



HAL
open science

Caractérisation de marqueurs moléculaires associés à un haut risque de développement de métastases chez des patients atteints du mélanome de la choroïde

Cecile Laurent

► **To cite this version:**

Cecile Laurent. Caractérisation de marqueurs moléculaires associés à un haut risque de développement de métastases chez des patients atteints du mélanome de la choroïde. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112155 . tel-00769924

HAL Id: tel-00769924

<https://theses.hal.science/tel-00769924>

Submitted on 4 Jan 2013

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

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

Université Paris-Sud XI
Ecole Doctorale : Gènes, Génomes, Cellules

Inserm U900 - Mines ParisTech
Institut Curie
26 rue d'Ulm
75248 Paris Cedex 5

CNRS UMR3347- INSERM U1021
Institut Curie
Université Paris-Sud 11, Bât. 110
91405 Orsay Cedex

Thèse

présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD XI

Par **Cécile Laurent**

**Caractérisation de marqueurs moléculaires
associés à un haut risque de
développement de métastases
chez des patients atteints
du mélanome de la choroïde**

Soutenue le **26 Septembre 2011** devant le jury composé de :

Daniel Gautheret
Robert Ballotti
Philippe Dessen
Frédéric Mouriaux
Jessica Zucman-Rossi
Emmanuel Barillot
Simon Saule

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Encadrant
Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Pr. Simon Saule de m'avoir proposé ce sujet de recherche et de m'avoir aidé tout au long de mes 4 années de thèse. Nos discussions sur la biologie ont été très importantes et très enrichissantes dans mon travail même s'il m'arrivait d'être perdue parfois. Merci aussi pour m'avoir appris de nombreux proverbes oubliés de beaucoup d'entre nous !

Je tiens également à remercier le Dr. Emmanuel Barillot pour m'avoir encadrée et permis de réaliser ce travail dans son unité. L'entourage U900 a été d'une importance capitale dans l'avancement de mon projet.

Je souhaite adresser mes remerciements aux membres de mon jury pour avoir accepté de juger mon travail. Merci au Dr. Philippe Dessen et au Dr. Robert Ballotti d'avoir consacré du temps à rapporter mon manuscrit, au Pr. Jessica Zucman-Rossi et au Pr. Frédéric Mouriaux mes examinateurs ainsi qu'au Dr. Daniel Gautheret qui a accepté d'en être le président.

Je remercie l'ensemble des membres du projet mélanome uvéal avec qui j'ai interagit tout au long de mon doctorat. Un grand merci à Sophie Piperno-Neumann, Sergio Roman-Roman, Laurence Desjardins, Didier Decaudin, Jérôme Couturier, David Gentien (and co, parce qu'il ne faut pas oublier les ABCC !), Fariba Némati, Bernard Asselain, Philippe Hupé, Laetitia Marisa qui a amorcé ce travail de thèse et Fabien Valet avec qui j'ai travaillé en étroite collaboration.

Je souhaite également remercier l'ensemble des personnes de mon unité à Orsay, et plus particulièrement merci à Océane, Audrey et Selma avec qui j'ai passé d'excellents moments, aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Merci également à Géraldine, nos échanges sont plus récents mais pas moins agréables !

Je remercie l'ensemble des personnes de l'U900 et plus particulièrement la bioinfo BDD avec qui j'ai partagé ces 4 années et qui ont fait de mon quotidien un cocon professionnel indispensable. Merci à vous tous, car outre l'aspect professionnel, je suis très heureuse des rencontres que j'y ai faites. Je me dois de remercier plus particulièrement le bureau biostat, Pierre pour savoir souvent mieux que moi ce que je fais, Nicolas parce qu'il est indispensable et sans lui ce serait pas pareil, Caroline, Isabel, Jonas et Sylvie, qui participent ou ont participé à la bonne humeur du bureau ; mes supers copines, Anne et sa joie de vivre, Fanny et ses petites épaules qui portent le monde, Fantine et ses cookies, Jenny la meilleure des mamans, Laurence parce qu'elle le vaut bien, Loredana et ses facultés régénératrices hors du commun ; les papoteurs du midi, Séverine, Georges, Isabelle ; les copains du café et autres, Gautier, Patrick, Stéphane, Laurent...

Merci également à Eléonore et Fabien, à la fois pour nos échanges professionnels et pour tous ces bons moments passés ensemble.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans un petit mot pour ma famille qui est essentielle à mon équilibre et qui a toujours été derrière moi. Merci papa et maman d'être toujours là pour moi et d'être fiers de ce que je fais, vous êtes parfaits, ne changez rien ! Merci à mes sœurs et mes beauf' pour leur soutien et qui sont tous un bel exemple à suivre pour la petite dernière que je suis.

Merci également à beau-papa et belle-maman pour leurs encouragements.

Je pense également à tous mes amis du Sud et de Paris qui sont présents dans ma vie, de près ou de loin et qui suivent mon parcours. Un merci tout particulier à ma BFF Sandrine, heureusement qu'elle est là dans le bon et le mauvais.

