pourrait être intéressant de confirmer cette hypothèse en élargissant le panel de sphéroïdes implantés : l'implantation de sphéroïdes de fibroblastes primaires pourrait s'avérer plus pertinente que celle de kératinocytes et mélanocytes, et d'autres lignées de mélanome métastatique, telles que les lignées G361 et A375, dérivées de tumeurs primaires de mélanome et porteuses notamment de mutations de BRAF (V600E) et CDKN2A et couramment utilisées pour étudier le mélanome (Hesling et al. 2004; J. Lee et al. 2009; Su et al. 2009; Mo et al. 2013; O'Connell et al. 2013; Larson et al. 2014), pourraient également venir compléter ces résultats de façon intéressante.

## **2. Impact du microenvironnement du modèle OncoSkin® sur la viabilité des sphéroïdes**

L'implantation de sphéroïdes de la lignée WM-266-4 dans une peau préalablement desséchée a révélé de façon surprenante qu'à l'inverse des résultats obtenus en peau normale, les cellules du sphéroïde n'entrent pas en apoptose mais continuent de proliférer plusieurs jours après implantation, notamment au niveau des couches cellulaires périphériques du sphéroïde. Par ailleurs, la déformation systématique des sphéroïdes lors de leur implantation dans une peau vivante, caractérisée par un aplatissement selon un axe parallèle à l'épiderme et aux fibres de collagène du derme réticulaire, n'est pas observée lors de leur implantation dans une peau desséchée.

Dans le modèle de peau desséchée, deux facteurs généraux semblent être modifiés par rapport à une peau normale et pourraient être à l'origine des différences observées sur la viabilité des sphéroïdes : comme il l'a été montré dans les résultats, les cellules du tissu ne sont plus viables. Par ailleurs, la contrainte mécanique exercée par le tissu sur le sphéroïde

peut être altérée, comme semble en témoigner la différence de morphologie observée entre les sphéroïdes cultivés dans une peau normale et dans une peau vivante.

### 2.1 Hypothèse 1 : la mortalité des sphéroïdes est liée à la contrainte mécanique

Les résultats obtenus lors de la mise sous contrainte des sphéroïdes de cellules de WM-266-4 en culture dans de l'agarose Low Melting Point ont révélé une modification de la structure des sphéroïdes avec les deux concentrations les plus importantes, de 3 et 4% respectivement : les sphéroïdes perdent leur cohésion, sans toutefois qu'aucune cellule apoptotique ne soit détectée à la périphérie de leur structure. Leur croissance, déterminée par l'augmentation de leur aire, semble ralentie sous l'effet de la contrainte, sans qu'une diminution de la prolifération des cellules ne soit détectée par immunomarquage en fluorescence du marqueur de prolifération Ki67.

Ces résultats sont cohérents avec de précédentes études menées sur des sphéroïdes contraints en agarose, qui avaient également révélé l'inhibition de leur croissance. Celle-ci était cependant associée à une diminution de l'apoptose au sein du sphéroïde sans changement de prolifération (Helmlinger et al. 1997).

Par ailleurs, des travaux plus récents ont révélé que la contrainte mécanique exercée par le microenvironnement sur des sphéroïdes en culture induisait des défauts de progression de la mitose des cellules, mis en évidence à l'aide de marqueurs spécifiques des phases du cycle cellulaire (Desmaison et al. 2013). Il serait donc possible que dans le cas de notre expérience, certaines des cellules Ki67 positives ne soient pas réellement en cours de division mais soient bloquées dans le cycle cellulaire, expliquant les différences de tailles de sphéroïdes observées entre les différentes conditions. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en analysant l'expression de marqueurs plus spécifiques des différentes phases du cycle cellulaire, tels que des marqueurs Fucci (Laurent et al. 2013) ou par incorporation de 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (Salic and Mitchison 2008; Yu et al. 2009).

Dans les conditions de l'expérience, l'immunomarquage de la caspase-3 active n'a pas révélé de profil d'expression similaire à celui observé dans les sphéroïdes implantés en peau vivante, suggérant que la contrainte mécanique ne serait pas à l'origine de la mortalité cellulaire observée dans les sphéroïdes après implantation.

Cependant, il serait intéressant d'approfondir ces résultats. D'autres équipes ont en effet montré que les propriétés mécaniques du microenvironnement pouvaient induire l'apoptose des cellules dans les régions des sphéroïdes soumises à un stress compressif élevé, tandis que les cellules prolifératives étaient localisées dans les régions soumises à un stress moins important (Cheng et al. 2009). Par ailleurs, des profils d'apoptose similaires à ceux observés dans des sphéroïdes implantés (cellules apoptotiques localisées dans les couches

périphériques des sphéroïdes) ont également été observés dans le cadre d'autres travaux de l'équipe sur des sphéroïdes de la lignée HCT116 cultivés en agarose Low-melting 1%, révélant une couronne de cellules apoptotiques en périphérie (résultats non publiés). Ces différents résultats suggèrent que la contrainte mécanique du microenvironnement peut induire ce type de profil d'apoptose. Cependant, dans le cas de notre expérience, de tels phénomènes n'ont pas été observés. Les concentrations d'agarose utilisées ont été choisies arbitrairement, dans le but d'exercer des contraintes mécaniques plus ou moins importantes sur les sphéroïdes. Les différences d'effets observés sur les sphéroïdes de WM-266-4 suggèrent que ces derniers réagissent différemment selon l'importance de la contrainte mécanique à laquelle ils sont soumis. L'agarose n'est pas un constituant naturel de la matrice extracellulaire de la peau et possède donc des propriétés mécaniques différentes de celles du tissu. Les propriétés mécaniques de la peau, et plus particulièrement du derme, sont principalement liées aux fibres de collagène et d'élastine qui constituent la matrice extracellulaire (Silver, Freeman, and DeVore 2001). Ces différentes fibres confèrent notamment à la peau son élasticité et lui permettent de retrouver son organisation originelle après une déformation ou un choc.

Afin d'évaluer de façon plus fiable l'impact que peuvent avoir les contraintes mécaniques sur la viabilité du sphéroïde implanté, il pourrait être intéressant de modifier les conditions expérimentales, en implantant des sphéroïdes de la lignée WM-266-4 dans des matrices de collagène de concentrations différentes par exemple. Cette expérience permettrait d'évaluer la viabilité des cellules du sphéroïde dans un microenvironnement plus proche de celui rencontré dans la peau. L'implantation du sphéroïde après formation de la matrice plutôt que l'enrobage direct des sphéroïdes dans la matrice durant sa préparation permettrait également de mieux appréhender l'effet de l'implantation sur la déformation des fibres.

Un autre axe de réflexion intéressant réside dans la comparaison de la structure des sphéroïdes implantés dans les explants vivants ou desséchés : dans le premier cas de figure, les sphéroïdes s'aplatissent de façon systématique et parallèle à l'orientation générale des fibres de collagène du derme réticulaire, qui sont elles-mêmes parallèles à la surface de la peau (Albanna 2016). Cette déformation pourrait témoigner de la présence d'une contrainte mécanique s'exerçant sur le sphéroïde. Dans les explants de peau desséchés, ce type de déformation n'est pas observé, excluant un effet qui pourrait être associé à la direction de l'implantation. Cette observation pourrait peut-être être uniquement corrélée à la viabilité des sphéroïdes, qui réagiraient différemment à la contrainte selon leur état, mais pourrait également refléter une différence de contrainte mécanique appliquée sur le sphéroïde par le microenvironnement. Afin d'approfondir ce point, il pourrait être intéressant de caractériser l'intégrité et l'orientation des fibres de collagène et d'élastine dans les explants de peau non

desséchés avant et après implantation d'un sphéroïde, et de comparer ces données à celles obtenues dans un explant de peau non desséché.

Un mécanisme de fonctionnement pourrait être proposé pour expliquer cette différence : dans la peau normale, l'élasticité du réseau de fibres pourrait lui permettre de se déformer au moment de l'implantation du sphéroïde sur le passage de l'aiguille (Verhaegen et al. 2012). Après le retrait de cette dernière, les fibres reprendraient rapidement leur position d'origine, entraînant l'application d'une contrainte sur le sphéroïde et sa déformation consécutive selon un axe parallèle aux fibres. La dessiccation de la peau pourrait entraîner la perte d'élasticité du réseau de fibres et le rend moins déformable et plus cassant. Il a en effet été montré que l'eau jouait un rôle important dans la stabilisation de la structure du collagène (Eklouh-Molinier et al. 2015). Les fibres, endommagées au moment du passage de l'aiguille dans le derme pour implanter le sphéroïde, ne retrouveraient pas leur configuration d'origine après le retrait de l'aiguille. Les sphéroïdes ne seraient ainsi pas soumis à la même contrainte que dans la peau normale.

Afin d'explorer l'effet de la contrainte mécanique sur les sphéroïdes implantés, il pourrait être également intéressant d'implanter les sphéroïdes dans le derme papillaire plutôt que le derme réticulaire, celui-ci étant composé de fibres plus courtes et orientées perpendiculairement à la surface de la peau, qui lui confèrent une structure plus lâche (Freinkel and Woodley 2001; Crickx 2005a). Cependant, l'implantation spécifique du sphéroïde dans ce compartiment de la peau serait très difficile à mettre en œuvre et contrôler, le derme papillaire étant une région beaucoup plus fine que le derme réticulaire.

Une autre expérience intéressante pourrait consister à implanter une suspension de cellules plutôt qu'un sphéroïde. Il pourrait en effet être envisageable que la contrainte mécanique exercée par les fibres de collagène sur les cellules implantées soit alors moins importante, la déformation induite par l'implantation étant également moindre. Ce procédé pourrait également être plus cohérent avec le développement du mélanome, qui se fait par multiplication progressive des cellules tumorales depuis l'épiderme (**cf Introduction, Figure 10**).

Un autre point pourrait être intéressant à étudier : au cours du processus de cicatrisation, les fibroblastes de la peau se différencient en myofibroblastes au niveau du tissu de granulation. Cette différenciation leur permet d'acquérir des propriétés contractiles similaires à celles d'un muscle mou afin de contracter les bords de la plaie (Darby et al. 2014).

Le modèle OncoSkin® est produit à partir d'une biopsie excisée du reste de la peau et pourrait ainsi éventuellement posséder des caractéristiques se rapprochant de celles d'un tissu en cours de cicatrisation (Greenwald et al. 1992). Par ailleurs, l'implantation en elle-même du sphéroïde pourrait générer une réponse cicatricielle. Il pourrait être intéressant de caractériser

la présence de myofibroblastes dans le modèle, par exemple à l'aide d'immunomarquages de l'actine  $\alpha$ -SM, un marqueur de différenciation des myofibroblastes (Darby et al. 2014). La présence de ces cellules dans le tissu pourrait induire une modification des propriétés mécaniques s'exerçant sur le sphéroïde par rapport à une peau normale in vivo. Dans le cas où elles seraient activées dans le modèle, la perte de la viabilité induite dans le modèle préalablement desséché impacterait également la viabilité de ces cellules et donc les propriétés mécaniques du tissu.

## 2.2 Hypothèse 2 : la mortalité du sphéroïde est liée à des facteurs sécrétés par la peau vivante

Afin d'évaluer le rôle que pourraient jouer les facteurs produits par les cellules de la peau et sécrétés dans le milieu de culture, les sphéroïdes de cellules WM-266-4 ont été cultivés dans du milieu préalablement conditionné par des explants de peau implantés. Deux modes de culture des explants ont été testés : enrobés dans la matrice des modèles NativeSkin® ou en flottaison. Les différentes façons de conditionner le milieu n'ont pas abouti aux mêmes résultats sur les sphéroïdes, l'effet étant plus important pour les modèles cultivés directement au contact du milieu de culture pendant un temps plus long, et moins important pour les culture plus courtes et dans le modèle OncoSkin®, enrobé dans la matrice.. Ces différences pourraient être associées à une différence de concentration de facteurs sécrétés dans le milieu, qui serait liée à leur diffusion plus ou moins importante de la peau vers le milieu selon la technique de conditionnement employée. La condition de conditionnement en flottaison durant 48 heures a révélé une inhibition de la croissance des sphéroïdes, une diminution de la prolifération des cellules périphérique, et une mortalité probable des cellules de la couronne extérieure, comme le suggère la présence de quelques cellules pycnotiques à la périphérie du sphéroïde et la présence de cellules détachées au fond des puits de culture. Aucune analyse n'a cependant été effectuée sur ces cellules pour confirmer leur mortalité. Outre la couronne périphérique qui semble s'être détachée, la structure des sphéroïdes semble intègre, et aucune cellule apoptotique n'a été détectée au sein du sphéroïde.

Ces différentes observations suggèrent que des facteurs sécrétés par le modèle implanté ont un effet délétère sur les sphéroïdes, mais que cet effet est limité aux cellules de la périphérie du sphéroïde et ne s'étend pas jusqu'au cœur du sphéroïde. Cette toxicité limitée pourrait être liée à la concentration des facteurs dans le milieu de culture, ou bien à leur diffusion limitée dans le sphéroïde.

Nous nous sommes interrogés sur les facteurs qui pouvaient être sécrétés par le modèle OncoSkin® et impliqués dans la mortalité cellulaire au sein des sphéroïdes. Dans le modèle



NativeSkin®, la présence de différentes cytokines a été étudiée et a révélé l'expression importante de certaines cytokines, notamment l'interleukine-6 (IL-6) et l'interleukine-8 (IL-8) et l'absence d'autres cytokines, notamment le facteur de nécrose tumorale TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha). Dans le cas du mélanome, l'interleukine-6 est décrite comme un facteur promoteur de la croissance tumorale, au-travers d'une action anti-apoptotique (Hoejberg, Bastholt, and Schmidt 2012). L'interleukine-8 est quant à elle associée à l'invasion des cellules tumorales et est impliquée dans les mécanismes d'angiogenèse (Bar-Eli 1999). La présence de ces deux cytokines dans le modèle OncoSkin® ne devrait donc pas avoir un effet délétère sur la viabilité des sphéroïdes implantés. L'étude de l'effet du TNF- $\alpha$  sur des cellules de mélanome a révélé son rôle dans l'invasion et la migration des cellules tumorales, via l'activation des gélatinases MMP-2 et 9, impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (Katerinaki et al. 2003). Son absence dans le modèle implanté pourrait éventuellement être corrélée à l'incapacité des cellules implantées à se développer dans le modèle.

D'une façon générale, le profil de mortalité observé lors de la culture des sphéroïdes dans du milieu conditionné semble similaire à celui observé dans les sphéroïdes implantés, bien que la structure des sphéroïdes implantés soit par ailleurs altérée. Il pourrait être intéressant de caractériser les cellules détachées du sphéroïde et restées dans les puits de culture afin de vérifier si leur mort se fait par apoptose. Si tel était le cas, il serait intéressant de mieux caractériser ce phénomène d'apoptose. Il existe en effet deux principales voies conduisant à l'apoptose cellulaire, activées par des signaux différents (Elmore 2007) :

- la voie extrinsèque est activée par des récepteurs de mort de la famille des TNF (Tumor Necrosis Factor) en réponse à la reconnaissance intercellulaire de ligands tels que le TNF- $\alpha$ , le Fas ligand ou des ligands de la famille Apo (Apo2 ou Apo3). Cette voie est également impliquée dans l'apoptose liée à une réponse immunitaire.
- la voie intrinsèque est initiée dans les mitochondries des cellules. Elle peut être activée par des stimuli positifs, tels que des radiations, des toxines, l'hypoxie ou des infections virales, ou des stimuli négatifs, comme par exemple l'absence de facteurs de croissance ou de cytokines.

Une troisième voie, la voie perforine / Granzyme, repose sur l'activation d'une cascade de sérine-protéases, les granzymes. Cette voie est notamment activée par les cellules T cytotoxiques.

Ces différentes voies impliquent des cascades d'activation différentes avant de se rejoindre pour activer la caspase-3, qui est le marqueur que nous avons choisi d'étudier durant ce projet. Afin de réduire le nombre de facteurs pouvant être impliqués dans la mortalité des sphéroïdes de WM-266-4 implantés, il pourrait être intéressant de déterminer la ou les voie(s) impliquée(s)



plus spécifiquement dans leur processus d'apoptose. Cette étude pourrait être conduite en analysant l'expression d'effecteurs plus spécifiques de ces différentes voies, telles que l'activation de la caspase-8 pour la voie extrinsèque, de la caspase-9 pour la voie intrinsèque, ou de la caspase-10 pour la voie perforine / Granzyme.

Des études génomiques ont révélé que la lignée WM-266-4 surexprime un grand nombre de gènes antiapoptotiques et sous-exprime des gènes proapoptotiques impliqués dans la voie mitochondriale d'induction de l'apoptose (Su et al. 2009). Ces informations pourraient suggérer que l'apoptose observée dans les sphéroïdes de WM-266-4 après implantation ne serait pas liée à l'activation de la voie intrinsèque.

La caractérisation du modèle NativeSkin® a par ailleurs révélé la présence de cellules résidentes du système immunitaire, telles que des cellules de Langerhans ou des cellules T, qui pourraient être qui pourraient éventuellement induire l'activation des voies extrinsèques ou perforine / granzyme de l'apoptose. Cependant, l'analyse des coupes histologiques des modèles implantés avec des anatomopathologistes n'a pas révélé la présence particulière de ces cellules autour du sphéroïde implanté, et le recrutement de ces cellules pour induire une réponse cytotoxique contre les cellules de mélanome implanté semble limité en l'absence de circulation dans le modèle.

Une approche métabolomique pourrait permettre d'analyser le métabolisme de la peau et d'identifier les principaux métabolites sécrétés dans le milieu de culture. Cependant, l'étude de l'effet de différents facteurs affectant potentiellement la viabilité du sphéroïde ne serait pas forcément une approche très pertinente : lorsqu'il est implanté dans le derme, le sphéroïde est immédiatement soumis à un ensemble d'éléments participant à un nouveau microenvironnement, tels qu'un grand nombre de facteurs sécrétés, une contrainte mécanique importante et une diminution potentielle de l'accessibilité en nutriments et en oxygène par rapport à ses conditions de culture dans un puits de plaque 96 puits. Ces facteurs, pris un à un, ne sont pas forcément suffisants pour induire la mortalité importante observée rapidement après son implantation. Mais la synergie de ces différents éléments pourrait entrer en jeu et aboutir à l'induction de l'apoptose. Dans une peau préalablement desséchée, la quantité de facteurs auxquels le sphéroïde est soumis est moins importante que dans une peau normale, du fait de la perte de viabilité du tissu et d'une contrainte mécanique différente. La limitation du nombre de facteurs en jeu pourrait permettre au sphéroïde de se développer.

Une proposition de mécanisme expliquant les effets observés sur le sphéroïde après implantation pourrait reposer sur une action combinée de la contrainte mécanique exercée par le réseau de fibres du derme et de facteurs sécrétés par la peau : la contrainte mécanique serait principalement responsable de la perte d'intégrité de la structure du sphéroïde, tandis

que les facteurs sécrétés par la peau auraient un impact sur la viabilité des cellules de la périphérie du sphéroïde.

Enfin, il est important de noter que l'effet des facteurs sécrétés par un modèle non implanté n'a pas été évalué au cours de ce projet. Il pourrait être intéressant d'étudier l'effet de milieu conditionné par des modèles NativeSkin® et de le comparer à celui obtenu avec le milieu conditionné par des modèles implantés afin de déterminer si les facteurs induisant la mortalité des sphéroïdes de WM-266-4 sont sécrétés dans la peau normale, ou si leur production est une réponse à l'implantation des sphéroïdes.

D'une façon plus générale, dans le cadre de ce projet, il serait intéressant de parvenir à déterminer si les facteurs induisant la mortalité du sphéroïde sont naturellement sécrétés par la peau ou si leur sécrétion résulte de l'implantation du sphéroïde ou de la nature du modèle *ex vivo* NativeSkin®. En effet, si la présence de ces facteurs résultait d'une accumulation de métabolites ou de facteurs liés à des phénomènes de cicatrisation ou encore des problèmes de diffusion de nutriments, il pourrait être intéressant de revoir le développement du modèle et ses conditions de culture, en intégrant par exemple des notions de microfluidique, pour apporter une diffusion dynamique du milieu de culture et permettre l'élimination des produits du métabolisme au fur et à mesure de leur production.

### Partie 3 : Perspectives d'applications de la stratégie d'analyse *in situ* développée au cours du projet

Le modèle OncoSkin® a été conçu dans l'idée de permettre son analyse à l'aide de techniques de microscopie optique. Dans cette optique, la procédure de production du modèle comprend une étape de marquage des sphéroïdes à l'aide d'une sonde fluorescente, permettant d'identifier les cellules du sphéroïde après implantation (rappel figure procédure de production du modèle). Outre les analyses histologiques réalisées de façon classique pour caractériser le modèle, une stratégie d'analyse a été développée pour permettre de caractériser l'évolution du sphéroïde implanté *in situ*, et ainsi exploiter pleinement l'aspect tridimensionnel du modèle. Cette stratégie repose avant tout sur la mise au point d'une technique de transparisation des explants de peau, qui a rendu possible l'analyse du modèle implanté dans son intégralité en microscopie optique, selon différentes approches.

D'une part, l'imagerie macroscopique du modèle transparisé a montré son intérêt pour évaluer facilement et rapidement la localisation du sphéroïde dans l'explant de peau, l'aspect général de sa structure et la migration de ses cellules au sein de l'explant de peau. L'analyse des images acquises permet d'accéder à différentes données quantitatives sur la quantité de cellules dispersées et leur distance de migration.

D'autre part, l'imagerie en microscopie à feuille de lumière a permis d'imager en trois dimensions l'intégralité du sphéroïde implanté, et ce avec une résolution subcellulaire, permettant d'évaluer sa forme et son volume de façon précise et quantitative. L'imagerie de l'autofluorescence de la peau en parallèle a également permis de visualiser le tissu environnant le sphéroïde, donnant des informations sur son organisation.

Ces différentes techniques d'analyse du modèle *in situ* présentent des avantages par rapport à l'analyse en histologie du modèle. Cette approche ouvre tout d'abord des perspectives en termes de caractérisation de la migration des cellules tumorales dans le tissu, et permet d'envisager le suivi du développement de métastases et d'évaluer leur capacité à envahir le derme. Ce critère est en effet plus difficilement quantifiable en histologie : l'analyse n'est réalisée que sur une coupe d'une dizaine de microns d'épaisseur et n'offre donc pas un aperçu représentatif de la totalité des cellules dispersées dans le tissu. D'autre part, l'étude d'une section de la micro-tumeur ne permet pas d'évaluer sa forme et son volume en trois dimensions, alors que ces informations sont facilement accessibles en microscopie à feuille de lumière.

Dans le cas de travaux de recherche préclinique, cette approche permettrait donc d'évaluer plus facilement les effets d'un agent thérapeutique sur l'inhibition de la croissance de la tumeur et de la migration des cellules tumorales en histologie seule.

D'une façon plus générale, l'exploration en 3 dimensions de la peau en microscopie à feuille de lumière a permis d'identifier différentes structures du derme et des annexes cutanées, telles que les fibres de collagène et les fibres élastiques, les follicules pileux et les glandes sébacées et sudoripares, à partir de leur autofluorescence (**cf Résultats, Figure 32**).