Et pour finir, the last but not least, j'achèverai ces remerciements en décernant une mention spéciale à mon cher et tendre, Cédric. Tout ceci, c'est aussi grâce à lui, un zeste d'encouragement pour les moments de relâchement, une pincée de fierté au moment d'un papier, un accompagnement de tous les jours, et on obtient un diplôme de docteur ! Merci de m'avoir accompagnée dans cette aventure et d'avoir été là tout simplement. Cette thèse c'est un peu la tienne aussi et si j'avais choisi de la dédicacer, elle aurait été pour toi ;)

Table des matières

I	Introduction	14
1	Le cancer	15
1.1	Origine	15
1.1.1	Origine clonale	15
1.1.2	Cellules souches cancéreuses	16
1.2	Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs	17
1.2.1	Les oncogènes	17
1.2.2	Les gènes supresseurs de tumeurs	18
1.3	Caractéristiques des cellules cancéreuses	19
1.3.1	Perte de contrôle au niveau du cycle cellulaire	19
1.3.1.1	Indépendance vis-à-vis des signaux stimulants la prolifération cellulaire	19
1.3.1.2	Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs	20
1.3.2	Fabrication de la masse tumorale	21
1.3.2.1	Prolifération illimitée	21
1.3.2.2	Résistance à la mort cellulaire	22
1.3.3	Maintien de la masse tumorale	23
1.3.4	Activation du potentiel invasif et migratoire	23
1.3.5	Reprogrammation du métabolisme	25
1.3.6	Microenvironnement et système immunitaire	25
2	Les technologies haut débit dans l'étude des cellules tumorales	28
2.1	Introduction	28
2.2	Principe général	29
2.2.1	Les puces à ADN par dépôt	29
2.2.2	Les puces à ADN à oligonucléotides synthétisés <i>in situ</i>	29
2.2.3	Les puces à ADN à microbilles (<i>Bead Chip</i>)	30
2.3	Haut-débit et étude des cancers	31
2.3.1	Étude au niveau de l'ADN	33
2.3.1.1	Analyse du nombre de copie	33
2.3.1.2	Polymorphismes	33
2.3.1.3	Méthylation	34
2.3.1.4	Fixation de régulateurs	36
2.3.2	Étude au niveau de l'ARN	36
2.3.2.1	Quantification	37
2.3.2.2	Epissage	37
2.3.2.3	micro ARN	38

2.3.3	Étude au niveau protéique	38
2.3.4	Étude phénotypique	39
2.4	Analyse du génome	39
2.4.1	Les puces CGH	39
2.4.2	Les puces Affymetrix SNP6.0	40
2.4.3	Extraction du signal	42
2.4.3.1	Traitement des puces CGH	42
2.4.3.2	Traitement des puces SNP6.0	43
2.4.4	Segmentation des données	44
2.4.5	Attribution du génotype pour les puces SNP6.0	45
2.5	Analyse du transcriptome	46
2.5.1	Les puces 3'IVT d'Affymetrix	46
2.5.2	Les puces Exon Array d'Affymetrix	48
2.5.3	Algorithmes pour l'extraction du signal des puces d'expression Af- fymetrix	49
2.5.3.1	MAS 5.0	49
2.5.3.2	RMA et GCRMA	50
2.5.3.3	Autres algorithmes	50
3	Analyse de données haut débit	51
3.1	Analyses exploratoires non supervisées	51
3.1.1	Clustering Hiérarchique	51
3.1.1.1	Métriques	52
3.1.1.2	Les critères de liens	53
3.1.2	Analyse en Composantes Principales	54
3.2	Analyses Supervisées	55
3.2.1	Le test de Student	56
3.2.2	L'analyse de la variance	57
3.2.3	Le test de Wilcoxon	58
3.2.4	Contrôle du taux d'erreur	58
3.2.4.1	Le taux d'erreur globale	59
3.2.4.2	Le taux de faux positifs	59
3.2.5	Exemple de la méthode SAM	60
3.2.6	Statistique bayésienne empirique	60
3.3	Analyse d'enrichissement	61
3.3.1	La « Gene Ontology »	61
3.3.2	La base de données KEGG	63
3.3.3	Les Tests Hypergéométriques	64
3.3.4	L'outil GSEA	65
3.4	Analyse de survie	66
3.4.1	Définitions	66
3.4.2	Les courbes de survie et la méthode de Kaplan-Meier	68
3.4.3	Comparaison de courbes de survie	68
3.4.3.1	Test du logRank	69
3.4.3.2	Modèle de Cox	69

4	Les mélanocytes et les mélanomes	71
4.1	Origine des Mélanocytes	71
4.2	Description anatomique	73
4.2.1	La Peau	73
4.2.1.1	Organisation	73
4.2.1.2	Rôle des mélanocytes	75
4.2.2	L'œil	76
4.2.3	Formation de l'œil	77
4.3	La mélanogénèse	79
4.4	Pathologies associées aux mélanocytes de la choroïde	80
4.4.1	Pathologies associées à une anomalie de pigmentation	80
4.4.2	Pathologies associées à une hyper prolifération des mélanocytes	81
4.5	Le mélanome de la choroïde	82
4.5.1	Généralités	82
4.5.1.1	Épidémiologie et facteurs de risques	82
4.5.1.2	Diagnostic	84
4.5.1.3	Traitement initial	84
4.5.1.4	Évolution	85
4.5.2	Altérations chromosomiques	86
4.5.3	Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des mélanomes de la choroïde	89
4.5.3.1	Facteurs de transcription et modulation d'expression de gènes clés	91
4.5.3.2	Altérations de voies métaboliques	94
4.5.3.3	Mutations de récepteurs	96
II	Résultats	99
5	Analyse de la collection de Tumeurs Primaires de l'Institut Curie	102
5.1	Introduction	102
5.2	Résultats	103
5.2.1	Implication de la phosphatase PTP4A3 dans les mélanomes uvéaux 103	
5.2.1.1	Une forte expression de PTP4A3 est corrélée avec le risque métastatique chez les patients atteints de mélanome de la choroïde	103
5.2.1.2	PTP4A3, une molécule dérégulée dans les mélanomes uvéaux métastatiques	114
5.2.1.3	Analyse des lignées OCM-1 transfectées avec PTP4A3	124
5.2.2	Autres gènes d'intérêts dans l'analyse des tumeurs primaires	127
6	Analyse de la collection de métastases de l'Institut Curie	133
6.1	Introduction	133
6.2	Matériel et Méthodes	134
6.3	Résultats	136
6.3.1	Les profils d'expression des métastases	136
6.3.2	Analyse de survie	139
6.3.3	Analyse des couples	140

6.4 Conclusion	141
7 Analyse des modèles de xéno greffes de l'Institut Curie	143
7.1 Introduction	143
7.2 Résultats	144
7.2.1 Établissement des modèles murins	144
7.2.2 Caractérisation des modèles murins par analyse transcriptome et génomique	158
7.3 Conclusion	206
8 Analyse de données haut débit	207
8.1 Introduction	207
8.2 Résultats	208
III Discussion	213
IV Conclusion	220
V Bibliographie	223

Table des figures

1.1	Organisation hiérarchique d'un clone malin	17
1.2	Caractéristiques des cellules cancéreuses	19
1.3	La sénescence et la crise : barrières à la prolifération cellulaire illimitée.	21
1.4	Sites de EMT et MET et la progression des carcinomes.	24
1.5	Les cellules du microenvironnement tumoral	26
2.1	Puce Affymetrix	28
2.2	Principe de l'hybridation compétitive	30
2.3	La technologie des puces à microbilles	31
2.4	Du gène à la protéine	32
2.5	La méthylation de l'ADN	35
2.6	Principe de l'immunoprécipitation de la chromatine sur puce	36
2.7	Différents types d'épissage alternatifs	37
2.8	Principe de la CGH	40
2.9	Exemple de profil SNP6.0	42
2.10	Biais spatiaux	43
2.11	GAP visualisation	46
2.12	Définition d'un probesets	47
2.13	Différence puces 3'IVT et puces Exons	49
3.1	Clustering hiérarchique - Critères de lien	54
3.2	Base de données GO	62
3.3	Base de données KEGG	64
3.4	GSEA	65
3.5	Définitions en survie	67
3.6	Courbe de Kaplan-Meier	68
4.1	Formation des crêtes neurales	72
4.2	Cellules dérivées des crêtes neurales	73
4.3	Structure de la peau	74
4.4	Maturation des mélanosomes	75
4.5	L'œil	77
4.6	Formation de l'œil	78
4.7	Voies de synthèse des mélanines	79
4.8	Mélanogénèse	80
4.9	Mélanome de la choroïde	83
4.10	Locations des mélanomes uvéaux	84
4.11	Types cellulaires des mélanomes choroïdiens	85

4.12	Altérations chromosomiques	87
4.13	Chronologie des altérations chromosomiques	88
4.14	Voies majeures impliquées dans le mélanome cutané	90
4.15	Voies majeures impliquées dans le mélanome de la choroïde	91
4.16	Structure de MITF	92
4.17	La voie des MAP kinases	95
4.18	La voie de signalisation PI3K/AKT	97
5.1	Clustering hiérarchique des constructions OCM-1	125
5.2	Analyse Différentielle sur les OCM-1	126
5.3	Distribution des intensités	129
5.4	Clustering hiérarchique sur les gènes différentiellement exprimés entre les deux groupes de tumeurs primaires	130
5.5	Corrélation entre PTP4A3 et DNAPK	132
6.1	ACP sur les 115 métastases	137
6.2	ACP des tumeurs primaires sur les gènes différentiels - Ajout des métastases	138
6.3	Clustering Hiérarchique sur les couples	141

Liste des tableaux

3.1	Risque statistique	58
6.1	Description clinique des métastases hépatiques	135

Résumé

La choroïde ou uvée, située entre la rétine et la sclérotique, est une membrane vasculaire qui tapisse la paroi de l'œil, son rôle est d'assurer l'apport en nutriment de la rétine et de l'iris. Ce tissu peut être le siège de nombreuses tumeurs, bénignes ou malignes. Le mélanome de la choroïde est la tumeur intra-oculaire la plus fréquente de l'adulte mais les facteurs de risque sont mal connus : l'exposition aux ultraviolets n'est pas clairement établi dans la genèse de la tumeur, de même que l'âge ou le sexe.

L'énucléation a longtemps été considérée comme la seule option thérapeutique, mais depuis de nombreuses années, des techniques dites conservatrices de l'œil se sont développées. Des études ont montré qu'il n'y a pas de différence significative de survie entre les patients ayant subi une énucléation et les patients traités avec des méthodes conservatrices. De plus, à ce jour, aucune thérapie adjuvante n'a montré son efficacité après le traitement du mélanome oculaire primaire. En effet, malgré un traitement initial bien adapté, la moitié des patients va récidiver sur le mode métastatique. Environ 30% des patients récidivent dans les 5 ans, ce chiffre augmente jusqu'à 50% à 15 ans.

L'œil étant dépourvu de structures lymphatiques, la diffusion métastatique du mélanome uvéal se fait par voie hématogène. Le foie est le site privilégié de développement de métastases, faisant toute la gravité du pronostic. La médiane de survie après apparition de métastases est de 2 à 6 mois en l'absence de traitement. Il peut exister de façon plus anecdotique des métastases pulmonaires, ganglionnaires, osseuses ou cutanées.

Sur un plan génétique, les critères les plus fréquemment détectés pour le mélanome uvéal sont la perte du chromosome 3 et le gain du 8q. Plusieurs études montrent dans beaucoup de cas des aberrations chromosomiques non aléatoires sur les chromosomes 1, 3, 6 et 8 et que la perte du chromosome 3 et le gain du 8q sont associés significativement à une survie réduite et au développement de métastase. Plusieurs rapports suggèrent deux entités distinctes de mélanome uvéal (avec et sans monosomie du chromosome 3) qui ne peuvent pas être différenciées du fait de leur aspect clinico-pathologique similaire.