Ces résultats révèlent l'intérêt de la microscopie à feuille de lumière pour observer la morphologie de la peau en trois dimensions, en s'affranchissant des limites associées aux techniques couramment utilisées pour étudier la peau, telles que l'histologie (procédé fastidieux, observation d'une section en 2D), l'imagerie confocale ou bi-photonique (profondeur de pénétration dans le tissu limitée, phototoxicité) ou la tomographie à cohérence optique (OCT) (pas de résolution cellulaire) (König et al. 2009; Decencièrre et al. 2013; Geyer et al. 2015).

Ils ouvrent également des perspectives plus larges d'applications dans le domaine de la dermatologie : l'observation de la morphologie du tissu pourrait permettre d'évaluer le développement de pathologies ou la détérioration de la peau au-travers des modifications engendrées au niveau de sa structure.

L'ensemble des travaux comprenant le développement de la transparisation d'explants de peau et leur exploration en 3 dimensions en microscopie à feuille de lumière, au SPIM et au MacroSPIM, a fait l'objet d'une publication (manuscrit en préparation), en collaboration entre l'IP3D, la plateforme d'imagerie de l'ITAV, Genoskin et Syntivia.

Enfin, il est intéressant de relever la complémentarité des approches d'histologie et d'imagerie *in situ*, illustrée au cours de ce projet : les acquisitions réalisées au microscope et au SPIM ne nous ont pas permis d'évaluer la viabilité du sphéroïde implanté et n'ont pas mis en évidence l'apoptose massive de ses cellules. Une des limites actuelles associées à l'imagerie *in situ* réside dans la difficulté d'étudier des marqueurs spécifiques à l'échelle du tissu, les immunomarquages étant par exemple difficiles à mettre en œuvre sur des échantillons entiers du fait des problèmes de diffusion des anticorps dans des échantillons épais (Renier et al. 2014). Ceci illustre bien l'intérêt de réaliser une exploration multimodale d'un même échantillon et de combiner des modalités d'imagerie moléculaire et morphologiques notamment en recherche préclinique, pour améliorer la prédictibilité de l'efficacité de composés thérapeutiques en permettant une analyse complète des modèles d'étude précliniques tridimensionnels. Le développement de telles approches multimodales est actuellement décrit comme l'un des facteurs pouvant permettre d'améliorer la prédictibilité des études menées sur

les modèles précliniques et ainsi participer à la réduction des taux d'attrition en recherche et développement (Willmann et al. 2008; de Jong, Essers, and van Weerden 2014).



# CONCLUSION GÉNÉRALE



Les travaux réalisés au cours de ce projet de thèse ont permis d'aboutir à différents résultats. Une procédure d'implantation a tout d'abord été développée pour intégrer un sphéroïde dans le derme d'un explant de peau de façon reproductible. Cette procédure a fait l'objet d'un brevet, qui protège le procédé permettant d'implanter de façon générale un amas cellulaire dans le derme d'une biopsie de peau.

Le modèle ainsi obtenu pourrait présenter l'avantage de reproduire les interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, d'une façon plus complète que les modèles *in vitro* existant actuellement, tout en étant facile à mettre en œuvre et à maintenir en culture *ex vivo*.

Cependant, la caractérisation de la viabilité du modèle a révélé la perte de viabilité rapide des sphéroïdes implantés dans un explant vivant. L'étude plus approfondie des facteurs pouvant être impliqués dans ces observations a permis de proposer une hypothèse expliquant ces résultats : la contrainte mécanique exercée par la peau sur le sphéroïde pourrait être à l'origine de sa perte de cohésion, tandis que les facteurs sécrétés par les cellules de la peau sembleraient être impliqués dans la mortalité des cellules de la périphérie des sphéroïdes. L'effet combiné de ces différents facteurs, liés à la complexité du modèle, pourrait présenter un frein à son développement.

A l'issue de ce projet, il serait nécessaire d'approfondir ces résultats afin de confirmer cette hypothèse et de pouvoir par la suite envisager de nouvelles pistes de développement du modèle. A ce jour, deux axes semblent particulièrement intéressants :

- la simplification du modèle, en implantant par exemple des cellules en suspension plutôt qu'organisées sous forme de sphéroïde, pourrait permettre de limiter l'impact de la contrainte mécanique du tissu sur les cellules ;
- l'ajout d'une dimension dynamique à la culture du modèle, à l'aide de systèmes de microfluidique, pourrait permettre de supporter sa complexité et de réduire l'impact de l'accumulation de facteurs ayant un impact négatif sur le sphéroïde à l'intérieur du tissu.

En parallèle de ces travaux, une stratégie d'analyse multimodale, notamment basée sur la transparençisation de la peau humaine (manuscrit en préparation) a été développée pour permettre d'étudier l'évolution du sphéroïde au sein de la peau sous différents aspects macroscopique, cellulaire et moléculaire. Cette approche permet d'exploiter pleinement les avantages apportés par la complexité du modèle développé et ouvre des perspectives intéressantes pour l'évaluation du potentiel thérapeutique d'un composé anti-cancéreux.

De façon plus générale, les travaux réalisés au cours de ce projet ont révélé l'intérêt de la microscopie à feuille de lumière pour explorer la peau et ses annexes cutanées en trois dimensions. Ils ouvrent des perspectives pour l'étude de sa morphologie à l'échelle

macroscopique et cellulaire, notamment en dermatologie pour étudier l'effet de facteurs extérieurs ou de pathologies sur la modification de sa structure.

L'aboutissement du développement du modèle OncoSkin® pourrait ainsi ouvrir des perspectives intéressantes pour l'étude du mélanome et l'évaluation de composés pharmacologiques ciblant cette pathologie : il pourrait permettre d'identifier et de valider des cibles thérapeutiques de façon plus prédictive que les modèles *in vitro* actuels grâce à une reproduction plus complexe des structures de la tumeur et de son microenvironnement. Son utilisation pourrait ainsi participer à la réduction de la quantité de tests devant être réalisés *in vivo* sur animaux. Une autre application intéressante pourrait résider dans l'utilisation du modèle pour des approches de thérapie ciblée, au-travers de l'implantation de cellules issues de tumeurs de patients.



# MATERIELS ET METHODES

## 1. Culture cellulaire

### 1.1 Lignées cellulaires et conditions de culture

Cette étude a nécessité la culture de plusieurs lignées cancéreuses : la lignée WM-266-4 (ATCC) issue de mélanome métastatique, la lignée WM-115 (ATCC) issue de mélanome primaire du même patient et la lignée HCT116 (ATCC) issue d'adénocarcinome colique. Ces lignées cellulaires ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium) 4.5g/L de glucose avec glutamine stabilisée et pyruvate de sodium et 3.7 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Pan Biotech) complété par 10 % de SVF (Sérum de Veau Fœtal) (Sigma) et 1% d'un mélange de pénicilline et streptomycine (Pan Biotech). Toutes les lignées ont été cultivées dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide et régulée à 5% de CO<sub>2</sub>.

### 1.2 Production des sphéroïdes

Les sphéroïdes ont été produits à partir des lignées cellulaires décrites ci-dessus dans des plaques 96 puits à fond rond spécialement traitées pour empêcher l'adhésion cellulaire (Sigma, Costar). Les cellules ont étéensemencées à hauteur de 500, 1000 ou 2000 cellules par puits puis les plaques ont été centrifugées à 190g à température ambiante pendant 6 minutes. Les sphéroïdes ont été cultivés dans 100 µL du milieu décrit ci-dessus pour les lignées cellulaires dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide et régulée à 5% de CO<sub>2</sub>. Leur milieu de culture a été renouvelé tous les 3 jours par ajout de 50 µL de milieu frais. Les milieux conditionnés ont été obtenus en maintenant des modèles OnkoSkin® ou des biopsies implantées pendant 24h ou 48h dans le milieu de culture décrit ci-dessus pour les lignées cellulaires. Sept jours après ensemencement des suspensions cellulaires, les sphéroïdes ont été récoltés puis remis en culture dans 100 µL de milieu conditionné. Les sphéroïdes de NHEK et de NHEK/NHEM ont été fournis par la société Syntivia.

### 1.3 Marquage des sphéroïdes au CMTMR™

Afin de pouvoir suivre le sphéroïde dans la peau après implantation, les sphéroïdes ont été marqués avec le marqueur fluorescent CMTMR (5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine) (Life Technologies). Ce marqueur cytoplasmique a été sélectionné parmi un panel de marqueurs testés (CellMask™ Orange et vert, CFDA SE, CellTracker™ Vert CMFDA) pour son absence de cytotoxicité et sa forte intensité de fluorescence.

Les sphéroïdes ont été incubés environ 16h dans du milieu contenant 5  $\mu$ M de CMTMR préparé à partir d'une solution stock à 1 mM en DMSO. Après un lavage en PBS (Phosphate Buffered Saline) (Pan Biotech), les sphéroïdes sont remis en culture ou implantés.

### 1.4 Culture des sphéroïdes en agarose Low Melting Point

Sept jours après centrifugation des suspensions cellulaires, les sphéroïdes obtenus ont été repris dans des solutions de 1%, 2%, 3% et 4% d'agarose Low Melting Point (Sigma) en PBS dans des plaques 12 puits. La matrice d'agarose a ensuite été découpée à l'emporte-pièce en cylindres de 11 mm de diamètre autour des sphéroïdes. Ces échantillons découpés ont ensuite été remis en culture dans 1mL de milieu de culture en plaque 12 puits.

## 2. Culture des modèles OncoSkin® et NativeSkin®

### 2.1 Préparation de la peau

Les modèles utilisés au cours de ce projet ont été produits à partir de prélèvements de peau provenant de donneurs ayant subi une dermolipectomie abdominale. Ces prélèvements ont été collectés par Genoskin après obtention du consentement éclairé des patients. Les expériences réalisées ont été conduites sur des donneurs d'origine caucasienne et de sexe féminin, allant de 25 à 55 ans.

Une fois les échantillons de peau collectés, l'absence des virus HIV 1/2 et hépatites B et C dans le sang des donneurs a été vérifiée. Les échantillons de peau ont été dégraissés, puis des biopsies circulaires de 11 mm de diamètre ont été prélevées à l'aide d'un emporte-pièce, en plaçant l'épiderme de la peau vers le haut. Les biopsies ont été placées en flottaison sur du PBS (Dominique Dutscher) en attendant d'être traitées.

### 2.2 Dessiccation de biopsies de peau

Pour produire les modèles de peau desséchée, les biopsies de peau ont été déposées dans une boîte de Pétri à sec puis maintenues dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide et régulée à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 10 jours. Elles ont ensuite transférées dans une solution de PBS environ 30 minutes pour être réhydratées avant de procéder à leur implantation.

### 2.3 Implantation des sphéroïdes

Les sphéroïdes ont été implantés selon deux procédés différents, nommés Montage n°1 et Montage n°2 dans la partie Résultats.

- *Montage n°1 : système seringue / aiguille*

10  $\mu$ L d'une solution de PBS, d'agarose Low Melting Point 10 mg/mL (1%) en PBS ou de gélatine de peau de bœuf de type B (Sigma) à 100 mg/mL maintenue à l'état liquide dans un bain à sec à 37°C ont été aspirés dans une aiguille biseautée 18G (BD Microlance) montée sur une seringue de 1 mL (Terumo), puis un sphéroïde a été aspiré dans 5 à 10  $\mu$ L de la même solution. L'aiguille a ensuite été insérée parallèlement à la surface de la peau dans le derme d'une biopsie et son contenu a été progressivement injecté.

- *Montage n°2 : système aiguille / piston*

10  $\mu$ L d'une solution de gélatine à 100 mg/mL ou 250 mg/mL maintenues à l'état liquide dans un bain à sec réglé à 37°C ont été aspirés dans une aiguille biseautée (18G) montée sur une seringue de 1 mL, puis un sphéroïde a été aspiré dans 5 à 10  $\mu$ L de la même solution. La seringue et l'aiguille ont ensuite été maintenues en position horizontale entre 3 et 5 minutes à température ambiante pour laisser les solutions de gélatine gélifier. L'aiguille a été démontée de la seringue puis introduite dans le derme d'une biopsie parallèlement à la surface de la peau. Un piston a été inséré dans le conduit de l'aiguille afin d'implanter son contenu dans le derme des explants de peau.

A l'issue des phases de développement de la procédure d'implantation, le montage n°1 a été retenu pour implanter les sphéroïdes dans une solution de gélatine visqueuse concentrée à 100 mg/mL.

### 2.4 Injection de gélatine

Un volume de 20  $\mu$ L de gélatine à 100 mg/mL à l'état liquide a été injecté dans le derme selon la technique décrite dans le montage n°1.

### 2.5 Culture des modèles OncoSkin®, NativeSkin® et des explants implantés

Les modèles OncoSkin® ont été produits en mettant en culture les explants implantés selon le procédé breveté de mise en culture des modèles NativeSkin®, puis cultivés dans 1 mL de milieu décrit pour la culture des cellules implantées correspondantes. Le milieu de culture des modèles a été renouvelé quotidiennement.



Pour la condition « Flottaison » de l'expérience dans laquelle des sphéroïdes ont été traités avec du milieu conditionné, des explants implantés ont également été cultivés directement en flottaison sur 1 mL du milieu décrit pour la culture des WM-266-4.

### 3. Analyse en histologie

#### 3.1 Fixation et inclusion en paraffine

Les biopsies de peau ont été placées dans des cassettes histologiques et incubées dans une solution de formaline tamponnée à 10% (Sigma Aldrich), durant 24 heures à température ambiante.

Les échantillons ont ensuite été progressivement déshydratés dans des bains successifs d'éthanol, de 70% à 98% (v/v), puis transférés dans des bains de cyclohexane (NormaPur) avant d'être inclus en paraffine (ParaPlast Plus). Ce procédé a été mis au point pour permettre de préserver la fluorescence des échantillons.

Les sphéroïdes ont été fixés une première fois, en formaline tamponnée à 10% (Sigma) sur la nuit, puis ont été rincés en PBS (Dominique Dutscher) et ont été repris dans une solution d'agarose de type D (Euromedex) en PBS concentrée à 1%. Des cylindres de 11 mm de diamètre d'agarose contenant les sphéroïdes ont été prélevés à l'emporte-pièce puis à nouveau fixés en formaline tamponnée à 10% (Sigma) sur la nuit. Les échantillons ont ensuite été déshydratés et inclus en paraffine selon le même procédé que celui décrit pour les échantillons de peau.

#### 3.2 Réalisation des coupes en paraffine

Des coupes des blocs de peau transversales de 10µm d'épaisseur ont été réalisées avec un microtome (Leica). Les échantillons contenant un sphéroïde implanté ont été coupés dans leur intégralité afin de pouvoir identifier et sélectionner les coupes contenant le sphéroïde, identifiables au microscope à l'aide de la fluorescence du marqueur CMTMR sur un microscope à épifluorescence (Leica DM5000).

Les coupes sélectionnées ont été placées sur des lames polarisées (SuperFrost Plus).

#### 3.3 Coloration à l'hématoxyline et éosine

La structure et l'intégrité des échantillons ont été évaluées au moyen de colorations à l'hématoxyline et à l'éosine.

Cible	Anticorps	Démasquage	Dilution (v/v)
Ki67	Souris monoclonal (DAKO, clone MIB-1)	Solution pH9 (DAKO)	1/500
Caspase-3 active	Lapin polyclonal (R&D Systems)	Solution 10 mM citrate pH6 (MM France)	1/500

Tableau 4. Conditions spécifiques aux anticorps primaires utilisés

Cible	Anticorps	Fluorochrome	Dilution (v/v)
IgG souris (H+L)	Secondaire polyclonal de chèvre (Life Technologies)	Alexa 647	1/500
IgG lapin (H+L)	Secondaire polyclonal de chèvre (Life Technologies)	Alexa 647	1/500

Tableau 5. Conditions spécifiques aux anticorps secondaires utilisés

Dans un premier temps, les lames ont été déparaffinées dans des bains successifs de xylène (NormaPur) et d'éthanol 100% et 95% (v/v) avant d'être réhydratées dans de l'eau. Elles ont été ensuite colorées dans un bain d'hématoxyline de Mayer (Q Path) durant 3 minutes puis rincées à l'eau. Après avoir été placées durant 30 secondes dans un bain d'éthanol 95% (v/v), les lames ont été placées dans un bain d'éosine Y alcoolique concentrée à 0,2% pendant 2 minutes. Pour finir, les lames ont été déshydratées dans des bains successifs d'éthanol, de 95% à 100% (v/v) et de xylène, avant d'être montées entre lames et lamelles avec le milieu de montage EuKitt® (Sigma Aldrich).

### 3.4 Immunofluorescence

La viabilité cellulaire des échantillons a été évaluée à l'aide de marquage en immunofluorescence réalisés sur des coupes de 10 µm d'épaisseur des échantillons inclus en paraffine.

Les coupes ont tout d'abord été déparaffinées dans des bains successifs de cyclohexane et d'éthanol 95% (v/v), puis réhydratées en PBS.

Une étape de démasquage a ensuite été réalisée par incubation des lames dans un tampon (**voir Tableau 4**) durant 40 minutes à 95°C. Après deux rinçages en PBS (Dominique Dutscher), les lames ont été saturées dans une solution de sérum de chèvre (Dominique Dutscher) dilué au 1/20<sup>ième</sup> (v/v) dans du PBS (Dominique Dutscher) pendant 40 minutes à 37°C. Cette étape a éventuellement été accompagnée d'une étape de perméabilisation au triton X-100 dilué à 0,5% (v/v) dans la solution de saturation.

Les échantillons ont ensuite été incubés dans une solution d'anticorps primaire préparée dans une solution de sérum de chèvre diluée au 1/20<sup>ième</sup> (v/v) sur la nuit à 4°C.

Le lendemain, après deux rinçages en PBS, l'anticorps secondaire, couplé au fluorochrome Alexa647 (Life Technologies), dilué au 1/500 (v/v) dans une solution de sérum de chèvre à 1/20 (v/v), a été incubé sur les coupes durant 1 heure à température ambiante (**voir Tableau 5**). Une contre-coloration nucléaire de 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma) a été réalisée en diluant le contre-colorant dans la solution d'anticorps secondaire à une concentration de 0,1 µg/mL.

Après 2 rinçages au PBS, les lames ont été montées avec du milieu de montage aqueux Fluoromount® (Sigma).

### 3.5 Microscopie de fluorescence et analyse d'images

Une fois séchées, des images des lames colorées ont été acquises en lumière transmise avec un microscope (Leica DMI1) équipé d'objectifs 5X, 20X et 40X et d'une caméra MC170HD (Leica).

Des images de la fluorescence des échantillons ont été acquises avec un microscope à épifluorescence (Leica DM5000) équipé d'objectifs 10X et 20x et d'une caméra ES CCD COOLsnap (Roper).

Les images en fluorescence obtenues ont été analysées avec le logiciel ImageJ.

La quantification du nombre de cellules marquées Ki67 a été réalisée de la façon suivante :

- Un seuil a été appliqué sur les images de la fluorescence du DAPI pour identifier les noyaux des cellules.
- De la même façon, un seuil identique pour toutes les conditions d'une même expérience a été appliqué aux images de la fluorescence du marquage pour identifier le signal positif.
- Les régions correspondant aux noyaux des cellules ont ensuite été reportées sur les images binarisées de la fluorescence du marquage. Le nombre de cellules marquées a été obtenu à l'aide de la fonction d'analyse de particules du logiciel, en récupérant les cellules marquées au DAPI présentant un signal positif pour le marquage.

Les cellules positives pour la caspase-3 active ont été quantifiées en segmentant manuellement 50 cellules situées dans les 5 assises cellulaires les plus périphériques des sphéroïdes, à partir du signal de fluorescence de leur contre-coloration au DAPI. La même méthodologie que celle décrite précédemment pour le marquage Ki67 a ensuite été appliquée.

### 3.6 Analyse biochimique de la viabilité cellulaire

La viabilité générale des cellules de la peau a été évaluée à l'aide d'un test Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma).

Des biopsies de 2 mm de diamètre ont été incubées dans 200 µL d'une solution de MTT pendant 18 heures dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide et régulée à 5% de CO<sub>2</sub>. A l'issue de cette incubation, les biopsies ont été fixées puis incluses en paraffine selon le procédé décrit précédemment (**Paragraphe 3.1**).

Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été observées et imagées en lumière transmise après déparaffinage avec un microscope (Leica DMI1) équipé d'un objectif 20X afin d'évaluer l'incorporation du sel de tetrazolium.

#### 4. Visualisation des biopsies de peau et des sphéroïdes *in toto*

##### 4.1 Transparisation des échantillons

Pour pouvoir procéder aux analyses *in situ* au microscope et au SPIM, les échantillons ont préalablement été transparisés. Les échantillons ont été fixés en formaline tamponnée à 10%. Trois techniques de transparisation ont par la suite été mises en œuvre.

Selon la première technique, les échantillons ont été déshydratés par des bains successifs d'éthanol de 25%, 50%, 70% et 98% (v/v) de 4 heures respectivement à température ambiante sous agitation puis maintenus en éthanol 98% sur une nuit avant d'être transférés dans une solution d'alcool de Benzyle (BA) (Sigma) et de Benzoate de Benzyle (BB) (Sigma) en proportion 1 pour 2 (v/v) et incubés 2 jours à température ambiante sous agitation.

La deuxième technique a été réalisée à partir de Di-Benzyl Ether (DBE) après une déshydratation à l'éthanol. Comme décrit pour la première technique, les échantillons ont été déshydratés par bains successifs d'éthanol de 30%, 50%, 70% et 95% (v/v) en PBS de 4 heures respectivement à température ambiante sous agitation. Ils ont ensuite été maintenus en éthanol 95% sur une nuit avant d'être transférés dans une solution de Di-Benzyl Ether (Sigma) et incubés 2 jours à température ambiante sous agitation.

La troisième technique a été réalisée à partir de DBE après une déshydratation en tetrahydrofuran (THF). Les échantillons ont été déshydratés par bain successifs de THF (Sigma) à 50% et 80% (v/v) de 2 heures respectivement puis d'un dernier bain à 100% sur la nuit à température ambiante sous agitation. Les échantillons ont ensuite été incubés dans une solution de Dichloromethane (Sigma) à 100% pendant 30 minutes. Les échantillons ont été transférés dans une solution de DBE et incubés 2 jours à température ambiante sous agitation. Suite aux étapes de mises au point, la première technique a par la suite été utilisée en routine.

##### 4.2 Macroscopie de fluorescence et analyse d'images des sphéroïdes implantés

Une fois transparisés, les échantillons ont été imagés avec un microscope (MacroFluo Z16 APO, Leica Microsystems) équipé d'une caméra (ES CCD COOLsnap, Rover) avec un objectif 2X et une bague de grossissement 0,57X. Pour ce faire les échantillons ont été placés dans le solvant de transparisation (BA-BB ou BDE) dans des cuves adaptées et positionnés de sorte que le derme soit orienté vers l'objectif. Des acquisitions ont été réalisées en lumière transmise pour visualiser la peau ainsi qu'en fluorescence pour visualiser le sphéroïde.

Les images obtenues ont été analysées avec le logiciel ImageJ. Un seuil a été appliqué sur les images de la fluorescence du sphéroïde pour binariser le signal de fluorescence. La fonction d'analyse de particules du logiciel a ensuite été utilisée pour récupérer le nombre de

particules, leur position et la circularité des sphéroïdes. La position des cellules dispersées par rapport au centre du sphéroïde a été calculée avec le logiciel Microsoft Excel. La distribution des cellules en fonction de leur distance par rapport au centre du sphéroïde a été déterminée à l'aide du logiciel Prism.

### 4.3 Visualisation des modèles OncoSkin® en microscopie à feuille de lumière

Les échantillons transparisés ont également été imagés via la microscopie SPIM (Lorenzo et al. 2011). L'échantillon transparisé a été placé dans un porte-échantillon en BABB puis imagé grâce à un objectif à air 5X comme décrit dans les résultats (**Figure 32A**).

Les acquisitions de z-stacks ont été réalisées avec une excitation laser à 491nm et un filtre 510-20 à l'émission pour visualiser l'autofluorescence de la peau et avec une excitation à 532nm et une détection avec un filtre 593 LP pour visualiser le marquage du CMTMR. Classiquement le pas d'acquisition en z a été de 1,3nm.

L'analyse d'image a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ pour obtenir les projections en intensité maximale et du logiciel Imaris pour les visualisations 3D. Le sphéroïde a été segmenté à l'aide du logiciel Imaris.

### 4.4 Imagerie et analyse des sphéroïdes en culture

La morphologie et la croissance des sphéroïdes cultivés en plaque 96 puits ont été évaluées au cours de leur culture pour certaines expériences.

Des images des sphéroïdes ont été acquises en lumière transmise avec un Arrayscan™ (VTI HCS Reader, Thermo). L'aire des sphéroïdes a été déterminée à partir des images obtenues par segmentation du contour des sphéroïdes à l'aide d'un programme défini dans le logiciel Cellomics du microscope. Le rapport des aires en fin et début de culture a été calculé pour chaque sphéroïde, et les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Prism à l'aide du test statistique non paramétrique de Wilcoxon Mann-Whitney.







# LISTE DES ABREVIATIONS

ADNc : Acide Désoxyribonucléique cyclique

ARN : Acide Ribonucléique

BA : Benzyl Alcohol

BB : Benzyl Benzoate

BCL2A1 :B-Cell CLL/Lymphoma 2

CFDA SE : CarboxylFluorescein DiAcetate Succinimidyl Ester

CMFDA : 5-ChloroMethylFluorescein DiAcetate

CMTMR : (5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine)

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de Carbone

CDK4 : Cyclin-Dependant Kinase 4

CDKN2A : Cyclin-Dependant Kinase 2A inhibitor

CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4

DAPI : 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DBE : Di-Benzyl Ether

DMBA : 7,12-DiMethylBenz[a]Anthracene

DMEM : Dubelcco's Modified Eagle Medium

DMSO : DiMethylSulfOxyde

DOPA : 3,4-Dihydrophénylalanine

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

FDA : Food and Drugs Administration

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HIV : *Human Immunodeficiency Virus*

IFN : Interféron alpha 2b

IL-2 : Interleukine 2

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MC1R : MelanoCortin Receptor 1

MEK : MAPK/ERK Kinase

MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor

MSH : Melanocyte-Stimulating Hormone

MTT : Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide

NRAS : Neuroblastoma RAS

PBS : Phosphate Buffered Saline

PD-1 : Programmed cell death 1

PDX : Patient-Derived Xenograft

PI(3)K : Phosphoinositide 3-Kinase

PKB : Protéine Kinase B

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

RGP : Radial Growth Phase

RHE : Reconstructed Human Epidermis

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

SVF : Sérum de Veau Fœtal

SPIM : Single Plane Illumination Microscopy

TERT : Telomerase Reverse Transcriptase

THF : TetraHydroFuran

TP53 : Tumor Protein 53

TPA : Terephthalic Acid

TRAIL : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

UV : Ultra-Violet

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VGP : Vertical Growth Phase



# REFERENCES

## BIBLIOGRAPHIQUES

## A

- Abaci, Hasan Erbil, Karl Gledhill, Zongyou Guo, Angela M. Christiano, and Michael L. Shuler. 2015. "Pumpless Microfluidic Platform for Drug Testing on Human Skin Equivalents." *Lab on a Chip* 15 (3): 882–88. doi:10.1039/c4lc00999a.
- Albanna, Mohammad Z. 2016. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Boston, MA: Elsevier.
- Alexander, Caroline M., Ildiko Kasza, C.-L. Eric Yen, Scott B. Reeder, Diego Hernando, Richard L. Gallo, Colin A. B. Jahoda, Valerie Horsley, and Ormond A. MacDougald. 2015. "Dermal White Adipose Tissue: A New Component of the Thermogenic Response." *Journal of Lipid Research* 56 (11): 2061–69. doi:10.1194/jlr.R062893.
- Aoude, Lauren G., Karin A. W. Wadt, Antonia L. Pritchard, and Nicholas K. Hayward. 2015. "Genetics of Familial Melanoma: 20 Years after CDKN2A." *Pigment Cell & Melanoma Research* 28 (2): 148–60. doi:10.1111/pcmr.12333.
- Armstrong, Jane L., Marco Corazzari, Shaun Martin, Vittoria Pagliarini, Laura Falasca, David S. Hill, Nicola Ellis, et al. 2011. "Oncogenic B-RAF Signaling in Melanoma Impairs the Therapeutic Advantage of Autophagy Inhibition." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (8): 2216–26. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3003.
- Ascierto, Paolo A., David Minor, Antoni Ribas, Celeste Lebbe, Anne O'Hagan, Niki Arya, Mary Guckert, et al. 2013. "Phase II Trial (BREAK-2) of the BRAF Inhibitor Dabrafenib (GSK2118436) in Patients with Metastatic Melanoma." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (26): 3205–11. doi:10.1200/JCO.2013.49.8691.
- Azaripour, Adriano, Tonny Lagerweij, Christina Scharfbillig, Anna Elisabeth Jadczyk, Brita Willershausen, and Cornelis J.F. Van Noorden. 2016. "A Survey of Clearing Techniques for 3D Imaging of Tissues with Special Reference to Connective Tissue." *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, April. doi:10.1016/j.proghi.2016.04.001.

## B

- Balch, Charles M., Seng-jaw Soong, Jeffrey E. Gershenwald, John F. Thompson, Daniel G. Coit, Michael B. Atkins, Shouluan Ding, et al. 2013. "Age as a Prognostic Factor in Patients with Localized Melanoma and Regional Metastases." *Annals of Surgical Oncology* 20 (12): 3961–68. doi:10.1245/s10434-013-3100-9.
- Bankert, R. B., N. K. Egilmez, and S. D. Hess. 2001. "Human-SCID Mouse Chimeric Models for the Evaluation of Anti-Cancer Therapies." *Trends in Immunology* 22 (7): 386–93.



- Bar-Eli, M. 1999. "Role of Interleukin-8 in Tumor Growth and Metastasis of Human Melanoma." *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology* 67 (1): 12–18.
- Beaumont, Kimberley, Nethia Mohana-Kumaran, and Nikolas Haass. 2013. "Modeling Melanoma In Vitro and In Vivo." *Healthcare* 2 (1): 27–46. doi:10.3390/healthcare2010027.
- Becker, Jürgen C., Roland Houben, David Schrama, Heike Voigt, Selma Ugurel, and Ralph A. Reisfeld. 2010. "Mouse Models for Melanoma: A Personal Perspective." *Experimental Dermatology* 19 (2): 157–64. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00986.x.
- Bello, Y. M., A. F. Falabella, and W. H. Eaglstein. 2001. "Tissue-Engineered Skin. Current Status in Wound Healing." *American Journal of Clinical Dermatology* 2 (5): 305–13.
- Bollag, Gideon, Peter Hirth, James Tsai, Jiazhong Zhang, Prabha N. Ibrahim, Hanna Cho, Wayne Spevak, et al. 2010. "Clinical Efficacy of a RAF Inhibitor Needs Broad Target Blockade in BRAF-Mutant Melanoma." *Nature* 467 (7315): 596–99. doi:10.1038/nature09454.
- Bond, John Russell., and Brian William. Barry. 1988. "Hairless Mouse Skin Is Limited as a Model for Assessing the Effects of Penetration Enhancers in Human Skin." *Journal of Investigative Dermatology* 90 (6): 810–13. doi:10.1111/1523-1747.ep12462031.
- Boulais, Nicholas, and Laurent Misery. 2007. "Merkel Cells." *Journal of the American Academy of Dermatology* 57 (1): 147–65. doi:10.1016/j.jaad.2007.02.009.

## C

- Calapre, Leslie, Elin S. Gray, Sandrine Kurdykowski, Anthony David, Prue Hart, Pascal Descargues, and Mel Ziman. 2016. "Heat-Mediated Reduction of Apoptosis in UVB-Damaged Keratinocytes in Vitro and in Human Skin Ex Vivo." *BMC Dermatology* 16: 6. doi:10.1186/s12895-016-0043-4.
- Chapman, Paul B., Axel Hauschild, Caroline Robert, John B. Haanen, Paolo Ascierto, James Larkin, Reinhard Dummer, et al. 2011. "Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation." *New England Journal of Medicine* 364 (26): 2507–16. doi:10.1056/NEJMoa1103782.
- Chin, Lynda. 2003. "The Genetics of Malignant Melanoma: Lessons from Mouse and Man." *Nature Reviews. Cancer* 3 (8): 559–70. doi:10.1038/nrc1145.
- Clark, D. P., C. W. Hanke, and N. A. Swanson. 1989. "Dermal Implants: Safety of Products Injected for Soft Tissue Augmentation." *Journal of the American Academy of Dermatology* 21 (5 Pt 1): 992–98.

- Clark, W. H. 1991. "Tumour Progression and the Nature of Cancer." *British Journal of Cancer* 64 (4): 631–44.
- Combest, Austin J., Patrick J. Roberts, Patrick M. Dillon, Katie Sandison, Suzan K. Hanna, Charlene Ross, Sohrab Habibi, et al. 2012. "Genetically Engineered Cancer Models, But Not Xenografts, Faithfully Predict Anticancer Drug Exposure in Melanoma Tumors." *The Oncologist* 17 (10): 1303–16. doi:10.1634/theoncologist.2012-0274.
- Correia, Ana Luísa, and Mina J. Bissell. 2012. "The Tumor Microenvironment Is a Dominant Force in Multidrug Resistance." *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 15 (1-2): 39–49. doi:10.1016/j.drug.2012.01.006.
- Crickx, Béatrice. 2005a. "Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes." *Annales de Dermatologie et Vénéréologie*, Comprendre la peau, 132 (8S): 5–48.
- . 2005b. "Les grandes fonctions de la peau." *Annales de Dermatologie et Vénéréologie*, Comprendre la peau, 132 (8S): 49–68.
- Cummins, Deborah L., Jordan M. Cummins, Hardin Pantle, Michael A. Silverman, Aimee L. Leonard, and Arjun Chanmugam. 2006. "Cutaneous Malignant Melanoma." *Mayo Clinic Proceedings* 81 (4): 500–507. doi:10.4065/81.4.500.

## D

- Damsky, W. E., N. Theodosakis, and M. Bosenberg. 2014. "Melanoma Metastasis: New Concepts and Evolving Paradigms." *Oncogene* 33 (19): 2413–22. doi:10.1038/onc.2013.194.
- Dankort, David, David P. Curley, Robert A. Cartlidge, Betsy Nelson, Anthony N. Karnezis, William E. Damsky, Mingjian J. You, Ronald A. DePinho, Martin McMahon, and Marcus Bosenberg. 2009. "Braf(V600E) Cooperates with Pten Loss to Induce Metastatic Melanoma." *Nature Genetics* 41 (5): 544–52. doi:10.1038/ng.356.
- Darby, Ian A., Betty Laverdet, Frédéric Bonté, and Alexis Desmoulière. 2014. "Fibroblasts and Myofibroblasts in Wound Healing." *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 7: 301–11. doi:10.2147/CCID.S50046.
- Das Thakur, Meghna, Fernando Salangsang, Allison S. Landman, William R. Sellers, Nancy K. Pryer, Mitchell P. Levesque, Reinhard Dummer, Martin McMahon, and Darrin D. Stuart. 2013. "Modelling Vemurafenib Resistance in Melanoma Reveals a Strategy to Forestall Drug Resistance." *Nature* 494 (7436): 251–55. doi:10.1038/nature11814.
- Decencièrre, Etienne, Emmanuelle Tancrede-Bohin, Petr Dokládál, Serge Koudoro, Ana-Maria Pena, and Thérèse Baldeweck. 2013. "Automatic 3D Segmentation of Multiphoton Images: A Key Step for the Quantification of Human Skin." *Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin*

- (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI) 19 (2): 115–24. doi:10.1111/srt.12019.
- De Fabo, Edward C., Frances P. Noonan, Thomas Fears, and Glenn Merlino. 2004. “Ultraviolet B but Not Ultraviolet A Radiation Initiates Melanoma.” *Cancer Research* 64 (18): 6372–76. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1454.
- De Jong, Marion, Jeroen Essers, and Wytske M. van Weerden. 2014. “Imaging Preclinical Tumour Models: Improving Translational Power.” *Nature Reviews Cancer* 14 (7): 481–93. doi:10.1038/nrc3751.
- Desmaison, Annaïck, Céline Frongia, Katia Grenier, Bernard Ducommun, and Valérie Lobjois. 2013. “Mechanical Stress Impairs Mitosis Progression in Multi-Cellular Tumor Spheroids.” *PloS One* 8 (12): e80447. doi:10.1371/journal.pone.0080447.
- De Wever, Bart, Sandrine Kurdykowski, and Pascal Descargues. 2015. “Human Skin Models for Research Applications in Pharmacology and Toxicology: Introducing NativeSkin®, the ‘Missing Link’ Bridging Cell Culture And/or Reconstructed Skin Models and Human Clinical Testing.” *Applied In Vitro Toxicology* 1 (1): 26–32. doi:10.1089/aivt.2014.0010.
- Deyrieux, Adeline F., and V. G. Wilson. 2007. “In Vitro Culture Conditions to Study Keratinocyte Differentiation Using the HaCaT Cell Line.” *Cytotechnology* 54 (2): 77–83. doi:10.1007/s10616-007-9076-1.
- Duracher, Lucie, Pauline Rolland, Sandrine Kurdykowski, Anthony David, Lene Visdal-Johnsen, Pascal Descargues, and Alain Mavon. 2015. “Use of NativeSkin (R) Model for Skin Delivery and Skin Metabolism Evaluations of Active Cosmetic Ingredients.” *International Journal of Cosmetic Science* 37 (1): 147–147.

## E

- Eagle, H., and G. E. Foley. 1958. “Cytotoxicity in Human Cell Cultures as a Primary Screen for the Detection of Anti-Tumor Agents.” *Cancer Research* 18 (9): 1017–25.
- Eggermont, Alexander M. M., and Caroline Robert. 2011. “New Drugs in Melanoma: It’s a Whole New World.” *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 47 (14): 2150–57. doi:10.1016/j.ejca.2011.06.052.
- Einarsdottir, Berglind O., Roger Olofsson Bagge, Joydeep Bhadury, Henrik Jespersen, Jan Mattsson, Lisa M. Nilsson, Katarina Truvé, et al. 2014. “Melanoma Patient-Derived Xenografts Accurately Model the Disease and Develop Fast Enough to Guide Treatment Decisions.” *Oncotarget* 5 (20): 9609–18.
- Eklouh-Molinier, Christophe, Teddy Happillon, Nicole Bouland, Caroline Fichel, Marie-Danièle Diébold, Jean-François Angiboust, Michel Manfait, Sylvie Brassart-Pasco, and Olivier Piot. 2015. “Investigating the Relationship between Changes in Collagen Fiber Orientation during Skin Aging and Collagen/water Interactions by Polarized-FTIR Microimaging.” *The Analyst* 140 (18): 6260–68. doi:10.1039/c5an00278h.

- Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicologic Pathology* 35 (4): 495–516. doi:10.1080/01926230701320337.
- Ernst, D. Scott, Elizabeth Eisenhauer, Nancy Wainman, Mary Davis, Reinhard Lohmann, Tara Baetz, Karl Belanger, and Michael Smylie. 2005. "Phase II Study of Perifosine in Previously Untreated Patients with Metastatic Melanoma." *Investigational New Drugs* 23 (6): 569–75. doi:10.1007/s10637-005-1157-4.
- Ertürk, Ali, Klaus Becker, Nina Jährling, Christoph P. Mauch, Caroline D. Hojer, Jackson G. Egen, Farida Hellal, Frank Bradke, Morgan Sheng, and Hans-Ulrich Dodt. 2012. "Three-Dimensional Imaging of Solvent-Cleared Organs Using 3DISCO." *Nature Protocols* 7 (11): 1983–95. doi:10.1038/nprot.2012.119.
- Eves, P., C. Layton, S. Hedley, R. A. Dawson, M. Wagner, R. Morandini, G. Ghanem, and S. Mac Neil. 2000. "Characterization of an in Vitro Model of Human Melanoma Invasion Based on Reconstructed Human Skin." *The British Journal of Dermatology* 142 (2): 210–22.

## F

- Fecher, Leslie A., Staci D. Cummings, Megan J. Keefe, and Rhoda M. Alani. 2007. "Toward a Molecular Classification of Melanoma." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (12): 1606–20. doi:10.1200/JCO.2006.06.0442.
- Fernandes, Paulo R., Paulo Bártolo, T. A. Andrade, A. F. Aguiar, F. A. Guedes, M. N. Leite, G. F. Caetano, E. B. Coelho, P. K. Das, and M. A. Frade. 2015. "4th International Conference on Tissue Engineering, ICTE2015, An ECCOMAS Thematic ConferenceEx Vivo Model of Human Skin (hOSEC) as Alternative to Animal Use for Cosmetic Tests." *Procedia Engineering* 110 (January): 67–73. doi:10.1016/j.proeng.2015.07.011.
- Fitzgerald, Kathleen A., Meenakshi Malhotra, Caroline M. Curtin, Fergal J. O' Brien, and Caitriona M. O' Driscoll. 2015. "Life in 3D Is Never Flat: 3D Models to Optimise Drug Delivery." *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 215 (October): 39–54. doi:10.1016/j.jconrel.2015.07.020.
- Flaherty, Keith T., Igor Puzanov, Kevin B. Kim, Antoni Ribas, Grant A. McArthur, Jeffrey A. Sosman, Peter J. O'Dwyer, et al. 2010. "Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma." *New England Journal of Medicine* 363 (9): 809–19. doi:10.1056/NEJMoa1002011.
- Flaherty, Keith T., Caroline Robert, Peter Hersey, Paul Nathan, Claus Garbe, Mohammed Milhem, Lev V. Demidov, et al. 2012. "Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 367 (2): 107–14. doi:10.1056/NEJMoa1203421.

Freeman-Keller, Morganna, Youngchul Kim, Heather Cronin, Allison Richards, Geoffrey Gibney, and Jeffrey S. Weber. 2016. "Nivolumab in Resected and Unresectable Metastatic Melanoma: Characteristics of Immune-Related Adverse Events and Association with Outcomes." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 22 (4): 886–94. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1136.

Freinkel, Dr R. K., and D. T. Woodley. 2001. *The Biology of the Skin*. CRC Press.

## G

Gaggioli, Cedric, and Erik Sahai. 2007. "Melanoma Invasion - Current Knowledge and Future Directions." *Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 20 (3): 161–72. doi:10.1111/j.1600-0749.2007.00378.x.

Garbe, C., P. Büttner, J. Weiss, H. P. Soyer, U. Stocker, S. Krüger, M. Roser, J. Weckbecker, R. Panizzon, and F. Bahmer. 1994. "Risk Factors for Developing Cutaneous Melanoma and Criteria for Identifying Persons at Risk: Multicenter Case-Control Study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society." *The Journal of Investigative Dermatology* 102 (5): 695–99.

Garbe, Claus, Thomas K. Eigentler, Ulrich Keilholz, Axel Hauschild, and John M. Kirkwood. 2011. "Systematic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current Status and Future Prospects." *The Oncologist* 16 (1): 5–24. doi:10.1634/theoncologist.2010-0190.

Garbe, Claus, Ketty Peris, Axel Hauschild, Philippe Saiag, Mark Middleton, Alain Spatz, Jean-Jacques Grob, et al. 2010. "Diagnosis and Treatment of Melanoma: European Consensus-Based Interdisciplinary Guideline." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 46 (2): 270–83. doi:10.1016/j.ejca.2009.10.032.

Geyer, Stefan H., Ines E. Tinhofer, David B. Lumenta, Lars-Peter Kamolz, Ludwik Branski, Celeste C. Finnerty, David N. Herndon, and Wolfgang J. Weninger. 2015. "High-Resolution Episcopic Microscopy (HREM): A Useful Technique for Research in Wound Care." *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft* 197 (January): 3–10. doi:10.1016/j.aanat.2014.10.012.

Gibot, Laure, Todd Galbraith, Jacques Huot, and François A. Auger. 2013. "Development of a Tridimensional Microvascularized Human Skin Substitute to Study Melanoma Biology." *Clinical & Experimental Metastasis* 30 (1): 83–90. doi:10.1007/s10585-012-9511-3.

Godin, Biana, and Elka Touitou. 2007. "Transdermal Skin Delivery: Predictions for Humans from in Vivo, Ex Vivo and Animal Models." *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (11): 1152–61. doi:10.1016/j.addr.2007.07.004.

Gowda, Raghavendra, SubbaRao V. Madhunapantula, Omer F. Kuzu, Arati Sharma, and Gavin P. Robertson. 2014. "Targeting Multiple Key Signaling Pathways in Melanoma

Using Leelamine." *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (7): 1679–89. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0867.

Gray-Schopfer, Vanessa, Claudia Wellbrock, and Richard Marais. 2007. "Melanoma Biology and New Targeted Therapy." *Nature* 445 (7130): 851–57. doi:10.1038/nature05661.

Greenwald, D. P., L. J. Gottlieb, D. P. Mass, S. M. Shumway, and M. Temaner. 1992. "Full-Thickness Skin Wound Explants in Tissue Culture: A Mechanical Evaluation of Healing." *Plastic and Reconstructive Surgery* 90 (2): 289–94.

Gruber, Franz P., and Thomas Hartung. 2004. "Alternatives to Animal Experimentation in Basic Research." *ALTEX* 21 Suppl 1: 3–31.

## H

Haase, Ingo, Richard Evans, Ruth Pofahl, and Fiona M. Watt. 2003. "Regulation of Keratinocyte Shape, Migration and Wound Epithelialization by IGF-1- and EGF-Dependent Signalling Pathways." *Journal of Cell Science* 116 (15): 3227–38. doi:10.1242/jcs.00610.