Afin d'améliorer le diagnostic et le traitement du mélanome de la choroïde, nous proposons d'effectuer des analyses d'expression et du nombre de copie d'ADN de ce mélanome particulier, avec pour objectifs : l'identification des gènes liés à l'apparition de métastase pour classer les patients à haut risque afin qu'ils puissent bénéficier d'une immunothérapie adjuvante spécifique, la caractérisation de ces gènes au niveau moléculaire, et l'étude du potentiel de ces gènes en tant que cibles thérapeutiques.

Dans ce manuscrit je décrirai en détail le lignage mélanocytaire afin de comprendre les particularités du mélanome de la choroïde par rapport au mélanome cutané, puis j'aborderai l'importance des approches haut débit dans l'étude des cancers et les techniques d'analyse bioinformatiques utilisées. Je présenterai ensuite les différents résultats obtenus comme la mise en évidence d'une phosphatase, PTP4A3, qui semble avoir de

l'importance dans le développement métastatique du mélanome de la choroïde.

Mots-clés bioinformatique, mélanome de la choroïde, puces à ADN, transcriptome, génome, développement métastatique

Laboratoires

Encadrement Biologique - Pr. Simon Saule

CNRS UMR3347- INSERM U1021
Institut Curie
Université Paris-Sud 11, Bât. 110
91405 Orsay Cedex

Encadrement Bio-informatique - Dr. Emmanuel Barillot

Inserm U900 - Mines ParisTech
Institut Curie 26 rue d'Ulm
75248 Paris Cedex 5

Abstract

The choroid is a layer of highly vascularised tissue surrounding the eye. Choroidal blood nourishes the retinal pigment epithelium and the photoreceptors on the outer layer of the retina. Uveal melanoma occurs to the detriment of uveal melanocytes (located in the iris, ciliary body and choroid) and is the most common intraocular malignancy in adults. The etiological factors involved in the process of malignant transformation are poorly understood. There is a doubtful role of environmental factors such as exposure to sunlight, age or sex in the emergence of uveal melanoma.

The management of uveal melanomas has greatly evolved, moving towards more focused and conservative treatments (such as observation, photocoagulation, thermotherapy, radiotherapy). According to literature, there is no significant difference in survival between patients treated with enucleation and those treated with conservative methods. To date, no adjuvant therapy has proven effective following the initial treatment of ocular melanoma.

The metastatic pattern for uveal melanoma differs from that of skin melanoma and is usually located in the liver. About 50% of patients will develop metastases after a median time of three years, and will ultimately die of their disease. Once the disease becomes metastatic, median survival ranges from two to six months, and only 15% of the patients survive more than one year. Surgical resection of metastases is feasible only if occurring in limited areas.

Genetic differences may be the origin of the various types of melanoma and their different features. Multivariate analyses of genomic imbalances, showed that cutaneous and uveal melanomas presented different copy number changes. The most frequently detected imbalances in uveal melanoma is the loss of chromosome 3 and gain of 8q. Further studies revealed that most cases show non-random chromosomal aberrations of chromosomes 1, 3, 6 and 8 and that the loss of chromosome 3 and gain of 8q were significantly associated with overall survival and the development of metastases. Some reports suggested two distinct entities of uveal melanoma (with or without chromosome 3 monosomy) previously unrecognized because of their similar clinicopathological features.

In order to improve diagnosis and treatment of uveal melanoma, we propose to perform transcriptome and DNA copy number analysis with following objectives : identify genes linked to metastasis behaviour to identify high risk patients who could take advantage of specific adjuvant therapy ; characterize these genes at molecular level ; study if these genes could be powerful therapeutic target.

In this thesis, I will describe the melanocyte lineage in order to understand differences observed between cutaneous and uveal melanoma, then I will discuss the importance of high-throughput approaches in the study of cancer and bioinformatics analysis techniques used. I will finally present the different results as the significance of a phosphatase, PTP4A3, which seems to be relevant in metastatic behaviour in uveal melanoma.

Keywords bioinformatics, uveal melanoma, microarrays, transcriptome, genome, metastasis behaviour

Abréviations

aCGH	Comparative Genomic Hybridization arrays
ACP	Analyse en Composante Principale
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AOC	Albinisme Oculo-Cutané
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BAF	B allele frequency
BH95	ajustement de Benjamini et Hochberg
BP	Biological Process
CC	Cellular component
CDF	Chip Description File
Cdk	Cycline-dependent kinases
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CSC	Cellules Souches Cancéreuses
DDEF1 [ASAP1]	Development and differentiation enhancing factor 1
ddl	degré de liberté
DPYSL2 [CRMP2]	DihydroPYrimidinaSe-Like 2 [Collapsin Response Mediator Protein 2]
ES	Enrichment Score
FDR	False Discovery Rate
FWER	Family-Wise Error Rate
GAP	Genome Alteration Print
GO	Gene Ontology
GSK3	glycogen synthase kinase 3
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
HR	Hazard-Ratio
IGF1	Insuline Growth Factor
IGF1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IQR	Inter-Quartile Range
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
LOH	Loss of heterozygosity
LRR	Logarithmic R Ratio
MF	Molecular Function
MGF	Mast cell Growth Factor
MITF	Microphthalmia-Transcription-Factor
MU	Mélanome Uvéal
NHEJ	Non Homologous End Joining

PLS	Partial Least Square
PTP4A3 [PRL3]	Protein Tyrosine Phosphatase type IV A member 3
PRKDC [DNAPK]	PRotein Kinase, Dna-activated, Catalytic subunit
RH	Recombinaison Homologue
RPE	Rétine Pigmentaire
rt-PCR	reverse transcription-Polymerase Chain Reaction
SCF	Stem Cell Factor
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOX10	SRY Box 10
SW	Syndrome de Waardenburg
TP	Tumeurs Primaires (meta0 : non métastatiques - meta1 : métastatiques à 36 mois)
TYR	Trosinase
TRP1	Trosinase-Related-Protéin-1
TRP2 [DCT]	Tyrosinase-Related-Protéin-2 [DopaChrome Tautomérase]
VHL	Von Hippel-Lindau

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Le cancer

Le cancer est la cause de 14% des décès dans le monde et de 25% dans les pays industrialisés, principalement à cause de l'augmentation de l'espérance de vie [Boyle and Levin, 2008]. C'est une maladie caractérisée par une prolifération anormale de cellules dans un tissu ou organe donné menaçant son bon fonctionnement et sa survie. Cette capacité à proliférer résulte d'une série de modifications qui permettent aux cellules d'échapper à différents points de contrôles.