Haass, Nikolas K., Katrin Sproesser, Thiennga K. Nguyen, Rooha Contractor, C. Angelica Medina, Katherine L. Nathanson, Meenhard Herlyn, and Keiran S. M. Smalley. 2008. "The Mitogen-Activated Protein/extracellular Signal-Regulated Kinase Kinase Inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) Induces Growth Arrest in Melanoma Cells and Tumor Regression When Combined with Docetaxel." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14 (1): 230–39. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1440.

Haq, Rizwan, Satoru Yokoyama, Elena B. Hawryluk, Göran B. Jönsson, Dennie Tompers Frederick, Kevin McHenry, Dale Porter, et al. 2013. "BCL2A1 Is a Lineage-Specific Antiapoptotic Melanoma Oncogene That Confers Resistance to BRAF Inhibition." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (11): 4321–26. doi:10.1073/pnas.1205575110.

Hatzivassiliou, Georgia, Kyung Song, Ivana Yen, Barbara J. Brandhuber, Daniel J. Anderson, Ryan Alvarado, Mary J. C. Ludlam, et al. 2010. "RAF Inhibitors Prime Wild-Type RAF to Activate the MAPK Pathway and Enhance Growth." *Nature* 464 (7287): 431–35. doi:10.1038/nature08833.

Hayflick, L., and P. S. Moorhead. 1961. "The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains." *Experimental Cell Research* 25 (December): 585–621.

Hayward, Nicholas K. 2003. "Genetics of Melanoma Predisposition." *Oncogene* 22 (20): 3053–62. doi:10.1038/sj.onc.1206445.

Helmlinger, G., P. A. Netti, H. C. Lichtenbeld, R. J. Melder, and R. K. Jain. 1997. "Solid Stress Inhibits the Growth of Multicellular Tumor Spheroids." *Nature Biotechnology* 15 (8): 778–83. doi:10.1038/nbt0897-778.



- Herlyn, D., D. Iliopoulos, P. J. Jensen, A. Parmiter, J. Baird, H. Hotta, K. Adachi, A. H. Ross, J. Jambrosic, and H. Koprowski. 1990. "In Vitro Properties of Human Melanoma Cells Metastatic in Nude Mice." *Cancer Research* 50 (8): 2296–2302.
- Herlyn, Meenhard, and Mizuho Fukunaga-Kalabis. 2010. "What Is a Good Model for Melanoma?" *The Journal of Investigative Dermatology* 130 (4): 911–12. doi:10.1038/jid.2009.441.
- Hesling, Cédric, Michel D'Incan, Chantal D'Incan, Pierre Souteyrand, Jean-Claude Monboisse, Sylvie Pasco, Jean-Claude Madelmont, and Yves Jean Bignon. 2004. "Downregulation of BRCA1 in A375 Melanoma Cell Line Increases Radio-Sensitivity and Modifies Metastatic and Angiogenic Gene Expression." *The Journal of Investigative Dermatology* 122 (2): 369–80. doi:10.1046/j.0022-202X.2004.22212.x.
- Hickman, John A., Ralph Graeser, Ronald de Hoogt, Suzana Vidic, Catarina Brito, Matthias Gutekunst, Heiko van der Kuip, and IMI PREDECT consortium. 2014. "Three-Dimensional Models of Cancer for Pharmacology and Cancer Cell Biology: Capturing Tumor Complexity in Vitro/ex Vivo." *Biotechnology Journal* 9 (9): 1115–28. doi:10.1002/biot.201300492.
- Hirschhaeuser, Franziska, Heike Menne, Claudia Dittfeld, Jonathan West, Wolfgang Mueller-Klieser, and Leoni A. Kunz-Schughart. 2010. "Multicellular Tumor Spheroids: An Underestimated Tool Is Catching up Again." *Journal of Biotechnology* 148 (1): 3–15. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.01.012.
- Hodi, F. Stephen, Steven J. O'Day, David F. McDermott, Robert W. Weber, Jeffrey A. Sosman, John B. Haanen, Rene Gonzalez, et al. 2010. "Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 363 (8): 711–23. doi:10.1056/NEJMoa1003466.
- Hodis, Eran, Ian R. Watson, Gregory V. Kryukov, Stefan T. Arold, Marcin Imielinski, Jean-Philippe Theurillat, Elizabeth Nickerson, et al. 2012. "A Landscape of Driver Mutations in Melanoma." *Cell* 150 (2): 251–63. doi:10.1016/j.cell.2012.06.024.
- Hoejberg, Lise, Lars Bastholt, and Henrik Schmidt. 2012. "Interleukin-6 and Melanoma." *Melanoma Research* 22 (5): 327–33. doi:10.1097/CMR.0b013e3283543d72.
- Hofmann, U. B., J. R. Westphal, E. T. Waas, A. J. Zendman, I. M. Cornelissen, D. J. Ruiter, and G. N. van Muijen. 1999. "Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma Cell Lines and Xenografts: Increased Expression of Activated Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) Correlates with Melanoma Progression." *British Journal of Cancer* 81 (5): 774–82. doi:10.1038/sj.bjc.6690763.
- Hooijkaas, Anna I., Jules Gadiot, Martin van der Valk, Wolter J. Mooi, and Christian U. Blank. 2012. "Targeting BRAFV600E in an Inducible Murine Model of Melanoma." *The American Journal of Pathology* 181 (3): 785–94. doi:10.1016/j.ajpath.2012.06.002.
- Horn, Susanne, Adina Figl, P. Sivaramakrishna Rachakonda, Christine Fischer, Antje Sucker, Andreas Gast, Stephanie Kadel, et al. 2013. "TERT Promoter Mutations in Familial and

Sporadic Melanoma.” *Science* (New York, N.Y.) 339 (6122): 959–61. doi:10.1126/science.1230062.

Hsu, Mei-Yu, Friedegund Meier, and Meenhard Herlyn. 2002. “Melanoma Development and Progression: A Conspiracy between Tumor and Host.” *Differentiation; Research in Biological Diversity* 70 (9-10): 522–36. doi:10.1046/j.1432-0436.2002.700906.x.

Huh, Sung Jin, Shile Liang, Arati Sharma, Cheng Dong, and Gavin P. Robertson. 2010. “Transiently Entrapped Circulating Tumor Cells Interact with Neutrophils to Facilitate Lung Metastasis Development.” *Cancer Research* 70 (14): 6071–82. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4442.

Hurtley, S., P. J. Hines, K. L. Mueller, and E. Culotta. 2014. “From Bench to Bedside.” *Science* 346 (6212): 932–33. doi:10.1126/science.346.6212.932.

Hu, Xing-Bin, Fan Feng, Yao-Chun Wang, Lin Wang, Fei He, Guo-Rui Dou, Liang Liang, Hong-Wei Zhang, Ying-Min Liang, and Hua Han. 2009. “Blockade of Notch Signaling in Tumor-Bearing Mice May Lead to Tumor Regression, Progression, or Metastasis, Depending on Tumor Cell Types.” *Neoplasia* (New York, N.Y.) 11 (1): 32–38.

Hylander, Bonnie L., Natalie Punt, Haikuo Tang, Joanna Hillman, Mary Vaughan, Wiam Bshara, Rose Pitoniak, and Elizabeth A. Repasky. 2013. “Origin of the Vasculature Supporting Growth of Primary Patient Tumor Xenografts.” *Journal of Translational Medicine* 11: 110. doi:10.1186/1479-5876-11-110.

Ivascu, Andrea, and Manfred Kubbies. 2007. “Diversity of Cell-Mediated Adhesions in Breast Cancer Spheroids.” *International Journal of Oncology* 31 (6): 1403–13.

## J

Jacobi, Ute, Marco Kaiser, Rani Toll, Susanne Mangelsdorf, Heike Audring, Nina Otberg, Wolfram Sterry, and Juergen Lademann. 2007. “Porcine Ear Skin: An in Vitro Model for Human Skin.” *Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)* 13 (1): 19–24. doi:10.1111/j.1600-0846.2006.00179.x.

Juhasz, I., S. M. Albelda, D. E. Elder, G. F. Murphy, K. Adachi, D. Herlyn, I. T. Valyi-Nagy, and M. Herlyn. 1993. “Growth and Invasion of Human Melanomas in Human Skin Grafted to Immunodeficient Mice.” *The American Journal of Pathology* 143 (2): 528–37.

## K

Kandárová, Helena, Patrick Hayden, Mitch Klausner, Joseph Kibilus, Paul Kearney, and John Sheasgreen. 2009. “In Vitro Skin Irritation Testing: Improving the Sensitivity of the



- EpiDerm Skin Irritation Test Protocol." *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA* 37 (6): 671–89.
- Katerinaki, E., G. S. Evans, P. C. Lorigan, and S. MacNeil. 2003. "TNF-Alpha Increases Human Melanoma Cell Invasion and Migration in Vitro: The Role of Proteolytic Enzymes." *British Journal of Cancer* 89 (6): 1123–29. doi:10.1038/sj.bjc.6601257.
- Khanna, Chand, and Kent Hunter. 2005. "Modeling Metastasis in Vivo." *Carcinogenesis* 26 (3): 513–23. doi:10.1093/carcin/bgh261.
- Kiowski, Gregor, Thomas Biedermann, Daniel S. Widmer, Gianluca Civenni, Charlotte Burger, Reinhard Dummer, Lukas Sommer, and Ernst Reichmann. 2012. "Engineering Melanoma Progression in a Humanized Environment in Vivo." *The Journal of Investigative Dermatology* 132 (1): 144–53. doi:10.1038/jid.2011.275.
- Kondo, Taisuke, and Vincent J Hearing. 2011. "Update on the Regulation of Mammalian Melanocyte Function and Skin Pigmentation." *Expert Review of Dermatology* 6 (1): 97–108. doi:10.1586/edm.10.70.
- König, Karsten, Marco Speicher, Rainer Bückle, Julia Reckfort, Gordon McKenzie, Julia Welzel, Martin J. Koehler, Peter Elsner, and Martin Kaatz. 2009. "Clinical Optical Coherence Tomography Combined with Multiphoton Tomography of Patients with Skin Diseases." *Journal of Biophotonics* 2 (6-7): 389–97. doi:10.1002/jbio.200910013.
- Koshy, Sandeep T., Thomas C. Ferrante, Sarah A. Lewin, and David J. Mooney. 2014. "Injectable, Porous, and Cell-Responsive Gelatin Cryogels." *Biomaterials* 35 (8): 2477–87. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.044.
- Kuzu, Omer F., Felix D. Nguyen, Mohammad A. Noory, and Arati Sharma. 2015. "Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research." *Cancer Growth and Metastasis* 8 (Suppl 1): 81–94. doi:10.4137/CGM.S21214.

## L

- Larson, Allison R., Chung-Wei Lee, Cecilia Lezcano, Qian Zhan, John Huang, Andrew H. Fischer, and George F. Murphy. 2014. "Melanoma Spheroid Formation Involves Laminin-Associated Vasculogenic Mimicry." *The American Journal of Pathology* 184 (1): 71–78. doi:10.1016/j.ajpath.2013.09.020.
- Larue, Lionel, and Friedrich Beermann. 2007. "Cutaneous Melanoma in Genetically Modified Animals." *Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 20 (6): 485–97. doi:10.1111/j.1600-0749.2007.00411.x.
- Laurent, Jennifer, Céline Frongia, Martine Cazales, Odile Mondesert, Bernard Ducommun, and Valérie Lobjois. 2013. "Multicellular Tumor Spheroid Models to Explore Cell Cycle Checkpoints in 3D." *BMC Cancer* 13: 73. doi:10.1186/1471-2407-13-73.

- Lebonvallet, Nicolas, Christine Jeanmaire, Louis Danoux, Pierre Sibille, Gilles Pauly, and Laurent Misery. 2010. "The Evolution and Use of Skin Explants: Potential and Limitations for Dermatological Research." *European Journal of Dermatology: EJD* 20 (6): 671–84. doi:10.1684/ejd.2010.1054.
- Lee, John T., Ling Li, Patricia A. Brafford, Marcia van den Eijnden, Molly B. Halloran, Katrin Sproesser, Nikolas K. Haass, et al. 2010. "PLX4032, a Potent Inhibitor of the B-Raf V600E Oncogene, Selectively Inhibits V600E-Positive Melanomas." *Pigment Cell & Melanoma Research* 23 (6): 820–27. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00763.x.
- Lee, Jung-hyun, Haein Park, Heesung Chung, Sojoong Choi, Younghwa Kim, Hyun Yoo, Tae-Yoon Kim, et al. 2009. "Syndecan-2 Regulates the Migratory Potential of Melanoma Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (40): 27167–75. doi:10.1074/jbc.M109.034678.
- Lee, Vivian, Gurtej Singh, John P. Trasatti, Chris Bjornsson, Xiawei Xu, Thanh Nga Tran, Seung-Schik Yoo, Guohao Dai, and Pankaj Karande. 2014. "Design and Fabrication of Human Skin by Three-Dimensional Bioprinting." *Tissue Engineering. Part C, Methods* 20 (6): 473–84. doi:10.1089/ten.tec.2013.0335.
- Le Gall-Ianotto, C., E. Andres, S. P. Hurtado, U. Pereira, and L. Misery. 2012. "Characterization of the First Coculture between Human Primary Keratinocytes and the Dorsal Root Ganglion-Derived Neuronal Cell Line F-11." *Neuroscience* 210 (May): 47–57. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.02.043.
- Lei, Tie Chi, Victoria M. Virador, Wilfred D. Vieira, and Vincent J. Hearing. 2002. "A Melanocyte-Keratinocyte Coculture Model to Assess Regulators of Pigmentation in Vitro." *Analytical Biochemistry* 305 (2): 260–68. doi:10.1006/abio.2002.5665.
- Li, Ling, Mizuho Fukunaga-Kalabis, and Meenhard Herlyn. 2011. "The Three-Dimensional Human Skin Reconstruct Model: A Tool to Study Normal Skin and Melanoma Progression." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 54 (August). doi:10.3791/2937.
- Lodhia, K. A., A. M. Hadley, P. Haluska, and C. L. Scott. 2015. "Prioritizing Therapeutic Targets Using Patient-Derived Xenograft Models." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1855 (2): 223–34. doi:10.1016/j.bbcan.2015.03.002.
- Lo, Jennifer A., and David E. Fisher. 2014. "The Melanoma Revolution: From UV Carcinogenesis to a New Era in Therapeutics." *Science (New York, N.Y.)* 346 (6212): 945–49. doi:10.1126/science.1253735.
- Lorenzo, Corinne, Céline Frongia, Raphaël Jorand, Jérôme Fehrenbach, Pierre Weiss, Amina Maandhui, Guillaume Gay, Bernard Ducommun, and Valérie Lobjois. 2011. "Live Cell Division Dynamics Monitoring in 3D Large Spheroid Tumor Models Using Light Sheet Microscopy." *Cell Division* 6: 22. doi:10.1186/1747-1028-6-22.

# M

- Malaney, Prerna, Santo V. Nicosia, and Vrushank Davé. 2014. "One Mouse, One Patient Paradigm: New Avatars of Personalized Cancer Therapy." *Cancer Letters* 344 (1): 1–12. doi:10.1016/j.canlet.2013.10.010.
- Marques, Claudia Mirian de Godoy, and Sheila MacNeil. 2016. "Use of a Tissue Engineered Human Skin Model to Investigate the Effects of Wounding and of an Anti-Inflammatory on Melanoma Cell Invasion." *PLoS ONE* 11 (6). doi:10.1371/journal.pone.0156931.
- Mathes, Stephanie H., Heinz Ruffner, and Ursula Graf-Hausner. 2014. "The Use of Skin Models in Drug Development." *Advanced Drug Delivery Reviews* 69-70 (April): 81–102. doi:10.1016/j.addr.2013.12.006.
- McKinney, Andrea J., and Sheri L. Holmen. 2011. "Animal Models of Melanoma: A Somatic Cell Gene Delivery Mouse Model Allows Rapid Evaluation of Genes Implicated in Human Melanoma." *Chinese Journal of Cancer* 30 (3): 153–62.
- Meier, F., S. Busch, K. Lasithiotakis, D. Kulms, C. Garbe, E. Maczey, M. Herlyn, and B. Schitteck. 2007. "Combined Targeting of MAPK and AKT Signalling Pathways Is a Promising Strategy for Melanoma Treatment." *The British Journal of Dermatology* 156 (6): 1204–13. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.07821.x.
- Meier, F., M. Nesbit, M. Y. Hsu, B. Martin, P. Van Belle, D. E. Elder, G. Schaumburg-Lever, et al. 2000. "Human Melanoma Progression in Skin Reconstructs : Biological Significance of bFGF." *The American Journal of Pathology* 156 (1): 193–200. doi:10.1016/S0002-9440(10)64719-0.
- Mélissopoulos, Alexandre, and Christine Levacher. 1998. *La peau: structure et physiologie*. Tec & Doc Lavoisier.
- Melnikova, Vladislava O., Svetlana V. Bolshakov, Christopher Walker, and Honnavara N. Ananthaswamy. 2004. "Genomic Alterations in Spontaneous and Carcinogen-Induced Murine Melanoma Cell Lines." *Oncogene* 23 (13): 2347–56. doi:10.1038/sj.onc.1207405.
- Merlino, Glenn, Keith Flaherty, Nicolas Acquavella Pesantes, Andrew Aplin, Sheri Holmen, Terry Van Dyke, and Meenhard Herlyn. 2013. "The Future of Preclinical Mouse Models in Melanoma Treatment Is Now." *Pigment Cell & Melanoma Research* 26 (4): E8–14. doi:10.1111/pcmr.12099.
- Middleton, M. R., J. J. Grob, N. Aaronson, G. Fierlbeck, W. Tilgen, S. Seiter, M. Gore, et al. 2000. "Randomized Phase III Study of Temozolomide versus Dacarbazine in the Treatment of Patients with Advanced Metastatic Malignant Melanoma." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 18 (1): 158–66.

- Miller, Arlo J., and Martin C. Jr. Mihm. 2006. "Melanoma." *New England Journal of Medicine* 355 (1): 51–65. doi:10.1056/NEJMra052166.
- Mo, Jing, Baocun Sun, Xiulan Zhao, Qiang Gu, Xueyi Dong, Zhiyong Liu, Yuemei Ma, et al. 2013. "Hypoxia-Induced Senescence Contributes to the Regulation of Microenvironment in Melanomas." *Pathology, Research and Practice* 209 (10): 640–47. doi:10.1016/j.prp.2013.07.004.
- Moreno, Lucas, and Andrew D. J. Pearson. 2013. "How Can Attrition Rates Be Reduced in Cancer Drug Discovery?" *Expert Opinion on Drug Discovery* 8 (4): 363–68. doi:10.1517/17460441.2013.768984.
- Mujaj, Sally, Kerry Manton, Zee Upton, and Sean Richards. 2010. "Serum-Free Primary Human Fibroblast and Keratinocyte Coculture." *Tissue Engineering. Part A* 16 (4): 1407–20. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0251.
- Murphy, G., and T. Crabbe. 1995. "Gelatinases A and B." *Methods in Enzymology* 248: 470–84.

## N

- Nazarian, Ramin, Hubing Shi, Qi Wang, Xiangju Kong, Richard C. Koya, Hane Lee, Zugen Chen, et al. 2010. "Melanomas Acquire Resistance to B-RAF(V600E) Inhibition by RTK or N-RAS Upregulation." *Nature* 468 (7326): 973–77. doi:10.1038/nature09626.
- Newton-Bishop, Julia A., Yu-Mei Chang, Faye Elliott, May Chan, Susan Leake, Birute Karpavicius, Sue Haynes, et al. 2011. "Relationship between Sun Exposure and Melanoma Risk for Tumours in Different Body Sites in a Large Case-Control Study in a Temperate Climate." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 47 (5): 732–41. doi:10.1016/j.ejca.2010.10.008.
- Noonan, F. P., J. A. Recio, H. Takayama, P. Duray, M. R. Anver, W. L. Rush, E. C. De Fabo, and G. Merlino. 2001. "Neonatal Sunburn and Melanoma in Mice." *Nature* 413 (6853): 271–72. doi:10.1038/35095108.
- Norsgaard, Hanne, Sandrine Kurdykowski, Pascal Descargues, Tatiana Gonzalez, Troels Marstrand, Georg Dünstl, and Mads Røpke. 2014. "Calcipotriol Counteracts Betamethasone-Induced Decrease in Extracellular Matrix Components Related to Skin Atrophy." *Archives of Dermatological Research* 306 (8): 719–29. doi:10.1007/s00403-014-1485-3.
- Nyormoi, O., L. Mills, and M. Bar-Eli. 2003. "An MMP-2/MMP-9 Inhibitor, 5a, Enhances Apoptosis Induced by Ligands of the TNF Receptor Superfamily in Cancer Cells." *Cell Death and Differentiation* 10 (5): 558–69. doi:10.1038/sj.cdd.4401209.

## O

- O'Connell, Michael P., Katie Marchbank, Marie R. Webster, Alexander A. Valiga, Amanpreet Kaur, Adina Vultur, Ling Li, et al. 2013. "Hypoxia Induces Phenotypic Plasticity and Therapy Resistance in Melanoma via the Tyrosine Kinase Receptors ROR1 and ROR2." *Cancer Discovery* 3 (12): 1378–93. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0005.
- O'Grady, A., C. Dunne, P. O'Kelly, G. M. Murphy, M. Leader, and E. Kay. 2007. "Differential Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in Non-Melanoma Skin Cancer: Implications for Tumour Progression." *Histopathology* 51 (6): 793–804. doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02885.x.
- Oh, Ji Won, Tsai-Ching Hsi, Christian Fernando Guerrero-Juarez, Raul Ramos, and Maksim V. Plikus. 2013. "Organotypic Skin Culture." *The Journal of Investigative Dermatology* 133 (11): e14. doi:10.1038/jid.2013.387.
- Oliveria, S. A., M. Saraiya, A. C. Geller, M. K. Heneghan, and C. Jorgensen. 2006. "Sun Exposure and Risk of Melanoma." *Archives of Disease in Childhood* 91 (2): 131–38. doi:10.1136/adc.2005.086918.

## P

- Palmieri, Giuseppe, Mariaelena Capone, Maria Libera Ascierto, Giusy Gentilcore, David F. Stroncek, Milena Casula, Maria Cristina Sini, Marco Palla, Nicola Mozzillo, and Paolo A. Ascierto. 2009. "Main Roads to Melanoma." *Journal of Translational Medicine* 7: 86. doi:10.1186/1479-5876-7-86.
- Pampaloni, Francesco, Emmanuel G. Reynaud, and Ernst H. K. Stelzer. 2007. "The Third Dimension Bridges the Gap between Cell Culture and Live Tissue." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (10): 839–45. doi:10.1038/nrm2236.
- Paraiso, Kim H. T., Yun Xiang, Vito W. Rebecca, Ethan V. Abel, Y. Ann Chen, A. Cecilia Munko, Elizabeth Wood, et al. 2011. "PTEN Loss Confers BRAF Inhibitor Resistance to Melanoma Cells through the Suppression of BIM Expression." *Cancer Research* 71 (7): 2750–60. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2954.
- Patton, E. Elizabeth, David L. Mitchell, and Rodney S. Nairn. 2010. "Genetic and Environmental Melanoma Models in Fish." *Pigment Cell & Melanoma Research* 23 (3): 314–37. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00693.x.
- Patton, E. Elizabeth, Hans R. Widlund, Jeffery L. Kutok, Kamden R. Kopani, James F. Amatruda, Ryan D. Murphey, Stephane Berghmans, et al. 2005. "BRAF Mutations Are Sufficient to Promote Nevi Formation and Cooperate with p53 in the Genesis of Melanoma." *Current Biology: CB* 15 (3): 249–54. doi:10.1016/j.cub.2005.01.031.