Dans ce premier chapitre, nous allons nous intéresser au cancer dans ses grandes lignes, à savoir son origine et les principales caractéristiques des cellules tumorales afin de comprendre comment une cellule peut passer d'un état normal à un état hyperprolifératif et invasif.

1.1 Origine

Les différentes formes de cancer se composent d'une grande hétérogénéité cellulaires ou moléculaires tel que leur morphologie, les marqueurs à leur surface, les lésions génétiques, la cinétique de prolifération ou encore la réponse aux traitements [Dick, 2008]. Il existe pour l'heure deux théories expliquant l'origine de cette hétérogénéité. Bien que les deux théories soient différentes, elles ne sont pas mutuellement exclusives et il semble que certains types de tumeurs suivent préférentiellement l'un ou l'autre modèle [Shackleton et al., 2009].

1.1.1 Origine clonale

L'existence d'une origine monoclonale des cellules tumorales a été proposée par Nowell [Nowell, 1976]. Cette théorie suppose que les cellules tumorales proviennent d'une seule cellule d'origine qui acquiert une série de mutations dans des gènes clés impliqués dans la croissance cellulaire, la migration, etc. En effet, une série de mutations est nécessaire dans le processus de carcinogénèse pour transformer une cellule normale en une cellule maligne [Hanahan and Weinberg, 2000]. Le clone le plus agressif est sélectionné par des mutations progressives car il est le plus apte à survivre dans l'environnement tumoral faisant ainsi référence à un processus dénommé Darwinisme tumoral [Vermeulen et al., 2008]. À chaque étape, une cellule acquiert une nouvelle mutation qui lui donne un avantage sélectif par rapport à ses voisines. Les cellules filles émergentes vont continuer à se diviser pour former une tumeur et vont donc devenir le clone dominant dans

la masse tumorale. Dans ce modèle classique, il n'existe peu ou pas de hiérarchie entre les différents clones et toutes les cellules peuvent contribuer de manière équivalente à la croissance de la tumeur.

1.1.2 Cellules souches cancéreuses

Depuis quelques années, une autre théorie permet d'expliquer l'hétérogénéité observée dans les tumeurs. Le modèle des cellules souches cancéreuses (CSC) propose que la croissance et la progression des cancers est conduite par un sous-groupe de cellules cancéreuses [Reya et al., 2001; Dick, 2008] et l'hétérogénéité observée dans les tumeurs est le résultat d'un gradient de différenciation. Certaines cellules tumorales sont différenciées et expriment des marqueurs cellulaires et moléculaires associés à la différenciation, alors que d'autres, les cellules souches cancéreuses, se trouvent à un stade immature.

Une cellule tumorale est définie comme CSC lorsqu'elle répond à deux critères fondamentaux par analogie aux cellules souches normales. Ces cellules doivent pouvoir s'auto-renouveler et elles doivent être capable de se différencier vers l'ensemble des cellules présentes dans la tumeur (Fig. 1.1). Dans une tumeur on observe à la fois des cellules différenciées qui ont perdu la capacité de propager la tumeur et des CSC. Cette organisation hiérarchique peut facilement s'intégrer dans la théorie clonale proposée par Nowell. Comme expliqué précédemment, cette théorie se base sur la présence d'un clone qui acquiert par des mutations des propriétés prolifératives. Si les CSC sont incluses dans ce modèle, la sélection par des mutations pourrait se faire au niveau de ces cellules. Ce qui n'exclut pas le fait d'avoir des cellules plus différenciées soumises à sélection.

Cette théorie fait encore l'objet de débat notamment sur la cellule d'origine d'une CSC. Cette cellule peut être une cellule souche normale ou une accumulation de mutations peut transformer une cellule différenciée en CSC.

Avec cette théorie, les seules cellules capables d'initier la croissance tumorale sont les CSC.