- Paul, Steven M., Daniel S. Mytelka, Christopher T. Dunwiddie, Charles C. Persinger, Bernard H. Munos, Stacy R. Lindborg, and Aaron L. Schacht. 2010. "How to Improve R&D Productivity: The Pharmaceutical Industry's Grand Challenge." *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (3): 203–14. doi:10.1038/nrd3078.
- Phadke, Manali S., Patrizia Sini, and Keiran S. M. Smalley. 2015. "The Novel ATP-Competitive MEK/Aurora Kinase Inhibitor BI-847325 Overcomes Acquired BRAF Inhibitor Resistance through Suppression of Mcl-1 and MEK Expression." *Molecular Cancer Therapeutics* 14 (6): 1354–64. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0832.
- Posch, Christian, Brian D. Cholewa, Igor Vujic, Martina Sanlorenzo, Jeffrey Ma, Sarasa T. Kim, Sonja Kleffel, et al. 2015. "Combined Inhibition of MEK and Plk1 Has Synergistic Antitumor Activity in NRAS Mutant Melanoma." *The Journal of Investigative Dermatology* 135 (10): 2475–83. doi:10.1038/jid.2015.198.
- Poulikakos, Poulikos I., Chao Zhang, Gideon Bollag, Kevan M. Shokat, and Neal Rosen. 2010. "RAF Inhibitors Transactivate RAF Dimers and ERK Signalling in Cells with Wild-Type BRAF." *Nature* 464 (7287): 427–30. doi:10.1038/nature08902.
- Poynter, Jenny N., James T. Elder, Douglas R. Fullen, Rajan P. Nair, Maria S. Soengas, Timothy M. Johnson, Bruce Redman, Nancy E. Thomas, and Stephen B. Gruber. 2006. "BRAF and NRAS Mutations in Melanoma and Melanocytic Nevi." *Melanoma Research* 16 (4): 267–73. doi:10.1097/01.cmr.0000222600.73179.f3.
- Prost-Squarcioni, Catherine. 2005. "Histologie de La Peau et Des Follicules Pileux." *Médecine/Sciences* 22: 131–37.
- Prunieras, M. 1979. "Recent Advances in Epidermal Cell Cultures." *Archives of Dermatological Research* 264 (2): 243–47.

## R

- Recio, Juan A., Frances P. Noonan, Hisashi Takayama, Miriam R. Anver, Paul Duray, Walter L. Rush, Gerd Lindner, Edward C. De Fabo, Ronald A. DePinho, and Glenn Merlino. 2002. "Ink4a/arf Deficiency Promotes Ultraviolet Radiation-Induced Melanomagenesis." *Cancer Research* 62 (22): 6724–30.
- Redondo, P., P. Lloret, M. Idoate, and S. Inoges. 2005. "Expression and Serum Levels of MMP-2 and MMP-9 during Human Melanoma Progression." *Clinical and Experimental Dermatology* 30 (5): 541–45. doi:10.1111/j.1365-2230.2005.01849.x.
- Renier, Nicolas, Zhuhao Wu, David J. Simon, Jing Yang, Pablo Ariel, and Marc Tessier-Lavigne. 2014. "iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging." *Cell* 159 (4): 896–910. doi:10.1016/j.cell.2014.10.010.
- Reya, Tannishtha, and Hans Clevers. 2005. "Wnt Signalling in Stem Cells and Cancer." *Nature* 434 (7035): 843–50. doi:10.1038/nature03319.



- Rheinwald, J. G., and H. Green. 1975. "Serial Cultivation of Strains of Human Epidermal Keratinocytes: The Formation of Keratinizing Colonies from Single Cells." *Cell* 6 (3): 331–43.
- Robert, Caroline, Boguslawa Karaszewska, Jacob Schachter, Piotr Rutkowski, Andrzej Mackiewicz, Daniil Stroiakovski, Michael Lichinitser, et al. 2015. "Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib." *New England Journal of Medicine* 372 (1): 30–39. doi:10.1056/NEJMoa1412690.
- Roberts, M. E., and K. R. Mueller. 1990. "Comparisons of in Vitro Nitroglycerin (TNG) Flux across Yucatan Pig, Hairless Mouse, and Human Skins." *Pharmaceutical Research* 7 (6): 673–76.
- Roesch, Alexander. 2015. "Melanoma Stem Cells." *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG* 13 (2): 118–24. doi:10.1111/ddg.12584.
- Rozenberg, Gabriela I., Kimberly B. Monahan, Chad Torrice, James E. Bear, and Norman E. Sharpless. 2010. "Metastasis in an Orthotopic Murine Model of Melanoma Is Independent of RAS/RAF Mutation." *Melanoma Research* 20 (5): 361–71. doi:10.1097/CMR.0b013e328336ee17.

## S

- Sakolish, Courtney M., Mandy B. Esch, James J. Hickman, Michael L. Shuler, and Gretchen J. Mahler. 2016. "Modeling Barrier Tissues In Vitro: Methods, Achievements, and Challenges." *EBioMedicine* 5 (February): 30–39. doi:10.1016/j.ebiom.2016.02.023.
- Salic, Adrian, and Timothy J. Mitchison. 2008. "A Chemical Method for Fast and Sensitive Detection of DNA Synthesis in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (7): 2415–20. doi:10.1073/pnas.0712168105.
- Sanquer, Sylvia, Bernard Coulomb, Corinne Lebreton, and Louis Dubertret. 1990. "Human Dermal Fibroblasts Modulates the Effects of Retinoids on Epidermal Growth." *Journal of Investigative Dermatology* 95 (6): 700–704. doi:10.1111/1523-1747.ep12514500.
- Schäfer-Korting, Monika, Udo Bock, Walter Diembeck, Hans-Jürgen Düsing, Armin Gamer, Eleonore Haltner-Ukomadu, Christine Hoffmann, et al. 2008. "The Use of Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation Study." *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA* 36 (2): 161–87.
- Schepeler, Troels, Mahalia E. Page, and Kim B. Jensen. 2014. "Heterogeneity and Plasticity of Epidermal Stem Cells." *Development (Cambridge, England)* 141 (13): 2559–67. doi:10.1242/dev.104588.
- Schreiber, S., A. Mahmoud, A. Vuia, M. K. Rübbelke, E. Schmidt, M. Schaller, H. Kandárová, et al. 2005. "Reconstructed Epidermis versus Human and Animal Skin in Skin



- Absorption Studies.” *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 19 (6): 813–22. doi:10.1016/j.tiv.2005.04.004.
- Seneschal, Julien, Rachael A. Clark, Ahmed Gehad, Clare M. Baecher-Allan, and Thomas S. Kupper. 2012. “Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells.” *Immunity* 36 (5): 873–84. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.018.
- Shah, Darshil J., and Roxana S. Dronca. 2014. “Latest Advances in Chemotherapeutic, Targeted, and Immune Approaches in the Treatment of Metastatic Melanoma.” *Mayo Clinic Proceedings* 89 (4): 504–19. doi:10.1016/j.mayocp.2014.02.002.
- Shain, A. Hunter, and Boris C. Bastian. 2016. “From Melanocytes to Melanomas.” *Nature Reviews Cancer* 16 (6): 345–58. doi:10.1038/nrc.2016.37.
- Sharma, Arati, and Gavin P. Robertson. 2007. “Models of Melanoma Metastasis: Using a Transient siRNA-Based Protein Inhibition Strategy in Mice to Validate the Functional Relevance of Pharmacological Agents.” In *Current Protocols in Pharmacology*, edited by S.J. Enna, Michael Williams, John F. Barret, John W. Ferkany, Terry Kenakin, and Roger D. Porsolt. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.wiley.com/10.1002/0471141755.ph1406s38>.
- Sharma, Arati, Arun K. Sharma, Subbarao V. Madhunapantula, Dhimant Desai, Sung Jin Huh, Paul Mosca, Shantu Amin, and Gavin P. Robertson. 2009. “Targeting Akt3 Signaling in Malignant Melanoma Using Isoselenocyanates.” *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (5): 1674–85. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2214.
- Sharma, Arati, Nishit R. Trivedi, Melissa A. Zimmerman, David A. Tuveson, Charles D. Smith, and Gavin P. Robertson. 2005. “Mutant V599EB-Raf Regulates Growth and Vascular Development of Malignant Melanoma Tumors.” *Cancer Research* 65 (6): 2412–21. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2423.
- Shtivelman, Emma, Michael Q. A. Davies, Patrick Hwu, James Yang, Michal Lotem, Moshe Oren, Keith T. Flaherty, and David E. Fisher. 2014. “Pathways and Therapeutic Targets in Melanoma.” *Oncotarget* 5 (7): 1701–52. doi:10.18632/oncotarget.1892.
- Silver, F. H., J. W. Freeman, and D. DeVore. 2001. “Viscoelastic Properties of Human Skin and Processed Dermis.” *Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)* 7 (1): 18–23.
- Singh, S. P., M. P. Schwartz, E. Y. Tokuda, Y. Luo, R. E. Rogers, M. Fujita, N. G. Ahn, and K. S. Anseth. 2015. “A Synthetic Modular Approach for Modeling the Role of the 3D Microenvironment in Tumor Progression.” *Scientific Reports* 5: 17814. doi:10.1038/srep17814.
- Sirenko, Oksana, Trisha Mitlo, Jayne Hesley, Steve Luke, Windsor Owens, and Evan F. Cromwell. 2015. “High-Content Assays for Characterizing the Viability and Morphology

- of 3D Cancer Spheroid Cultures.” *Assay and Drug Development Technologies* 13 (7): 402–14. doi:10.1089/adt.2015.655.
- Smalley, Keiran S. M., Nikolas K. Haass, Patricia A. Brafford, Mercedes Lioni, Keith T. Flaherty, and Meenhard Herlyn. 2006. “Multiple Signaling Pathways Must Be Targeted to Overcome Drug Resistance in Cell Lines Derived from Melanoma Metastases.” *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (5): 1136–44. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0084.
- Stahl, A., and B. M. Mueller. 1994. “Binding of Urokinase to Its Receptor Promotes Migration and Invasion of Human Melanoma Cells in Vitro.” *Cancer Research* 54 (11): 3066–71.
- Stevens, Kelly R., Nicole J. Einerson, Jeanine A. Burmania, and Weiyuan John Kao. 2002. “In Vivo Biocompatibility of Gelatin-Based Hydrogels and Interpenetrating Networks.” *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition* 13 (12): 1353–66.
- Su, David M., Qiuyang Zhang, Xuexi Wang, Ping He, Yuelin Jack Zhu, Jianxiong Zhao, Owen M. Rennert, and Yan A. Su. 2009. “Two Types of Human Malignant Melanoma Cell Lines Revealed by Expression Patterns of Mitochondrial and Survival-Apoptosis Genes: Implications for Malignant Melanoma Therapy.” *American Association for Cancer Research* 8 (5): 1292–1304. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-1030.
- Svedman, Fernanda Costa, Demetris Pillas, Alik Taylor, Moninder Kaur, Ragnar Linder, and Johan Hansson. 2016. “Stage-Specific Survival and Recurrence in Patients with Cutaneous Malignant Melanoma in Europe – a Systematic Review of the Literature.” *Clinical Epidemiology* 8 (May): 109–22. doi:10.2147/CLEP.S99021.
- T**
- Thoma, Claudio R., Miriam Zimmermann, Irina Agarkova, Jens M. Kelm, and Wilhelm Krek. 2014. “3D Cell Culture Systems Modeling Tumor Growth Determinants in Cancer Target Discovery.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 69-70 (April): 29–41. doi:10.1016/j.addr.2014.03.001.
- Tokuda, Emi Y., Jennifer L. Leight, and Kristi S. Anseth. 2014. “Modulation of Matrix Elasticity with PEG Hydrogels to Study Melanoma Drug Responsiveness.” *Biomaterials* 35 (14): 4310–18. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.063.
- Tornier, Carine, Carole Amsellem, Anne de Brugerolle de Fraissinette, and Nathalie Alépée. 2010. “Assessment of the Optimized SkinEthic Reconstructed Human Epidermis (RHE) 42 Bis Skin Irritation Protocol over 39 Test Substances.” *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 24 (1): 245–56. doi:10.1016/j.tiv.2009.08.023.
- Toth, M., and R. Fridman. 2001. “Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9 by Gelatin Zymography.” *Methods in Molecular Medicine* 57: 163–74. doi:10.1385/1-59259-136-1:163.

- Tsai, James, John T. Lee, Weiru Wang, Jiazhong Zhang, Hanna Cho, Shumeye Mamo, Ryan Bremer, et al. 2008. "Discovery of a Selective Inhibitor of Oncogenic B-Raf Kinase with Potent Antimelanoma Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (8): 3041–46. doi:10.1073/pnas.0711741105.
- Tsao, Hensin, Michael B. Atkins, and Arthur J. Sober. 2004. "Management of Cutaneous Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 351 (10): 998–1012. doi:10.1056/NEJMra041245.
- Tsuji, Tsutomu, Yoko Kawada, Mieko Kai-Murozono, Shinya Komatsu, Seon Ae Han, Ken-ichi Takeuchi, Hiroto Mizushima, Kaoru Miyazaki, and Tatsuro Irimura. 2002. "Regulation of Melanoma Cell Migration and Invasion by Laminin-5 and alpha3beta1 Integrin (VLA-3)." *Clinical & Experimental Metastasis* 19 (2): 127–34.
- Tsuruta, Daisuke, Takashi Hashimoto, Kevin J. Hamill, and Jonathan C. R. Jones. 2011. "Hemidesmosomes and Focal Contact Proteins: Functions and Cross-Talk in Keratinocytes, Bullous Diseases and Wound Healing." *Journal of Dermatological Science* 62 (1): 1–7. doi:10.1016/j.jdermsci.2011.01.005.

## V

- Van Gele, Mireille, Barbara Geusens, Lieve Brochez, Reinhart Speeckaert, and Jo Lambert. 2011. "Three-Dimensional Skin Models as Tools for Transdermal Drug Delivery: Challenges and Limitations." *Expert Opinion on Drug Delivery* 8 (6): 705–20. doi:10.1517/17425247.2011.568937.
- Van Smeden, Jeroen, and Joke A. Bouwstra. 2016. "Stratum Corneum Lipids: Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients." *Current Problems in Dermatology* 49: 8–26. doi:10.1159/000441540.
- Vapniarsky, Natalia, Boaz Arzi, Jerry C. Hu, Jan A. Nolte, and Kyriacos A. Athanasiou. 2015. "Concise Review: Human Dermis as an Autologous Source of Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine." *Stem Cells Translational Medicine* 4 (10): 1187–98. doi:10.5966/sctm.2015-0084.
- Verhaegen, Pauline D., Hennie J. Schouten, Wikky Tigchelaar-Gutter, Jan van Marle, Cornelis J. van Noorden, Esther Middelkoop, and Paul P. van Zuijlen. 2012. "Adaptation of the Dermal Collagen Structure of Human Skin and Scar Tissue in Response to Stretch: An Experimental Study." *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 20 (5): 658–66. doi:10.1111/j.1524-475X.2012.00827.x.
- Vinci, Maria, Sharon Gowan, Frances Boxall, Lisa Patterson, Miriam Zimmermann, William Court, Cara Lomas, Marta Mendiola, David Hardisson, and Suzanne A. Eccles. 2012. "Advances in Establishment and Analysis of Three-Dimensional Tumor Spheroid-Based Functional Assays for Target Validation and Drug Evaluation." *BMC Biology* 10: 29. doi:10.1186/1741-7007-10-29.

- Vörsmann, H., F. Groeber, H. Walles, S. Busch, S. Beissert, H. Walczak, and D. Kulms. 2013. "Development of a Human Three-Dimensional Organotypic Skin-Melanoma Spheroid Model for in Vitro Drug Testing." *Cell Death & Disease* 4: e719. doi:10.1038/cddis.2013.249.
- Vredeveld, Liesbeth C. W., Patricia A. Possik, Marjon A. Smit, Katrin Meissl, Chrysiis Michaloglou, Hugo M. Horlings, Abderrahim Ajouaou, et al. 2012. "Abrogation of BRAFV600E-Induced Senescence by PI3K Pathway Activation Contributes to Melanomagenesis." *Genes & Development* 26 (10): 1055–69. doi:10.1101/gad.187252.112.
- W**
- Wang, Yuhua, Zhenghong Xu, Shutao Guo, Lu Zhang, Arati Sharma, Gavin P. Robertson, and Leaf Huang. 2013. "Intravenous Delivery of siRNA Targeting CD47 Effectively Inhibits Melanoma Tumor Growth and Lung Metastasis." *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 21 (10): 1919–29. doi:10.1038/mt.2013.135.
- Wang, Zhenxiang, Ying Wang, Farhang Farhangfar, Monica Zimmer, and Yongxin Zhang. 2012. "Enhanced Keratinocyte Proliferation and Migration in Co-Culture with Fibroblasts." *PLoS ONE* 7 (7). doi:10.1371/journal.pone.0040951.
- Waring, Michael J., John Arrowsmith, Andrew R. Leach, Paul D. Leeson, Sam Mandrell, Robert M. Owen, Garry Pairaudeau, et al. 2015. "An Analysis of the Attrition of Drug Candidates from Four Major Pharmaceutical Companies." *Nature Reviews Drug Discovery* 14 (7): 475–86. doi:10.1038/nrd4609.
- Willmann, Jürgen K., Nicholas van Bruggen, Ludger M. Dinkelborg, and Sanjiv S. Gambhir. 2008. "Molecular Imaging in Drug Development." *Nature Reviews. Drug Discovery* 7 (7): 591–607. doi:10.1038/nrd2290.
- Yu, Yongmao, Alka Arora, Weixian Min, Chaim M. Roifman, and Eyal Grunebaum. 2009. "EdU Incorporation Is an Alternative Non-Radioactive Assay to [(3)H]thymidine Uptake for in Vitro Measurement of Mice T-Cell Proliferations." *Journal of Immunological Methods* 350 (1-2): 29–35. doi:10.1016/j.jim.2009.07.008.
- Zimmerman, Amanda, Ling Bai, and David D. Ginty. 2014. "The Gentle Touch Receptors of Mammalian Skin." *Science (New York, N.Y.)* 346 (6212): 950–54. doi:10.1126/science.1254229.



# ANNEXES

## Annexe 1 : Brevet

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2016/128135 A1**

(43) Date de la publication internationale  
18 août 2016 (18.08.2016)

(51) Classification internationale des brevets :  
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/09 (2010.01)

(74) Mandataire : BARDOT, Willy; SIMODORO-IP, 1 Place  
des pêcheurs, 13100 Aix-en-Provence (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/EP2016/000223

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,  
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,  
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,  
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,  
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,  
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :  
10 février 2016 (10.02.2016)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
1500262 10 février 2015 (10.02.2015) FR

(71) Déposants : GENOSKIN [FR/FR]; Centre Pierre Potier,  
1, Place Pierre Potier, 31000 Toulouse (FR). CENTRE  
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
(CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, 75016 Paris (FR).  
UNIVERSITE TOULOUSE III - PAUL SABATIER  
[FR/FR]; 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex  
9 (FR). CHU DE TOULOUSE [FR/FR]; 2, rue Viguierie -  
TSA 80035, 31059 Toulouse Cedex 9 (FR).

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,  
TZ, UG, ZM, ZW), eurasiens (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,  
TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,  
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,  
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs : JARDET, Claire; 9 rue Françoise Giroud,  
appt A101, 31300 Toulouse (FR). DESCARGUES, Pas-  
cal; 30 avenue Joseph Le Brix, 31500 Toulouse (FR).  
LOBJOIS, Valérie; 96 impasse du Pigeonnier, 32600 Pu-  
jaudran (FR). DUCOMMUN, Bernard; 1 chemin du Pa-  
radis, 31450 Belderaud (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))



WO 2016/128135 A1

(54) Title : METHOD FOR IMPLANTING CELL CLUMPS IN A SKIN EXPLANT

(54) Titre : PROCÉDE D'IMPLANTATION D'AMAS CELLULAIRES DANS UN EXPLANT DE PEAU

(57) Abstract : The subject matter of the present invention is an *in vitro* method for implanting cell clumps in a skin explant, said method comprising a step c) of implanting, within said skin explant, at least one cell clump preferably coated with a biologically degradable matrix. The present invention also relates to the skin explants that can be obtained by means of the method according to the invention and to the uses thereof.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un procédé *in vitro* pour implanter des amas cellulaires dans un explant de peau, le-dit procédé comprenant une étape c) d'implantation, au sein dudit explant de peau, d'au moins un amas cellulaire enrobé de préférence d'une matrice biologiquement dégradable. La présente invention porte également sur les explants de peau susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'invention et sur ses utilisations.



WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

**PROCEDE D'IMPLANTATION D'AMAS CELLULAIRES DANS UN EXPLANT DE PEAU**

Cette demande de brevet revendique la priorité de la demande de brevet français n°15/00262 déposée le 10 février 2015, qui est incorporée ici par référence.

**DOMAINE DE L'INVENTION**

- 5 La présente invention concerne un explant de peau contenant au moins un amas cellulaire, son procédé d'obtention et un kit de mise en œuvre de ce procédé, ainsi que ses utilisations pour l'identification de composés présentant un effet anti-cancéreux ou pour l'obtention d'échantillons pileux.

**ART ANTERIEUR**

- 10 Les cellules cultivées en monocouche (2D) acquièrent un phénotype fondamentalement différent de celui des mêmes cellules *in vivo*. Ce phénomène provient d'une altération d'au moins une des fonctions liées à la prolifération, à la différenciation, à la survie, à l'architecture cellulaire ou encore à la migration cellulaire. Ces modifications induisent chez des cellules cultivées en 2D une sensibilité aux
- 15 composés thérapeutiques distincte de celle observée chez les mêmes cellules *in vivo*, rendant ainsi l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques particulièrement complexe et incertaine.