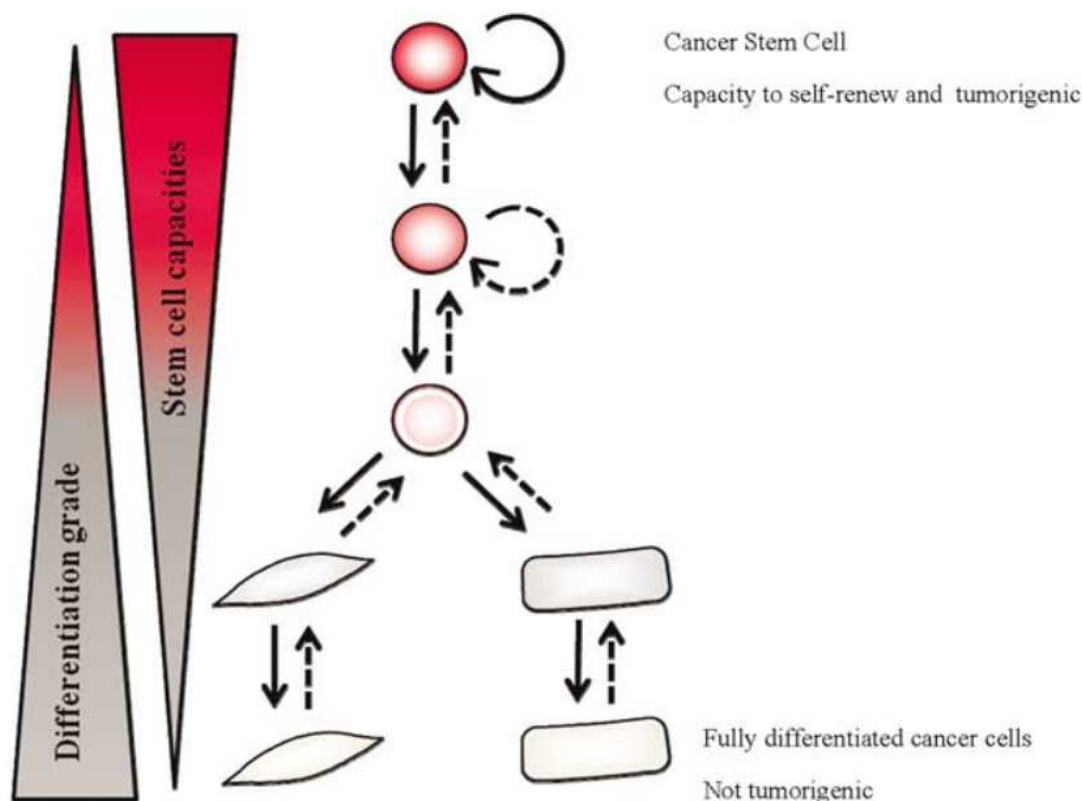


FIG. 1.1: Organisation hiérarchique d'un clone malin.

Ce schéma représente l'organisation possible d'un clone malin prédit par le modèle de CSC. La CSC au sommet de la hiérarchie (rouge) a la capacité de s'auto-renouveler, ce qui signifie générer plus de CSC, et diverger en cellules différenciées (gris). Il est, à ce jour, pas clair si les cellules plus différenciées peuvent revenir en arrière et retrouver un phénotype de cellules souches.

Figure et légende d'après [Vermeulen et al., 2008]

1.2 Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Les cellules tumorales diffèrent de leur homologues normales par plusieurs aspects tel que leur morphologie, les interactions cellules-cellules, leur croissance, la structure de leur cytosquelette ou encore le profil d'expression de leurs gènes avec une accumulation de mutations. Il existe deux grandes classes de gènes pour lesquelles des altérations sont causales dans la progression tumorale. Les oncogènes qui présentent une trop grande activité dans les cellules cancéreuses et les gènes suppresseurs de tumeurs qui eux sont plutôt touchés par des mutations visant à diminuer leur activité. Il existe un grand nombre d'acteurs dans les oncogènes alors que le nombre de gènes suppresseurs de tumeurs est bien plus faible.

1.2.1 Les oncogènes

Les gènes pour lesquels une mutation gain de fonction conduit une cellule normale en cellule cancéreuse sont des proto-oncogènes et leurs formes mutées correspon-

dantes sont les oncogènes. Ces gènes participent à des actions essentielles dans la cellule comme la croissance et la prolifération. Ils sont donc au cœur de voies de signalisation centrales et sont ainsi extrêmement bien conservés au cours de l'évolution. Au moins trois différents mécanismes de mutations peuvent transformer un proto-oncogène en oncogène : une mutation ponctuelle entraînant une activation constitutive du proto-oncogène ; une amplification du segment d'ADN qui contient le proto-oncogène entraînant ainsi une sur-expression de la protéine ; une translocation qui place le gène sous le contrôle d'un promoteur différent causant ainsi une expression inappropriée du gène.

Le premier mécanisme diffère des deux autres dans le sens où l'oncoprotéine produite est légèrement différente de la version normale, alors que dans les deux derniers la protéine produite est identique mais en plus grande quantité que dans une cellule normale. Ces mutations gain de fonction agissent de façon dominante, en effet une mutation dans un seul des deux allèles est suffisante pour l'induction du phénotype cancéreux.

Les oncogènes peuvent agir : au niveau de l'ADN, en contrôlant l'expression des gènes par le remodelage de la chromatine (MLL dans les leucémies) ou via des facteurs de transcription (MYCN dans le neuroblastome) ; au niveau des voies de transduction du signal par l'action de facteurs mitogènes ou des récepteurs permettant l'activation de ces voies (FGFR3 dans le cancer de la vessie) ; au niveau de l'apoptose en l'inhibant (MDM2 dans les sarcomes) ; ou encore au niveau du cytosquelette.

1.2.2 Les gènes supresseurs de tumeurs

Inversement, les gènes supresseurs de tumeurs sont impliqués dans la formation de tumeurs par une perte de leur fonction. Dans une cellule normale, ces gènes codent généralement pour des protéines qui inhibent la prolifération cellulaire et une seule copie de ces gènes peut avoir un rôle préventif contre le développement tumoral (inexact pour p53).

Les gènes supresseurs de tumeurs peuvent agir : au niveau de l'apoptose, avec un rôle pro-apoptotique ; au niveau de la prolifération en la contrôlant ; au niveau de la longévité cellulaire. Parmi les gènes supresseurs de tumeurs on peut citer : p53, facteur de transcription, qui en réponse à des dommages à l'ADN ou à des anomalies dans le cycle cellulaire va induire l'arrêt du cycle ou activer l'apoptose ; RB, qui joue le rôle de « frein » dans la division cellulaire en bloquant le cycle cellulaire ; p16INK4a, une kinase cycline-dépendant qui contrôle également le cycle cellulaire via RB et l'apoptose en séquestrant MDM2 responsable de la dégradation de p53.

Il est à noter l'importance de la machinerie impliquée dans la réparation de l'ADN, car les cellules qui perdent la capacité à réparer les dommages à l'ADN accumulent des mutations dans de nombreux gènes, dont ceux qui contrôlent la prolifération cellulaire et la croissance. Cependant, certaines études ont montré l'importance du bon fonctionnement, voir même de la sur-expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN dans les tumeurs agressives [Kauffmann et al., 2008] suggérant ainsi que bien qu'étant tumorales, ces cellules doivent présenter un génotype stable.

Étant donné qu'une seule copie d'un gène supresseur de tumeur est suffisante pour contrôler la prolifération cellulaire, les deux allèles doivent être perdus ou inactivés pour induire un phénotype tumoral. Les mutations perte de fonction conduisant à des phénotypes tumoraux sont donc des mutations récessives. C'est pourquoi des gènes supresseurs de tumeurs ont été identifiés dans des formes familiales de cancer comme RB dans le rétinoblastome.

1.3 Caractéristiques des cellules cancéreuses

Nous venons de voir que les cellules pour devenir cancéreuses subissent une accumulation de mutations au niveau de gènes clés qui contrôlent bon nombre de mécanismes de régulation. Chaque type cellulaire et cancer associé présente une combinaison de mutations différentes. Cependant, Hanahan et Weinberg [Hanahan and Weinberg, 2000] ont montré que malgré ces différences de mutations, la majeure partie des cellules cancéreuses, si ce n'est toutes, présentent six modifications essentielles pour devenir malignes (Fig. 1.2.A). En 2011 [Hanahan and Weinberg, 2011], avec l'ensemble des recherches effectuées sur les différents types de cancers, ils ont enrichi cet ensemble de caractéristiques par deux autres altérations générales que doivent acquérir les cellules tumorales et deux autres particularités nécessaires liées (Fig. 1.2.B).

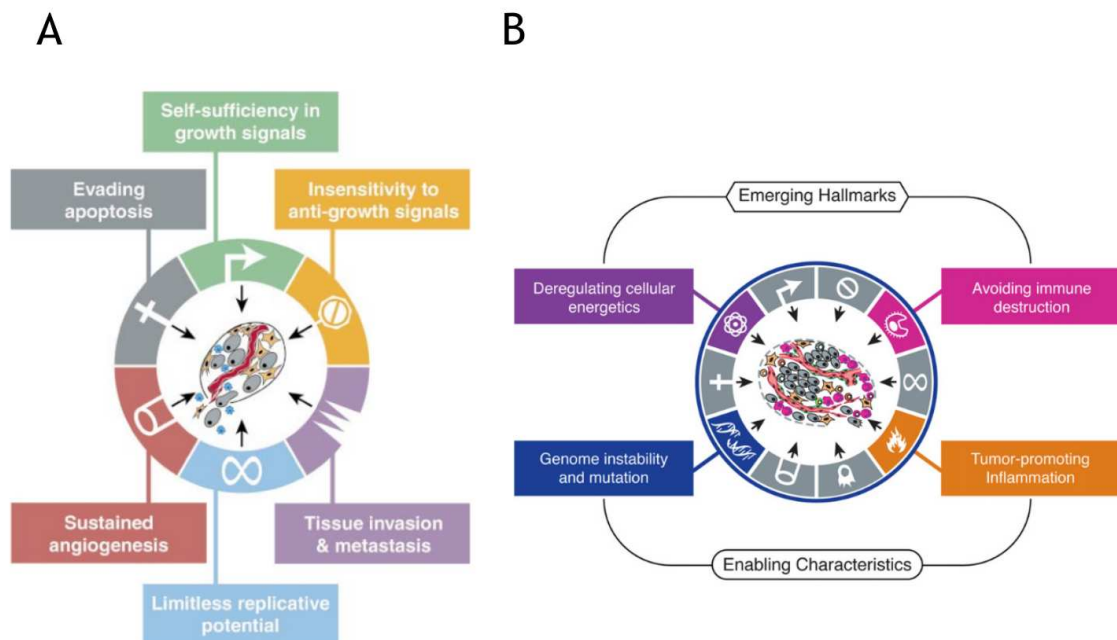


FIG. 1.2: Caractéristiques des cellules cancéreuses proposées par Hanahan et Weinberg. **A-** Capacités acquises dans les cellules cancéreuses [Hanahan and Weinberg, 2000]. **B-** Caractéristiques émergentes [Hanahan and Weinberg, 2011]

Nous allons dans cette partie décrire ces différentes caractéristiques.

1.3.1 Perte de contrôle au niveau du cycle cellulaire

1.3.1.1 Indépendance vis-à-vis des signaux stimulants la prolifération cellulaire

Les cellules normales nécessitent l'activation de récepteurs membranaires par la liaison de leur ligand (facteurs de croissance) pour pouvoir passer d'un état quiescent à un état prolifératif. Les cellules tumorales sont capables d'activer ces voies de manière constitutive. Cette indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance a été la première caractéristique clairement identifiée dans les cellules tumorales à cause du grand nombre

d'oncogènes décrits dans ce contexte. Trois stratégies peuvent être citées pour rendre les cellules cancéreuses indépendantes aux signaux de croissance : l'altération des signaux de croissance extra-cellulaires ; l'altération des transducteurs de ce signal ; l'altération des circuits qui traduisent ces signaux en action.

De nombreuses cellules cancéreuses acquièrent la capacité à synthétiser elles-mêmes des facteurs de croissance créant ainsi une boucle de contrôle positive. La synthèse de PDGF et de TGF β par les glioblastomes et les sarcomes en sont un exemple.