- Pour pallier cet inconvénient, des modèles de culture cellulaire tridimensionnelle (3D) ont été mis au point dans le but de se rapprocher au plus près des conditions
- 20 physiologiques rencontrées par les cellules dans l'organisme. Les méthodes 3D actuellement utilisées dérivent principalement de la technique de la goutte suspendue (Foti R, 2011, A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroid, J Vis Exp, 51 : pii 2720), dans laquelle la gravité entraîne une agrégation spontanée des cellules sur le ménisque de la goutte de milieu de culture qui les
- 25 contient. D'autres techniques bien connues de l'Homme du métier consistent soit à mélanger une suspension cellulaire avec une matrice extracellulaire capable de se

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

2

solidifier, soit à ensemercer une matrice de polymère avec un mélange cellule/matrice extracellulaire (Lee et al, 2007, Three-dimensional culture model of normal and malignant breast epithelial cells, Nat Methods, 4 : 359-365/Fischbach et al, 2007 Engineering tumors with 3D scaffolds, Nat Methods, 4 : 855-860). En dépit d'une  
5 relative hétérogénéité cellulaire qui résulte de la formation aléatoire de sphéroïdes, ces modèles sont couramment utilisés en cancérologie pour l'identification de composés d'intérêt thérapeutique. Toutefois, de tels modèles ne tiennent pas compte de l'environnement tissulaire existant, particulièrement pertinent dans le cadre de l'étude de cancers de la peau.

- 10 En 2013, un modèle 3D de mélanome métastatique a été mis au point sur une peau artificielle. Des sphéroïdes de la lignée cancéreuse 451-Lu ont été ajoutés à une co-culture de kératinocytes/fibroblastes insérés dans une matrice de collagène de type I. Après 31 jours de culture, l'exposition de ce modèle de culture à des agents anti-cancéreux montre une réponse des cellules 451-Lu différentes de celle observée pour  
15 ces mêmes cellules dans un modèle de culture 2D. Néanmoins, l'auteur souligne l'absence des cellules du système immunitaire, des cellules endothéliales et d'autres types cellulaires normalement présentes dans le microenvironnement du mélanome *in vivo* (Vörsmann et al, 2013, Development of a human 3D organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing, Cell Death and Disease, 4, e719).
- 20 Il existe par conséquent un réel besoin de mettre au point un modèle plus proche de la peau naturelle.

Toutefois, la manipulation des sphéroïdes s'avère délicate pour les raisons suivantes :

- lors de l'injection d'une solution contenant un ou plusieurs sphéroïdes dans le derme de la peau à l'aide d'une seringue et d'une aiguille, ces derniers  
25 peuvent rester coincés dans l'aiguille sans être entraînés par la solution injectée. Une alternative à cela est d'utiliser des systèmes d'injection à déplacement positif où un piston pousse la solution lors de l'injection. La limite de ce système réside toutefois dans le risque d'altérer la structure de ces sphéroïdes, altérant ainsi les cellules qui le composent,

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

3

- lors de l'injection de solution, le derme étant élastique, il gonfle sous la pression de la solution injectée avant de se rétracter et ainsi créer un reflux de la solution, lequel peut entraîner le/les sphéroïde(s) hors du derme,
- lorsqu'on injecte une solution contenant un/des sphéroïdes dans le derme de la peau, il est difficile de contrôler, sous l'effet de la pression exercée par la seringue, la dispersion du/des sphéroïdes,
- lorsqu'on injecte une solution contenant des sphéroïdes dans le derme de la peau, il est nécessaire de mettre en œuvre un volume conséquent pour entraîner les sphéroïdes hors de l'aiguille. Ceci peut provoquer une dilatation excessive du derme pouvant entraîner une réponse inflammatoire ou bien la rupture de la structure de la peau,
- dans le cas de l'injection de sphéroïdes en solution, il est relativement difficile de les aspirer dans l'aiguille et de les y garder sans qu'ils sédimentent d'un côté ou de l'autre de l'aiguille, rendant leur dispersion incontrôlable.

De manière surprenante, les inventeurs ont mis au point un procédé *in vitro* qui permet de pallier tous ces inconvénients. L'enrobage du sphéroïde dans une matrice biologiquement dégradable permet tout à la fois :

- de maintenir l'intégrité structurale du sphéroïde et de l'explant de peau qui l'accueille,
  - de réduire le volume à injecter dans le derme de la peau,
  - de contrôler le nombre de sphéroïdes injectés,
  - de contrôler la dispersion/répartition des sphéroïdes au sein du derme,
  - de visualiser précisément le site d'implantation du/des sphéroïdes.
- Un tel procédé procure un gain de temps en terme de culture, une bonne reproductibilité et offre un choix de matrices biologiquement dégradables propice à chaque type cellulaire. Enfin, le procédé selon l'invention n'induit aucune interférence entre le sphéroïde et le tissu au sein duquel il est implanté, recréant ainsi un microenvironnement comparable à celui de la physiologie.

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

4

**RESUME DE L'INVENTION**

La présente invention se rapporte à un procédé d'obtention d'explant de peau contenant au moins un amas cellulaire. Les explants de peau utilisés pour cette invention sont issus de peau saine. Les amas cellulaires peuvent contenir des cellules  
5 cancéreuses/tumorales ou des cellules de follicules pileux, de glandes sébacées, de glandes sudoripares, de corpuscules sensoriels. Les explants de peaux contenant au moins un amas cellulaire obtenus par le procédé de l'invention constituent des modèles tridimensionnels particulièrement intéressants pour identifier de nouveaux composés à visée thérapeutique.

10 Ainsi, un premier objet de l'invention concerne un procédé *in vitro* pour implanter des amas cellulaires dans un explant de peau, ledit procédé comprenant une étape d'implantation d'au moins un amas cellulaire au sein dudit explant de peau. De préférence, ledit amas cellulaire est enrobé dans une matrice biologiquement dégradable.

15 Le procédé en question peut viser à modéliser une tumeur de la peau, le ou les amas cellulaires implantés sont alors constitués de cellules tumorales.

Le procédé selon l'invention peut également viser à obtenir des échantillons pileux, le ou les amas cellulaires implantés sont alors constitués de cellules de follicules pileux.

Un autre objet de la présente invention se rapporte à un explant de peau contenant au  
20 moins un amas cellulaire et susceptible d'être obtenu par le procédé décrit précédemment.

Encore un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un explant de peau contenant au moins un amas cellulaire constitué de cellules tumorales pour l'identification de composés présentant un effet anti-cancéreux.

25 Encore un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un explant de peau contenant au moins un amas cellulaire constitué de cellules de follicules pileux pour l'obtention d'échantillon pileux.



WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

5

Enfin, un autre objet de l'invention porte sur un kit permettant la mise en œuvre du procédé de l'invention, ledit kit comprenant des cellules à même de former des amas cellulaires, une matrice biologiquement dégradable, un explant de peau et éventuellement un dispositif d'implantation.

## 5 DESCRIPTION DES DESSINS

La figure 1 illustre le procédé de marquage/coloration d'un sphéroïde.

La figure 2 illustre le procédé d'inclusion d'un sphéroïde dans la matrice biologiquement dégradable.

La figure 3 illustre le procédé d'implantation d'un sphéroïde dans l'explant de peau.

10 La figure 4 montre l'implantation d'un sphéroïde dans un explant de peau après 24h de culture.

La figure 5 illustre le procédé d'implantation d'un sphéroïde en solution visqueuse.

La figure 6 montre l'implantation en gélatine 100 mg/mL d'un sphéroïde de la lignée WM-266-4, quelques minutes après son implantation dans un explant de peau  
15 (coloration Hématoxyline-Eosine).

La figure 7 montre l'implantation en agarose low melting 1% d'un sphéroïde de la lignée WM-266-4, 24 heures après son implantation dans un explant de peau (coloration Hématoxyline-Eosine).

La figure 8 montre l'implantation en PBS d'un sphéroïde de la lignée WM-266-4, 24  
20 heures après son implantation dans un explant de peau (coloration Hématoxyline-Eosine).

La figure 9 montre l'implantation en acide hyaluronique 10 mg/mL d'un sphéroïde de la lignée WM-266-4, quelques minutes après son implantation dans un explant de peau. Le sphéroïde est détecté par fluorescence (délimitation du sphéroïde par le trait  
25 noir continu) et la structure de la peau est rendue visible en lumière transmise.

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

6

La figure 10 montre l'implantation en gélatine 100 mg/mL d'un sphéroïde de la lignée WM-266-4, quelques minutes après son implantation dans un explant de peau. Le sphéroïde est détecté par fluorescence (délimitation du sphéroïde par le trait noir continu) et la structure de la peau est rendue visible en lumière transmise.

## 5 DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

L'invention a pour but de proposer un procédé *in vitro* reproductible et maîtrisé d'implantation d'amas cellulaires dans le derme d'un explant de peau, lequel procédé offre un nouvel outil de culture organotypique convenant à l'étude de la biologie cutanée.

- 10 Un premier objet de l'invention concerne un procédé *in vitro* pour implanter des amas cellulaires, en particulier des sphéroïdes, dans un explant de peau, ledit procédé comprenant une étape c) d'implantation, au sein dudit explant de peau, d'au moins un amas cellulaire, en particulier d'au moins un sphéroïde, enrobé de préférence dans une matrice biologiquement dégradable.
- 15 Par « amas cellulaires », on désigne un ensemble de cellules dont la taille varie de 10 à plusieurs milliers de cellules, de préférence une taille supérieure à  $10^3$  cellules, et de préférence encore une taille supérieure à  $10^4$  voir  $10^5$  cellules. Les cellules qui forment cet amas peuvent avoir été préalablement dissociées ou non. Une telle dissociation est généralement obtenue par voie enzymatique selon des méthodes bien connues de
- 20 l'Homme du métier. Les cellules qui composent l'amas cellulaire peuvent avoir des contacts et des interactions d'intensité variable qui conduisent à des organisations spatiales distinctes. Ainsi, un amas cellulaire résultant de la dissociation de cellules ne possède pas de structure spatiale organisée à T0, contrairement à un amas cellulaire constitué de cellules préalablement non dissociées. Maintenant, un amas cellulaire
- 25 correspond littéralement à une concentration/accumulation locale de cellules qui forme donc une masse, même si les cellules ne sont pas associées et qui diffère donc de cellules en solution, lesquelles ne forment en aucun cas une masse. Toutefois, cette structure peut évoluer sous réserve que cet amas cellulaire soit mis en culture pendant

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

7

plusieurs jours. Le sphéroïde constitue alors une organisation spatiale particulière d'amas cellulaire.

Par « sphéroïde », on désigne un ensemble de cellules organisées en multicouches concentriques et possédant une structure géométrique en forme de sphère. Les sphéroïdes se distinguent des agrégats de cellules qui constituent des structures cellulaires facilement dissociables (en raison de l'absence de liaisons cellules-cellules ou cellules-matrice). Par ailleurs, de tels agrégats sont dépourvus de structure sphérique. En lien avec la définition d'un sphéroïde, on pourra se reporter aux différentes revues sur le sujet (Kunz-Schuhghart et al, 1998, Multicellular spheroids : A three-dimensional *in vitro* culture system to study tumour biology, Int. J. Exp. Path. 79, 1-23 / Lin et al, 2008, Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research, Biotechnol. J. 3, 1172-1184 / Hirschhaeuser et al, 2010, Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again, Journal of Biotechnology 148, 3-15).

Le diamètre des sphéroïdes utilisés dans le procédé selon la présente invention varie de 100 à 1000  $\mu\text{m}$ , en particulier de 300 à 600  $\mu\text{m}$ , et plus particulièrement ont un diamètre d'au moins 500  $\mu\text{m}$ .

Par « implantation », on entend l'introduction d'un amas cellulaire, en particulier un sphéroïde, dans le derme d'un explant de peau. Cette introduction se caractérise par une insertion de l'amas cellulaire, en particulier du sphéroïde, directement dans la structure du derme. L'introduction de l'amas cellulaire, en particulier du sphéroïde, dans le derme s'effectue à l'aide d'un dispositif d'implantation, notamment une aiguille creuse, biseautée ou non, ou de tout autre dispositif mécanique équivalent connu de l'Homme du métier. Dans les heures qui suivent l'insertion de l'amas cellulaire, en particulier du sphéroïde, dans le derme, ce site d'insertion devient un site d'ancrage pour l'amas cellulaire, en particulier le sphéroïde, dans le derme.

Par « derme », on désigne le tissu sous-jacent de l'épiderme qui contient des réseaux vasculaires et nerveux denses ainsi que des annexes kératinisées prolongeant



l'épiderme, ce tissu inclut également les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares.

Le derme est subdivisé en deux parties qui diffèrent par la composition et l'organisation de leur matrice extracellulaire respective. Le derme papillaire se trouve  
5 directement sous l'épiderme. Il s'agit d'un tissu conjonctif lâche constitué de fines  
fibrilles de collagène de type I et III et des fibres élastiques qui sont orientées  
perpendiculairement à l'épiderme formant ainsi des structures en forme de  
chandelles. Le derme réticulaire, placée sous le derme papillaire, est également un  
tissu conjonctif composé d'un entrecroisement de faisceaux de grosses fibres de  
10 collagène et de fibres élastiques qui présentent une orientation préférentiellement  
parallèle à la surface de la peau. Le derme réticulaire contient moins de collagène de  
type III que le derme papillaire.

Par « explant de peau », on désigne un fragment ou une biopsie de peau qui comprend  
au moins l'épiderme, le derme et les annexes épidermiques. Ce fragment ou biopsie de  
15 peau pourra comprendre également une partie du tissu sous-cutané encore appelé  
hypoderme.

De préférence, ledit fragment ou biopsie de peau est prélevé chez un mammifère, en  
particulier chez l'humain ou chez le porc. Dans le but d'assurer sa survie *in vitro*, le  
prélèvement doit avoir été réalisé dans un délai de 1h à moins de 72h, de préférence  
20 de 1h à moins de 48h avant l'implantation de l'amas cellulaire, en particulier du  
sphéroïde. Les techniques de prélèvement d'explant de peau sont bien connues de  
l'Homme du métier.

Selon un mode de réalisation particulier, le procédé *in vitro* selon l'invention  
comprend, préalablement à l'étape c), une étape b) d'enrobage dudit au moins un  
25 amas cellulaire, en particulier dudit au moins un sphéroïde dans une matrice  
biologiquement dégradable.

Par « matrice biologiquement dégradable », on désigne un ensemble de molécules à  
même de former une enveloppe autour d'un amas cellulaire, en particulier d'un

sphéroïde, notamment par polymérisation, et naturellement dégradées par les constituants du derme. Cette dégradation intervient dans les heures qui suivent l'implantation de l'amas cellulaire, en particulier du sphéroïde dans l'explant de peau, permettant ainsi l'interaction directe de l'amas cellulaire, en particulier du sphéroïde avec l'explant de peau. La matrice biologiquement dégradable a pour but de permettre l'implantation de l'amas cellulaire, en particulier du sphéroïde, dans l'explant de peau mais doit disparaître rapidement pour ne pas interférer dans les interactions explant de peau / cellules implantées. Parmi les matrices biologiquement dégradables envisageables, l'Homme du métier au regard de ses connaissances générales choisira celle la plus adaptée au type cellulaire formant l'amas cellulaire, en particulier le sphéroïde.

Selon un mode de réalisation particulier, la matrice biologiquement dégradable est choisie dans le groupe comprenant ou consistant en la gélatine, les collagènes (en particulier les collagènes de type I, III, IV ou V), les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire (acide hyaluronique), l'élastine, les polysaccharides (agarose), une matrice synthétique biocompatible ou leur mélange.

Par « enrobage », on désigne l'action qui consiste à inclure/introduire/insérer l'amas cellulaire, en particulier le sphéroïde, dans la matrice biologiquement dégradable, laquelle se trouve de préférence en légère surfusion. La température de la matrice biologiquement dégradable doit permettre le maintien en vie des cellules de l'amas cellulaire, en particulier du sphéroïde et ainsi ne doit pas dépasser 37°C au moment de l'enrobage. Par ailleurs, la matrice biologiquement dégradable doit posséder une température de solidification/polymérisation à température ambiante (i.e. de 15°C à 25°C).

Dans un mode de réalisation spécifique, la matrice biologiquement dégradable sera la gélatine. L'origine de cette gélatine est animale, en particulier de bœuf ou de porc.

Avantageusement on utilisera une gélatine sous la forme d'une solution aqueuse dont la concentration en gélatine varie de 80 à 300 mg/ml, par exemple de 120 à 300 mg/ml, de préférence de 100 à 250 mg/ml, et de préférence encore de 100 à 150 mg/ml.

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

10

Dans un autre mode de réalisation spécifique,, la matrice biologiquement dégradable est un glycosaminoglycane, de préférence de l'acide hyaluronique.

Avantageusement, cet acide hyaluronique sera sous la forme d'une solution aqueuse dont la concentration (en acide hyaluronique) est comprise entre 2 et 30 mg/ml, 5 préférentiellement entre 3 et 20 mg/ml, en particulier entre 5 et 10 mg/ml.

Dans encore un autre mode de réalisation spécifique, la matrice biologiquement dégradable est un polysaccharide, de préférence de l'agarose et, de préférence encore, de l'agarose à faible point de fusion ou « low melting ».

Plus spécifiquement encore, on utilisera l'agarose « low melting » sous la forme d'une 10 solution aqueuse dont la concentration en agarose « low melting » est comprise entre 0,5 à 5% (en poids), préférentiellement entre 0,8 et 2%, et en particulier entre 1 et 1,5%.

Il est préférable que la viscosité de la matrice biologiquement dégradable soit telle, après polymérisation, qu'elle permette de ne pas altérer la structure de l'amas 15 cellulaire, en particulier du sphéroïde, tout en conférant une fermeté suffisante pour permettre son implantation dans l'explant, notamment par son expulsion de l'aiguille.

Avantageusement, la matrice biologiquement dégradable présente, après l'étape d'enrobage de l'amas cellulaire, en particulier du sphéroïde, dans la matrice biologiquement dégradable, une viscosité comprise entre 0,5 et  $10^4$  Pa.s, de 20 préférence entre 1 et  $10^3$  Pa.s de sorte que l'enrobé soit sous une forme visqueuse ou sous la forme d'un gel.

Selon un mode de réalisation particulier, l'amas cellulaire, en particulier le sphéroïde, est implanté en solution visqueuse (de 1 à 50 Pa.s) dans l'explant de peau.

Selon un mode de réalisation particulier, le procédé de l'invention comprend, en 25 préalable à l'étape c) et à l'étape b), une étape a) de coloration dudit au moins un amas cellulaire, en particulier dudit au moins un sphéroïde.



WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

11

Par « coloration », on désigne une étape de marquage de l'amas cellulaire, en particulier du sphéroïde, qui vise à le rendre apparent en lumière visible ou invisible en utilisant une sonde. Le but de cette étape de coloration est de pouvoir visualiser le ou les amas cellulaires, en particulier le ou les sphéroïdes à implanter. Ceci est  
 5 notamment réalisable par inclusion de pigments provenant de colorants naturels ou artificiels (cas des sondes colorantes). Il est également envisageable de colorer l'amas cellulaire avec une sonde fluorescente, notamment un fluorophore ou un fluorochrome. Dans ce cas, la détection de l'amas cellulaire est opérée sous émission de fluorescence.

10 En particulier, l'étape de coloration utilise une sonde colorante choisie dans le groupe comprenant ou consistant en le bleu de méthylène, le vert méthyle, le vert malachite, l'amido black, le cristal violet, le rouge neutre ou le bleu de Coomassie.

Encore plus particulièrement, l'étape de coloration utilise une sonde fluorescente choisie dans le groupe comprenant ou consistant en les carbocyanines lipophiliques  
 15 DiI (DiIC18(3)), DiO (DiOC18(3)), DiD (DiIC18(5)) et DiR (DiIC18(7)), le NUCLEAR-ID™, le CELL-MASK™ ou le CELL-TRACKER™, ou des nanoparticules (Quantum dots ou nanoparticules d'or).

Cette étape de coloration peut également être réalisée avec tout autre type de sonde, de préférence une sonde biocompatible, c'est-à-dire une sonde qui n'induit pas de  
 20 mort cellulaire au sein de l'amas cellulaire.

Selon un mode de réalisation particulier, le procédé selon l'invention comprend en outre une étape d) de mise en culture de l'explant de peau après implantation dudit au moins un amas cellulaire, en particulier dudit au moins un sphéroïde à l'issue de l'étape c), de préférence jusqu'à dégradation de la matrice biologiquement dégradable.

25 Une telle étape de mise en culture peut être réalisée selon les techniques classiques de culture d'explants de peau bien connues de l'Homme du métier. A titre d'exemple, de telles méthodes sont explicitées dans la demande internationale WO 2013/164436.

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

12

Par « mise en culture », on désigne la maintenance de l'état physiologique et morphologique de l'explant de peau et de l'amas cellulaire, en particulier du sphéroïde, qui y est implanté, c'est-à-dire de l'intégralité des cellules qui les composent. La durée de mise en culture varie en fonction de la nature de la matrice  
5 biologiquement dégradable, et en particulier de la vitesse à laquelle elle est dégradée par les enzymes situées dans le derme de l'explant de peau.

Par « dégradation de la matrice biologiquement dégradable », on désigne la digestion de tout ou partie de la matrice biologiquement dégradable par les enzymes présentes dans le derme de l'explant de peau. Ces enzymes sont notamment des collagénases  
10 synthétisées par les fibroblastes du derme ou des protéases contenues dans les granules des mastocytes du derme. La digestion de la matrice biologiquement dégradable conduit à l'obtention de peptides ou d'acides aminés qui sont rapidement éliminés.

De préférence, la dégradation de la matrice biologiquement dégradable permet un  
15 contact de l'amas cellulaire, en particulier du sphéroïde, et de ses cellules avec le derme. Avantagusement, cette dégradation est totale.

Selon un autre mode de réalisation, la dégradation de la matrice biologiquement dégradable peut être partielle en ce sens qu'il subsiste une fine couche de matrice biologiquement dégradable entre l'amas cellulaire et les cellules du derme. Cette  
20 interface matricielle permet toutefois une diffusion correcte des métabolites et des composés entre le derme et l'amas cellulaire.

La durée de mise en culture de l'explant pourra également varier en fonction de la nature des cellules de l'amas cellulaire. Ainsi, dans le cas d'amas cellulaires comprenant des cellules à forte capacité multiplicative, la durée de culture de l'explant  
25 de peau ne devra pas excéder celle du grossissement de l'amas cellulaire qui pourrait altérer l'intégrité tissulaire de l'explant. Inversement, dans le cas de cellules à croissance lente ou pour lesquelles une différenciation est nécessaire, la durée de culture de l'explant de peau pourra dépasser plusieurs jours.

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

13

Dans le procédé selon l'invention, ledit explant de peau est une biopsie de peau saine.

La biopsie peut provenir d'une plastie de n'importe quelle partie du corps d'un mammifère, de préférence d'un humain, comme par exemple de l'abdomen, de la poitrine, des fesses, du dos, du cuir chevelu, etc.

5 De préférence, la biopsie de peau est de forme cylindrique.

Toutefois, toute autre forme géométrique de biopsie de peau convient également au procédé selon l'invention, en particulier une forme carrée, rectangulaire, ovale, triangulaire, etc....

De préférence, la forme cylindrique possède un diamètre qui varie de 1 mm à 50 mm, plus particulièrement de 5 mm à 20 mm, encore plus particulièrement de 7 mm à 17 mm, et une épaisseur qui varie de 1 mm à 20 mm, plus particulièrement de 2 mm à 15 mm, encore plus particulièrement de 2 mm à 10 mm, et encore plus particulièrement de 2 mm à 5 mm.

Selon un mode de réalisation particulier, ledit au moins un amas cellulaire utilisé dans le procédé selon l'invention est constitué de cellules tumorales et il vise à modéliser une tumeur de la peau.

Par « cellules tumorales », on désigne des cellules possédant un dysfonctionnement au niveau du cycle cellulaire qui entraîne une hyperprolifération cellulaire. Ce dysfonctionnement est généralement dû à une altération génétique somatique d'un oncogène, d'un gène suppresseur de tumeur ou d'un gène impliqué dans la réparation de l'ADN.

Par « tumeur de la peau », on désigne une masse constituée de cellules cancéreuses, également et indifféremment appelées cellules tumorales. La gravité des tumeurs de la peau réside dans le fait que pour la plupart d'entre elles, les cellules qui les forment peuvent se propager vers d'autres parties du corps pour y former des métastases. Les tumeurs malignes de la peau se répartissent en deux familles principales : les carcinomes et les mélanomes.



Les carcinomes cutanés se développent en général sur les parties du corps souvent exposées au soleil comme le visage, le cou, les épaules, les avant-bras ou le dos des mains. Ils surviennent en général après 50 ans et évoluent lentement. Ils sont très fréquents, mais facilement guérissables dans la majorité des cas. Les principaux types

5 de carcinomes sont les carcinomes basocellulaires et les carcinomes épidermoïdes cutanés (également appelés carcinomes spinocellulaires).

Le mélanome cutané représente une minorité des cancers de la peau mais constitue le plus grave d'entre eux. Il survient à tout âge chez les adultes et est très rare chez l'enfant. Le mélanome apparaît sur n'importe quelle partie du corps, le plus souvent

10 sur le tronc chez l'homme et sur les jambes chez la femme. Son apparition est également liée à l'exposition au soleil. Il peut évoluer rapidement et se propager. Le mélanome se manifeste soit par l'apparition d'une tache pigmentée sur la peau saine qui ressemble à un naevus, soit par la modification de couleur et de forme d'un naevus préexistant. Les principaux types de mélanomes de la peau sont : le mélanome

15 superficiel extensif, le mélanome nodulaire, le mélanome de Dubreuilh et le mélanome acro-lentigineux.

Selon un mode de réalisation plus particulier, les cellules tumorales constituant l'amas cellulaire utilisé dans le procédé *selon* l'invention sont des cellules de mélanomes ou de carcinomes (e.g. baso- ou spinocellulaire).

20 Selon un autre mode de réalisation, les cellules constitutives de l'amas cellulaire utilisé dans le procédé de l'invention sont issues d'une pathologie cutanée autre qu'un cancer, en particulier ces cellules sont issues de pathologies inflammatoires de la peau telles qu'une plaque de psoriasis, une lésion d'eczéma, ou une dermatite atopique. En particulier, dans le cadre de pathologies inflammatoires cutanées, les cellules

25 constitutives de l'amas cellulaire sont des cellules de types fibroblastiques, des kératynocytes, des cellules endothéliales ou des cellules nerveuses.

Selon un mode de réalisation particulier, le procédé de l'invention vise à identifier des composés présentant un effet anti-cancéreux et il comprend en outre les étapes de :



WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

15

- e) Mise en contact d'au moins un composé avec un explant de peau à l'issue de l'étape d),
- f) Mise en culture du mélange issu de l'étape e), et
- g) Identification des composés présentant un effet anti-cancéreux à l'issue de l'étape f).

Par « effet anti-cancéreux », on désigne la capacité d'un composé à interagir avec le cycle cellulaire des cellules tumorales de l'amas cellulaire. La mesure du taux de survie ou du niveau de prolifération des cellules tumorales de l'amas cellulaire implanté dans l'explant de peau constitue un bon indicateur de l'effet anti-cancéreux d'un composé.

10 L'effet anti-cancéreux peut être évalué relativement à un composé contrôle ou témoin mis en contact avec un explant de peau tel qu'obtenu par le procédé *in vitro* selon l'invention et ne possédant pas d'effet anti-cancéreux, ou relativement à un explant de peau tel qu'obtenu par le procédé selon l'invention qui n'est mis au contact d'aucun composé. Les techniques de mesure d'apoptose, du taux de nécrose ou la

15 détermination des différentes phases du cycle cellulaire sont bien connues de l'Homme du métier.

De préférence, à l'issue de l'étape f) du procédé selon l'invention, on procédera à la sélection des composés qui sont associés à un taux de cellules mortes ou ne proliférant plus au sein de l'amas cellulaire d'au moins 10%, particulièrement d'au moins 30%,

20 plus particulièrement d'au moins 50%, encore plus particulièrement d'au moins 90%.

Avantageusement, les composés sélectionnés sont ceux n'induisant pas ou peu de mort cellulaire parmi les cellules de l'explant de peau, autre que celles de l'amas cellulaire. Par « n'induisant pas de mort cellulaire », on entend un taux de mort cellulaire qui soit au maximum supérieur à 10% à celui observé en l'absence du

25 composé, de préférence au maximum supérieur à 5% et, de manière particulièrement préféré au maximum supérieur à 2%.

Par « composé », on désigne des composés chimiques ou des vecteurs d'expression qui peuvent provenir de banques, notamment à visée de criblage, ou de composés

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

16

nouvellement synthétisés. Des vecteurs d'expression contenant un acide nucléique d'intérêt pourront notamment être utilisés dans la perspective de modifier le niveau d'expression d'un gène cible des cellules de l'amas cellulaire.

Les composés identifiés par le procédé de l'invention peuvent, dans une étape  
5 ultérieure, être testés sur des modèles animaux de pathologies cutanées, ceci afin de vérifier leur efficacité *in vivo*.

Un avantage des explants de l'invention est de pouvoir analyser simultanément l'effet des composés sur les cellules de l'amas cellulaire et sur les cellules du derme et de l'épiderme de l'explant de peau. Ceci permet de discriminer les composés possédant à  
10 la fois un effet anti-cancéreux sur les cellules tumorales de l'amas cellulaire et un effet toxique sur les cellules du derme et de l'épiderme, des composés possédant un effet anti-cancéreux sur les cellules tumorales de l'amas cellulaire et qui sont non toxiques pour les cellules du derme et de l'épiderme. En d'autres termes, la mesure de l'efficacité des composés vis-à-vis des cellules tumorales (amas cellulaire) et la mesure  
15 de leur innocuité vis-à-vis des cellules saines (explant de peau) peuvent être réalisées au cours d'une même expérience, de manière synchrone. Ainsi, l'identification des composés anti-cancéreux et non toxiques est réalisée en un seul criblage, engendrant ainsi un gain de temps considérable et une réduction des coûts.

Selon un autre mode de réalisation particulier, ledit au moins un amas cellulaire utilisé  
20 dans le procédé de l'invention est constitué de cellules de follicule pileux, de glandes sébacées, de glandes sudoripares ou de corpuscules sensoriels et il vise à l'obtention d'échantillons pileux.

Par « obtention d'échantillons pileux », on désigne l'organisation de cellules en plusieurs couches distinctes et identifiables de sorte à recréer une structure similaire à  
25 celle d'un follicule pileux naturel. Ainsi, les échantillons pileux obtenus selon le procédé *in vitro* de l'invention possèdent une densité de follicules pileux pouvant varier de 1 à plusieurs dizaines par explant de peau.

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

17

Selon un autre mode de réalisation plus particulier, les cellules de follicules pileux constituant l'amas cellulaire utilisé sont choisies dans le groupe comprenant ou consistant en les cellules dermiques de la papille, les cellules progénitrices de la matrice, les cellules souches du bulbe ou leur mélange.

- 5 Ces différents types cellulaires sont à l'origine de la morphogénèse *in vitro* de nouveaux follicules pileux. Tout comme les follicules pileux naturels, leur structure comprend une papille dermique, une gaine épithéliale interne et externe, un muscle horripilateur, une glande sébacée et une tige pileuse.

- 10 Un autre objet de l'invention concerne un explant de peau contenant au moins un amas cellulaire susceptible d'être obtenu par le procédé décrit précédemment.

Un tel explant de peau est qualifié de « en culture » et se trouve par exemple dans une boîte, plaque ou flasque de culture et en présence de milieu de culture.

Plus particulièrement, ledit au moins un amas cellulaire implanté dans l'explant de peau est constitué de cellules tumorales.

- 15 Encore plus particulièrement, ledit au moins amas cellulaire implanté dans l'explant de peau est constitué de cellules de follicules pileux.

Encore un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un explant de peau contenant au moins un amas cellulaire susceptible d'être obtenu par le procédé décrit précédemment pour l'identification des composés présentant un effet anti-cancéreux.

- 20 Les composés identifiés selon cette utilisation de l'invention peuvent servir de base à l'élaboration de traitements thérapeutiques pour un patient souffrant de cancer cutané. Une telle utilisation selon l'invention permet d'envisager une thérapie personnalisable d'un patient à l'autre en fonction de l'intensité de l'effet anti-cancéreux des différents composés testés sur les cellules des amas cellulaires.

- 25 Selon un autre mode de réalisation, un explant de peau contenant au moins un amas cellulaire susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention pourra être utilisé pour l'obtention d'échantillons pileux.



WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

18

De tels échantillons pileux peuvent notamment être réimplantés sur le cuir chevelu de patients atteints d'alopecie ou qui ont subi un traitement radio-ou chimio-thérapeutique.

Encore un autre objet de l'invention concerne un kit de mise en œuvre du procédé *in vitro* selon l'invention, ledit kit comprenant des cellules à même de former un amas cellulaire, une matrice biologiquement dégradable, un explant de peau, et, éventuellement, un dispositif d'implantation d'un amas cellulaire.

Dans un kit selon l'invention, les cellules à même de former un amas cellulaire sont des cellules tumorales ou des cellules issues de follicules pileux.

10 Dans un kit selon l'invention, la matrice biologiquement dégradable est choisie dans le groupe comprenant ou consistant en la gélatine, le collagène de type I, III, IV ou V, les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire, l'élastine, les polysaccharides, une matrice synthétique biocompatible ou leur mélange.

Dans un kit selon l'invention, un explant de peau est une biopsie de peau saine.

15 Dans un kit selon l'invention, le dispositif d'implantation est une aiguille de format 14G à 29G, en particulier de 17G à 25G, plus particulièrement de 16G à 23G, montée sur une seringue, un capillaire, une tige creuse, un trocart ou tout autre dispositif mécanique susceptible de remplir les mêmes fonction qu'une aiguille à savoir le passage d'une matrice biologiquement dégradable et d'un amas cellulaire, la polymérisation de ladite matrice biologiquement dégradable autour de l'amas cellulaire puis leur éjection dans un explant de peau. Le dispositif d'implantation  
20 pourra être pourvu ou non d'une extrémité biseautée dans le but de faciliter l'implantation du sphéroïde dans l'explant de peau.

Les exemples suivants sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de la  
25 présente invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

## EXEMPLES

### 1 - Préparation du sphéroïde

#### 1.1 - Culture de sphéroïdes

Les sphéroïdes de cellules adhérentes sont obtenus par culture sur un support  
5 empêchant l'adhérence des cellules. Les interactions cellules-cellules étant ainsi  
favorisées, les cellules s'agrègent et forment une structure 3D solide. La technique de  
culture en plaque 96 puits est décrite ci-après.

La surface des puits de plaques de culture 96 puits est traitée avec un hydrogel n'ayant  
pas d'affinités avec les cellules (ex : Poly-HEMA) au moins 24h à l'avance. Les cellules  
10 d'une culture monocouche sont décollées de leur support à l'aide de trypsine afin  
d'obtenir une suspension cellulaire. Les cellules sont ensuite comptées pour  
déterminer la concentration cellulaire de la suspension. 100 µL de suspension  
cellulaire contenant de 500 à 5000 cellules sontensemencées par puits de plaques 96  
puits pré-traitées avec l'hydrogel précité. Les plaques 96 puits sont centrifugées 6 min  
15 à 190 g. Le rassemblement des cellules au centre des puits est vérifié sous microscope  
optique et les plaques 96 puits contenant les cellules sont incubées à 37°C, en  
présence de 5% de CO<sub>2</sub> sous atmosphère humide.

Les sphéroïdes se forment et sont manipulables après 24 à 48h selon les cellules  
testées. Leur milieu de culture est renouvelé tous les trois jours et leur diamètre est  
20 mesuré sous un microscope inversé jusqu'à ce qu'ils atteignent le diamètre souhaité.  
Par exemple, les sphéroïdes HCT116 ensemencés à 2000 cellules à jour J0 atteignent  
un diamètre d'environ 550 µm à J+3.

Les sphéroïdes peuvent être produits à partir de lignées commerciales où à partir de  
cellules primaires issues de tissus normaux ou pathologiques issus d'exérèses : cancers  
25 cutanés (mélanome, cancers baso- ou spinocellulaires, autre type de cancers cutanés)  
plaques de psoriasis, lésion d'eczéma ou de dermatite atopique, ou tout autre type de  
pathologie cutanée.

### 1.2 - Marquage / coloration du sphéroïde

Le sphéroïde est récupéré de son puits de la plaque 96 puits et transféré dans un tube à fond conique de 1,5 ml de type EPPENDORF (figure 1). Puis le sphéroïde est marqué avec la sonde fluorescente biocompatible souhaitée selon le mode opératoire qui lui est propre. Par exemple, dans le cas du NUCLEAR-ID™, le sphéroïde est incubé pendant 24h à 37°C dans une solution de NUCLEAR-ID™ à 1 µM dans du milieu de culture.

Le sphéroïde est coloré avec un colorant choisi dans le groupe comprenant ou consistant en le bleu de méthylène, le vert méthyle, le vert malachite, l'amido black, le cristal violet, le rouge neutre ou le bleu de Coomassie:

- le milieu de culture du sphéroïde est remplacé par la solution de colorant à la concentration préconisée et incubé le temps nécessaire à 37°C. Par exemple, dans le cas du vert malachite, le sphéroïde est incubé pendant 15 min à 37°C dans une solution de vert malachite à 10 mg/mL dans du PBS.
- le colorant est éliminé et rincé par bains successifs de PBS autant de fois que nécessaire pour éliminer tout le surplus de colorant.

### 1.3 - Inclusion dans la gélatine

Une solution de gélatine à 150 mg/mL est préparée et chauffée pour la rendre liquide au moins 1h à l'avance, puis sa température est rééquilibrée à 37°C. 1 mL de la solution de gélatine est prélevé et transféré dans un tube EPPENDORF. Le sphéroïde est pipeté dans un volume minimal de PBS et re-suspendu dans la solution de gélatine.

Une aiguille de jauge 16 à 23, plus particulièrement de 16 à 20 et encore plus particulièrement de 18 est montée sur une seringue de 0,5 à 10 mL et plus particulièrement de 0,5 à 5 mL, et encore plus particulièrement de 1 mL. A l'aide de la seringue, la gélatine, caractérisée par une viscosité à 35°C comprise entre 15 et 250 mPa.s est aspirée jusqu'à remplir la totalité du volume de l'aiguille (la gélatine doit commencer à remonter dans le volume mort situé entre l'aiguille et la seringue). Une fois l'aiguille remplie, aspirer le sphéroïde suspendu dans la gélatine afin que celui-ci reste dans les derniers microlitres de l'aiguille. Poser le dispositif seringue / aiguille

contenant le sphéroïde à l'horizontale sous le PSM (Poste de Sécurité Microbiologique) et laisser prendre en masse la gélatine à température ambiante pendant minimum 10 minutes (figure 2).

## 2 - Implantation du sphéroïde

- 5 L'aiguille est détachée de la seringue. A l'aide d'une pince, l'explant de peau est maintenu à plat, derme sur le dessus. L'aiguille est introduite dans l'explant par le côté du derme, jusqu'à ce que le biseau soit entièrement rentré dans le derme. Le biseau de l'aiguille est placé au plus près de l'épiderme.

- 10 Tout en maintenant l'extrémité de l'aiguille dans l'explant de peau à l'aide d'une pince, un objet cylindrique stérilisé et dont le diamètre est inférieur au diamètre interne de l'aiguille est introduit dans l'aiguille. La gélatine contenant le sphéroïde est éjectée de l'aiguille en poussant l'objet cylindrique stérilisé à l'intérieur de l'aiguille jusqu'à la vider de tout son contenu. L'aiguille est retirée délicatement de l'explant de peau (figure 3).

## 15 3 - Culture *ex vivo*

- L'explant implanté de son sphéroïde est monté sur une matrice liquide coulée dans un insert de culture selon le même procédé que celui utilisé pour le modèle NATIVESKIN™, basé sur l'utilisation d'une matrice naturelle servant de support physique et de couche nourricière à des explants de peau ou d'épiderme humains
- 20 cultivés in vitro. L'explant est ensuite cultivé en plaque (culture en incubateur, renouvellement quotidien du milieu de culture).

- L'observation du sphéroïde enrobé a révélé que la gélatine utilisée lors de l'implantation est naturellement et rapidement dégradée par les constituants du derme dans les heures suivant son injection, permettant de ce fait l'interaction directe
- 25 du sphéroïde avec l'explant de peau ce qui fait de celui-ci un modèle reproductible et appréciable.

## 4 – Analyse par histologie



#### 4.1 – Coupe sur microtome

L'analyse peut se faire sur des échantillons inclus en bloc de paraffine par coupes  
sériées au microtome.

L'explant de peau dans lequel au moins un sphéroïde est implanté est déshydraté par  
5 un bain d'alcool puis passage dans un bain de xylène. Un premier bain dans la  
paraffine permet de remplacer l'eau préalablement contenue dans l'explant de peau  
par la paraffine.

Les échantillons imprégnés de paraffine sont sortis de leur bain et transférés dans un  
récipient dont le fond est tapissé de papier absorbant, afin d'être apportés à proximité  
10 de la station d'inclusion.

Les échantillons, enfermés dans des cassettes d'histologie, sont plongés dans la  
paraffine liquide à 56°C pour faire refondre la paraffine qui les imprègne.

Pour chaque échantillon : la cassette d'histologie est ouverte, l'échantillon est  
éventuellement coupé en deux. Un moule d'inclusion est rempli de paraffine liquide,  
15 et l'échantillon (ou les 2 morceaux d'échantillon) est placé dans le moule et orienté  
dans le sens désiré pour la coupe. Le moule est en même temps transféré sur un  
support réfrigéré afin de solidifier la paraffine du fond du moule et d'y maintenir  
l'échantillon. Le couvercle de la cassette d'histologie sur lequel figure la référence de  
l'échantillon est placé par-dessus, de telle façon que la paraffine le traverse (possibilité  
20 d'ajouter de la paraffine si besoin), puis le tout est placé au froid (réfrigérateur,  
freezer, chambre froide...) plusieurs minutes (5-6), afin de solidifier la paraffine en  
bloc, emprisonnant l'échantillon dans la bonne orientation et le couvercle de la  
cassette d'histologie qui deviendra le support du bloc.

Une fois le bloc bien solide, celui-ci est démoulé. L'excès de paraffine est  
25 éventuellement gratté à l'aide d'une spatule sur les côtés du couvercle de la cassette  
d'inclusion.

Des coupes sériees d'épaisseur variant de 4 à 5  $\mu\text{m}$  sont alors réalisées sur toute la longueur du bloc de paraffine contenant l'échantillon.

La figure 4 illustre les résultats d'une telle coloration réalisée sur un explant de peau implanté avec un sphéroïde après 1 jour de culture. L'analyse du modèle par histologie (ex : coloration Hématoxyline et Eosine) permet d'attester de la présence d'un sphéroïde dans le derme de la biopsie de peau, d'observer sa structure et de suivre son évolution au cours de la culture.

#### 4.2 – Cryosection

L'analyse peut également se faire sur coupe congelée afin de ne pas altérer la fluorescence des cellules / du(es) sphéroïde(s) à la déshydratation.

La culture de l'explant de peau dans lequel au moins un sphéroïde est implanté est arrêtée en fixant l'échantillon 24h dans 10 fois son volume de formaline 10%. L'explant est ensuite rincé dans 10 fois son volume de PBS, épongé sur un papier absorbant et transféré dans un tube EPPENDORF. Le tube EPPENDORF est plongé dans l'azote liquide jusqu'à la congélation de l'explant.

Dans l'enceinte du cryostat, l'explant congelé est inclus en OCT puis des tranches d'épaisseur constante de 3 à 15  $\mu\text{m}$  de la partie de l'explant contenant le/le(s) sphéroïde(s) implanté(s) sont réalisées. Les tranches sont déposées sur lames qui sont séchées pendant quelques heures au minimum.

Une coloration classique à l'Hématoxyline et Eosine est réalisée.

### 5- Implantation du sphéroïde en solution visqueuse

#### 5.1 – Composition des solutions

N°	Solution
1	Phosphate Buffered Saline (PBS)
2	Gélatine : concentration variant de 100 mg/mL à 250 mg/mL
3	Acide hyaluronique : de 5 à 10 mg/mL

N°	Solution
4	Agarose Low melting 1%

### 5.2 – Implantation du sphéroïde en PBS

Les sphéroïdes issus des deux lignées cellulaires HCT116 et WM-266-4 ont été cultivés et colorés comme décrit aux points 1.1 et 1.2.

- 5 Le sphéroïde est transféré dans un tube contenant du PBS. Il est aspiré dans environ 10 µL de PBS dans une aiguille 18G montée sur une seringue 1 mL. Il est ensuite injecté comme précédemment décrit par le côté du derme d'un explant. La figure 8 illustre l'implantation d'un sphéroïde en PBS.

Cette méthode, très traditionnelle, ne permet pas d'implanter de façon systématique un sphéroïde dans un explant, elle a été testée à titre de comparaison avec les autres méthodes d'implantation d'un sphéroïde en matrice biodégradable.

10

### 5.3 – Implantation du sphéroïde en solution visqueuse

La figure 5 résume les différentes étapes d'implantation d'un sphéroïde en solution visqueuse. Les sphéroïdes issus des deux lignées cellulaires HCT116 et WM-266-4 ont été cultivés et colorés comme décrit au points 1.1 et 1.2.

15

- Inclusion dans la solution visqueuse :

La solution de gélatine ou d'acide hyaluronique à la concentration donnée est préchauffée à 37°C dans un bain-marie à sec.

Le sphéroïde est prélevé de son puits de culture et transféré dans un tube EPPENDORF.

- 20 Son milieu de culture est aspiré et remplacé par 1 mL de solution visqueuse. Le tube est conservé à 37°C jusqu'à implantation.

- Implantation :

Une aiguille de jauge 18 est montée sur une seringue de 1 mL.

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

25

10  $\mu$ L de solution visqueuse sont aspirés dans l'aiguille, puis le sphéroïde est aspiré dans quelques  $\mu$ L de solution visqueuse supplémentaire.

L'injection du contenu de l'aiguille se fait immédiatement après enrobage afin que la solution reste visqueuse.

- 5 L'aiguille est introduite dans l'explant de peau (maintenu à plat à l'aide d'une pince, derme sur le dessus) par le côté du derme, jusqu'à ce que le biseau soit entièrement rentré dans le derme (comme précédemment).

Tout en maintenant l'extrémité de l'aiguille dans l'explant, la solution contenant le sphéroïde est éjectée de l'aiguille en utilisant la seringue à laquelle elle est reliée.

- 10 L'aiguille est ensuite délicatement retirée de l'explant de peau.

Les figures 6 et 10 illustrent l'implantation d'un sphéroïde en gélatine 100 mg/ml dans un explant de peau.

La figure 7 illustre l'implantation d'un sphéroïde en agarose « low melting » 1%.

La figure 9 illustre l'implantation d'un sphéroïde en acide hyaluronique 10 mg/ml.

15

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

26

## REVENDICATIONS

1. Un procédé *in vitro* pour implanter des amas cellulaires dans un explant de peau, ledit procédé comprenant une étape c) d'implantation, au sein dudit explant de peau, d'au moins un amas cellulaire, en particulier d'au moins un sphéroïde, enrobé de préférence d'une matrice biologiquement dégradabile.  
5
2. Le procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend préalablement à l'étape c), une étape b) d'enrobage dudit au moins un amas cellulaire dans une matrice biologiquement dégradabile.  
10
3. Le procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la matrice biologiquement dégradabile est choisie dans le groupe comprenant ou consistant en la gélatine, les collagènes, les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire, l'élastine, les polysaccharides, une matrice synthétique biocompatible ou leur mélange, de préférence la matrice biologiquement dégradabile est la gélatine, un glycosaminoglycane (ex. cide hyaluronique) ou un polysaccharide (ex. agarose).  
15
4. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend, en préalable à l'étape c), et de l'étape b), une étape a) de coloration dudit au moins un amas cellulaire, laquelle étape de coloration utilise un colorant choisi dans le groupe comprenant ou consistant en une sonde colorante ou une sonde fluorescente.  
20
5. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape d) de mise en culture de l'explant après implantation dudit au moins un amas cellulaire au terme de l'étape c), et ceci de préférence jusqu'à dégradation de la matrice biologiquement dégradabile.  
25



WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

27

6. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit au moins un amas cellulaire est constitué de cellules tumorales et en ce qu'il vise à modéliser une tumeur de la peau.
- 5 7. Le procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il vise à identifier des composés présentant un effet anti-cancéreux et en ce qu'il comprend en outre les étapes de :
  - e) Mise en contact d'au moins un composé avec un explant à l'issue de l'étape d),
  - 10 f) Mise en culture du mélange issu de l'étape e), et
  - g) Identification des composés présentant un effet anti-cancéreux à l'issue de l'étape f) .
- 15 8. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit au moins amas cellulaire est constitué de cellules de follicules pileux, de glandes sébacées, de glandes sudoripares ou de corpuscules sensoriels et en ce qu'il vise à l'obtention d'échantillon pileux.
- 20 9. Un explant, de préférence en culture, contenant au moins un amas cellulaire susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.
- 25 10. L'explant selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit au moins un amas cellulaire est constitué de cellules tumorales ou de cellules de follicule pileux de glandes sébacées, de glandes sudoripares ou de corpuscules sensoriels.
11. Utilisation de l'explant selon la revendication 10 implanté d'au moins un amas cellulaire constitué de cellules tumorales ou de cellules de follicule pileux, de glandes sébacées, de glandes sudoripares ou de corpuscules sensoriels pour

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

28

l'identification de composés présentant un effet anti-cancéreux ou pour l'obtention d'échantillon pileux respectivement.

- 5      12. Un kit de mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 comprenant des cellules à même de former un amas cellulaire, une matrice biologiquement dégradable, un explant de peau et, éventuellement, un dispositif d'implantation d'un amas cellulaire.



WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

1/6

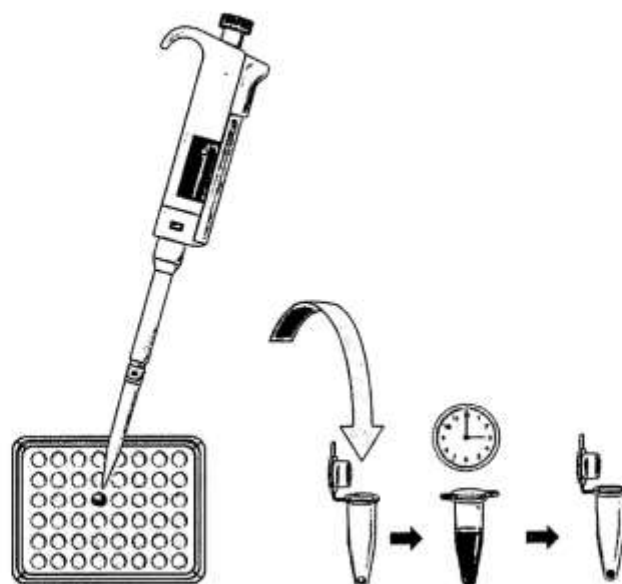


FIGURE 1

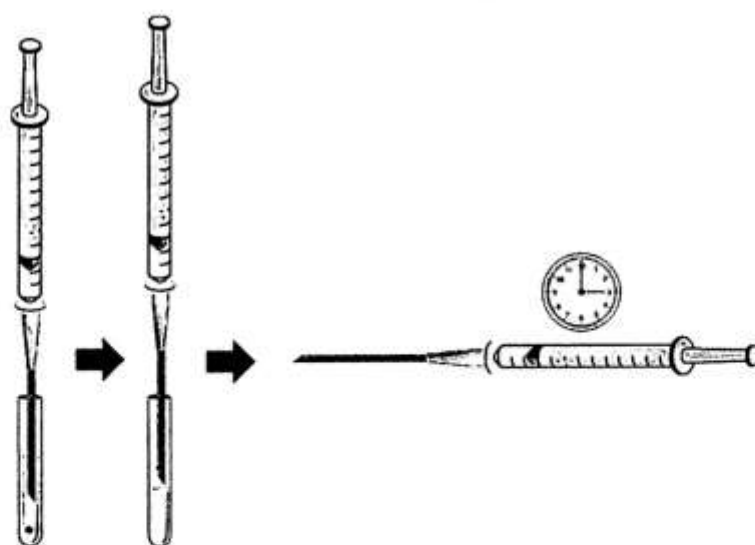


FIGURE 2

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

2/6

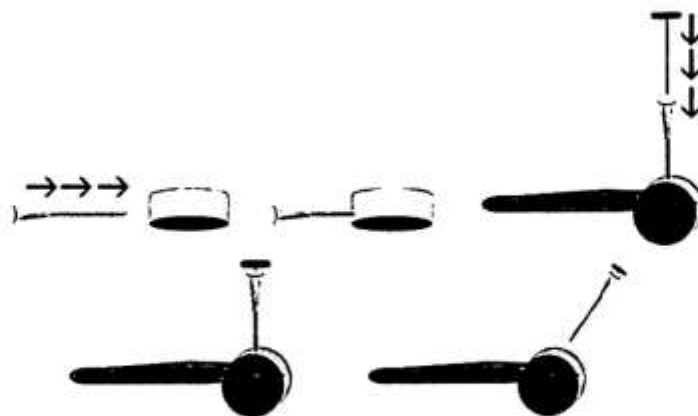


FIGURE 3

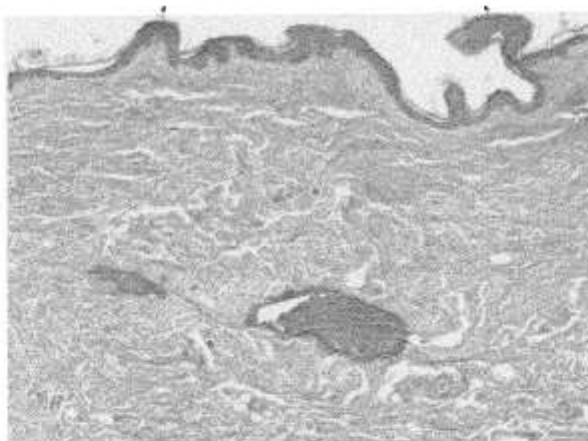


FIGURE 4

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

3/6

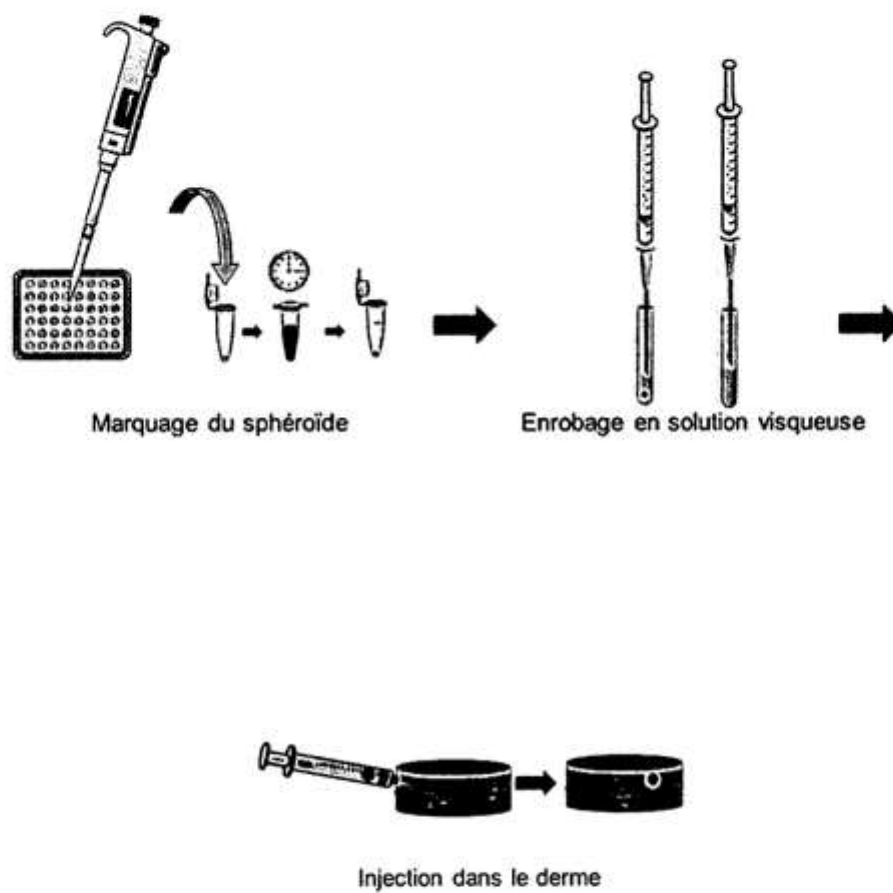


FIGURE 5

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

4/6

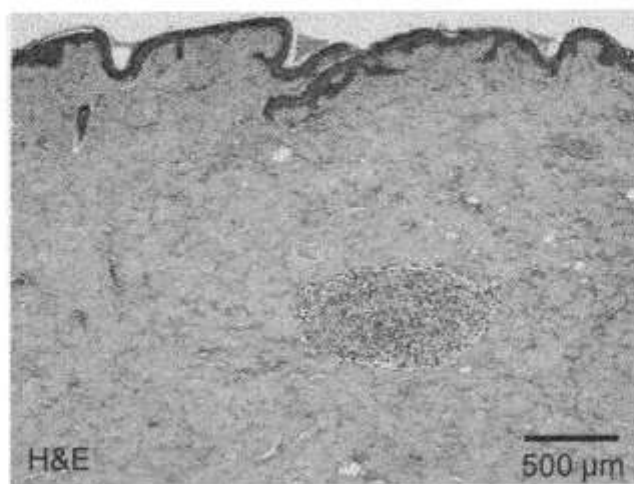


FIGURE 6

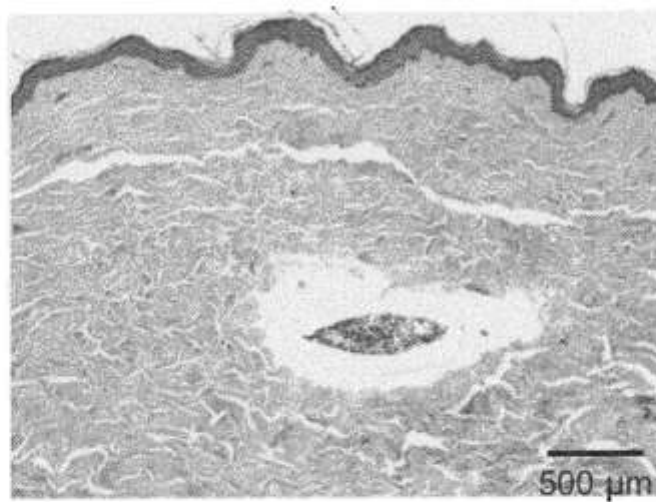


FIGURE 7

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

5/6

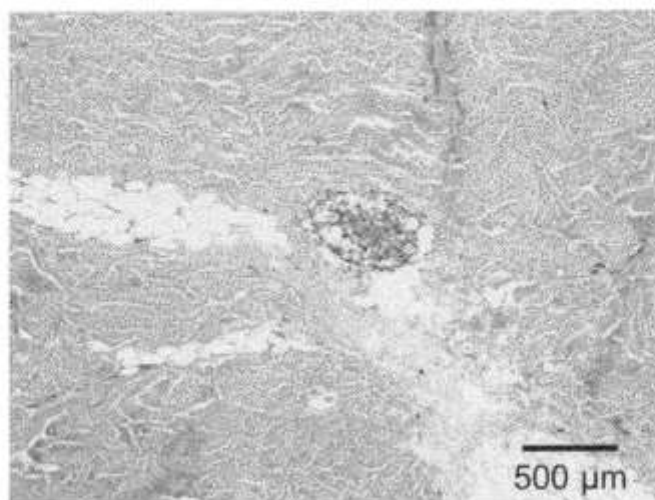


FIGURE 8



FIGURE 9

WO 2016/128135

PCT/EP2016/000223

6/6

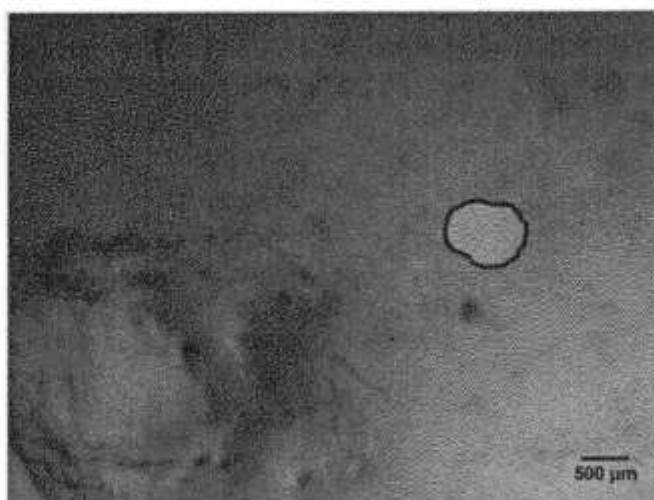


FIGURE 10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2016/000223

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12N5/071 C12N5/09  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KRUGLUGER WALTER ET AL: "Reorganization of hair follicles in human skin organ culture induced by cultured human follicle-derived cells", EXPERIMENTAL DERMATOLOGY, BLACKWELL MUNSGAARD, COPENHAGEN; DK, vol. 14, no. 8, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 580-585, XP002548419, ISSN: 0906-6705 [retrieved on 2005-03-09] the whole document</p> <p>----- -/--</p>	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 2016

Date of mailing of the international search report

22/04/2016

Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Manu, Dominique



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/000223

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	F. MEIER ET AL: "Combined targeting of MAPK and AKT signalling pathways is a promising strategy for melanoma treatment", BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY, vol. 156, no. 6, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 1204-1213, XP055082399, ISSN: 0007-0963, DOI: 10.1111/j.1365-2133.2007.07821.x the whole document	12
A	----- H VÖRSMANN ET AL: "Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing", CELL DEATH AND DISEASE, vol. 4, no. 7, 1 July 2013 (2013-07-01), page e719, XP055236407, DOI: 10.1038/cddis.2013.249 cited in the application the whole document	1-12
A	----- KEEFE T. CHAN ET AL: "Intravital imaging of a spheroid-based orthotopic model of melanoma in the mouse ear skin", INTRAVITAL, vol. 2, no. 2, 1 April 2013 (2013-04-01), page e25805, XP055236427, DOI: 10.4161/intv.25805 the whole document	1-12
A	----- WO 2013/164436 A1 (GENOSKIN [FR]) 7 November 2013 (2013-11-07) the whole document	1-12
A	----- MATHES STEPHANIE H ET AL: "The use of skin models in drug development", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, vol. 69, 27 December 2013 (2013-12-27), pages 81-102, XP028648699, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2013.12.006 the whole document -----	1-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/000223

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013164436 A1	07-11-2013	CA 2872313 A1	07-11-2013
		EP 2882290 A1	17-06-2015
		FR 2990106 A1	08-11-2013
		US 2015132737 A1	14-05-2015
		WO 2013164436 A1	07-11-2013
-----			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2016/000223

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
INV. C12N5/071 C12N5/09  
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>KRUGLUGER WALTER ET AL: "Reorganization of hair follicles in human skin organ culture induced by cultured human follicle-derived cells", EXPERIMENTAL DERMATOLOGY, BLACKWELL MUNSGAARD, COPENHAGEN; DK, vol. 14, no. 8, 1 août 2005 (2005-08-01), pages 580-585, XP002548419, ISSN: 0906-6705 [extrait le 2005-03-09] le document en entier</p> <p>-----</p> <p>-/--</p>	1-11

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 avril 2016

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/04/2016

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Manu, Dominique

1

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2016/000223

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	F. MEIER ET AL: "Combined targeting of MAPK and AKT signalling pathways is a promising strategy for melanoma treatment", BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY, vol. 156, no. 6, 1 juin 2007 (2007-06-01), pages 1204-1213, XP055082399, ISSN: 0007-0963, DOI: 10.1111/j.1365-2133.2007.07821.x le document en entier -----	12
A	H VÖRSMANN ET AL: "Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing", CELL DEATH AND DISEASE, vol. 4, no. 7, 1 juillet 2013 (2013-07-01) , page e719, XP055236407, DOI: 10.1038/cddis.2013.249 cité dans la demande le document en entier -----	1-12
A	KEEFE T. CHAN ET AL: "Intravital imaging of a spheroid-based orthotopic model of melanoma in the mouse ear skin", INTRAVITAL, vol. 2, no. 2, 1 avril 2013 (2013-04-01), page e25805, XP055236427, DOI: 10.4161/intv.25805 le document en entier -----	1-12
A	WO 2013/164436 A1 (GENOSKIN [FR]) 7 novembre 2013 (2013-11-07) le document en entier -----	1-12
A	MATHES STEPHANIE H ET AL: "The use of skin models in drug development", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, vol. 69, 27 décembre 2013 (2013-12-27), pages 81-102, XP028648699, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2013.12.006 le document en entier -----	1-12

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2016/000223

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2013164436 A1	07-11-2013	CA 2872313 A1	07-11-2013
		EP 2882290 A1	17-06-2015
		FR 2990106 A1	08-11-2013
		US 2015132737 A1	14-05-2015
		WO 2013164436 A1	07-11-2013
-----			

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (avril 2005)



# Développement d'un modèle humain de mélanome ex vivo basé sur l'implantation de sphéroïdes dans des explants de peau

Claire JARDET

**Directeurs de thèse :** Valérie Lobjois et Pascal Descargues

Le mélanome métastatique est le cancer de la peau le plus agressif. Bien que son taux d'incidence soit inférieur à 1%, plus de 75% des décès associés à un cancer de la peau lui sont attribués. Au cours des dernières années, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont permis d'améliorer la survie des patients. Cependant, des mécanismes de résistance à ces traitements se développent dans la majorité des cas, conduisant à une phase de rechute, et une survie à 5 ans inférieure à 20%. Des modèles d'étude expérimentaux sont nécessaires afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'apparition de ces résistances et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Différents modèles *in vitro* sont actuellement utilisés pour le développement de drogues anti-tumorales, tels que celui du sphéroïde. Bien qu'il permette de reproduire l'organisation tridimensionnelle d'une tumeur, l'absence de microenvironnement tumoral empêche l'étude des interactions entre les cellules tumorales et celui-ci alors que ces facteurs jouent un rôle primordial dans la croissance tumorale et le développement de métastases.

Dans ce contexte, mes travaux ont porté sur le développement et la caractérisation d'un modèle *ex vivo* de mélanome humain complet permettant l'étude de l'évolution d'une tumeur dans le tissu sain et l'évaluation de composés pharmacologiques.

Les travaux réalisés ont tout d'abord conduit au développement d'un modèle de cancer cutané basé sur la combinaison d'un modèle de sphéroïde de lignée cellulaire de mélanome humain et du modèle de peau humaine *ex vivo* NativeSkin®, développé par la société Genoskin. Une procédure a été développée et validée pour permettre l'implantation reproductible d'un sphéroïde dans le derme des explants de peau. Parallèlement, j'ai développé une approche d'imagerie *in situ* par microscopie à feuille de lumière après transparaïsation des modèles. J'ai également développé une stratégie d'analyse d'images permettant la caractérisation quantitative de l'évolution du sphéroïde implanté en 3 dimensions et de suivre la dispersion des cellules du tumorales au sein de l'explant de peau. La caractérisation histologique du modèle implanté a révélé de façon très inattendue une perte progressive de l'intégrité du sphéroïde après implantation, associée à une diminution rapide de la prolifération des cellules le constituant et l'apoptose massive des cellules situées à sa périphérie. Ce phénomène a été observé de façon similaire lors de l'implantation de sphéroïdes produits à partir de différents types cellulaires. Afin de comprendre ces résultats, j'ai étudié l'implication potentielle de différents paramètres dans l'induction de la mortalité cellulaire observée tels que les conditions d'implantation, les facteurs synthétisés par le modèle et la contrainte mécanique exercée par le derme. Les résultats obtenus suggèrent que les facteurs sécrétés par les modèles après implantation du sphéroïde ont un effet antiprolifératif sur les sphéroïdes de mélanome et qu'ils induisent la mortalité des cellules situées à sa périphérie. Par ailleurs, l'application d'une contrainte mécanique extérieure sur les sphéroïdes de mélanome entraîne la perte de la cohésion de leur structure. Enfin, l'implantation de sphéroïdes dans le derme de biopsies de peau préalablement desséchées, induisant une perte de la viabilité cellulaire, a conduit à des résultats opposés à ceux observés avec de la peau normale : la structure des sphéroïdes reste cohésive et la prolifération des cellules est maintenue en périphérie du sphéroïde sans qu'aucune apoptose massive ne soit observée.

L'ensemble de ces travaux semble suggérer que la mortalité du sphéroïde pourrait être, en partie, la conséquence d'une contrainte mécanique exercée par la peau sur le sphéroïde et/ou de facteurs produits par la peau durant sa culture. Ces données ouvrent des perspectives intéressantes dans le domaine de l'ingénierie tissulaire pour l'évaluation pharmacologique de composés thérapeutiques.

## **Mots-Clés :**

Mélanome, Modèle *ex vivo*, NativeSkin®, Sphéroïde multicellulaire, Microenvironnement

**Discipline :** Ecole Doctorale BSB Biotechnologies