Les récepteurs membranaires envoient ces signaux principalement grâce à une activité tyrosine kinase dans leur domaine cytoplasmique. Ils peuvent être sur-exprimés et donc être hypersensibles aux facteurs de croissance environnants. Dans les tumeurs de l'estomac, du seins ou du cerveau, il a été décrit une sur-expression de EGFR [Salmon et al., 1998; Yarden and Ullrich, 1988]. Cette sur-expression de récepteurs membranaires peut également entraîner une transduction du signal indépendamment d'une fixation ligand/récepteur. Cette transduction indépendante peut également être due à une modification structurale du récepteur le rendant ainsi constitutivement actif.

Des mutations somatiques sont observées dans de nombreux cancers entraînant une activation constitutive des circuits normalement activés par la fixation de facteurs de croissance sur les récepteurs. Il a par exemple été montré une mutation BRAF dans 40% des mélanomes cutanés activant ainsi la voie de signalisation des protéines MAP-kinases [Davies and Samuels, 2010]. Inversement, l'activation constitutive de certaines voies de signalisation peut être la conséquence d'une boucle de régulation négative. En effet, une mutation perte de fonction dans la protéine PTEN amplifie la voie de signalisation PI3K et induit la tumorigénèse dans plusieurs modèles de cancer [Jiang and Liu, 2009].

1.3.1.2 Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs

Dans un tissu normal, son homéostasie est régulée pour avoir autant de cellules nouvelles que de cellules qui meurent. Les inhibiteurs de croissance permettent de réguler la division cellulaire et ainsi maintenir un nombre constant de cellules dans les tissus. Une grande partie des gènes suppresseurs de tumeurs permettent de réguler la croissance cellulaire et leur prolifération. Parmi ces gènes nous pouvons citer le gène codant pour la protéine RB et celui codant pour la protéine TP53 qui sont des protéines centrales dans la régulation du cycle cellulaire.

RB bloque la prolifération par le biais de E2F, facteur de transcription qui contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans le passage G1 en phase S [Calzone et al., 2008]. Une dérégulation dans la voie de signalisation de RB permet de libérer E2F et permet la prolifération cellulaire en rendant les cellules insensible aux facteurs anti-prolifératifs. De nombreux mécanismes peuvent entraîner des dysfonctionnements dans cette voie de signalisation et ainsi aider au développement de néoplasme.

L'anti-oncogène p53 participe au maintien de la stabilité du génome en contrôlant également l'expression d'une collection de gènes régulateurs du cycle cellulaire et de la mort cellulaire programmée. Cette protéine est également fréquemment altérée dans les cellules tumorales.

Il est à noter que des souris délétées pour RB ou p53 se développent normalement et présentent des néoplasmes que tardivement. Ce qui met en évidence l'action de mécanismes alternatifs qui agissent de manière redondante et qui servent à limiter la répllication inappropriée des cellules dépourvues de ces deux anti-prolifératifs clés.

1.3.2 Fabrication de la masse tumorale

1.3.2.1 Prolifération illimitée

Les cellules normales ont une capacité limitée à se diviser en culture. Cette limite de prolifération causée par l'accumulation des divisions cellulaires est associée à deux processus : la sénescence, qui correspond à l'entrée dans un état irréversible non prolifératif mais viable ; la crise des télomères qui conduit à la mort cellulaire. Échapper à la sénescence et devenir immortel constitue une étape dans la tumorigenèse que la plupart des cellules cancéreuses doivent franchir pour poursuivre leur prolifération (Fig. 1.3).

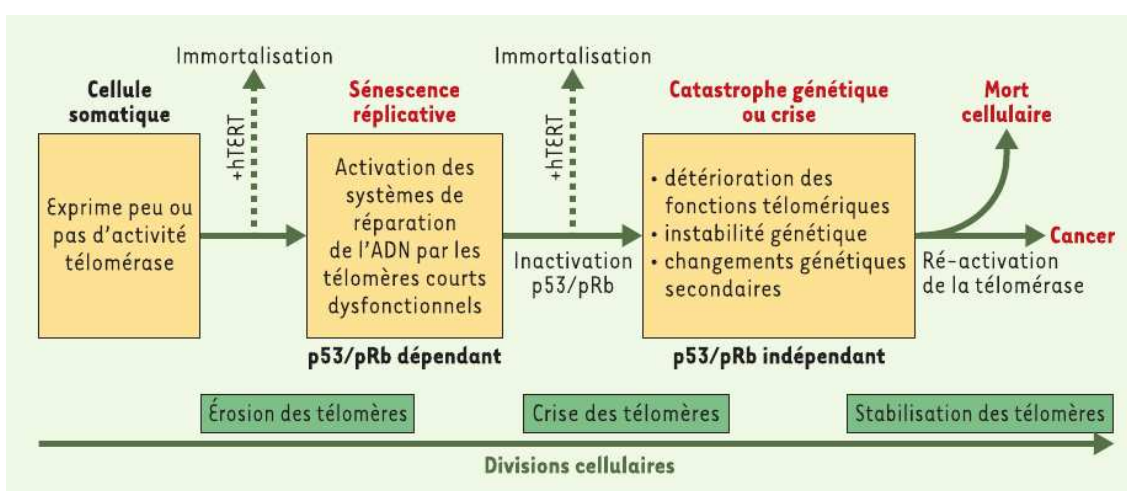


FIG. 1.3: La sénescence et la crise : barrières à la prolifération cellulaire illimitée.

La réplication d'un chromosome s'accompagne d'un raccourcissement progressif des répétitions télomériques en l'absence de mécanisme spécifique de compensation. Le raccourcissement des télomères au-dessous d'une taille critique dans les cellules humaines primaires cultivées *in vitro* conduit à la sénescence, une barrière à la prolifération dépendante de p53 et pRb. L'inactivation de p53 et pRb permet aux cellules d'échapper à la sénescence et de continuer de se diviser. Les divisions forcées de ces cellules vont encore diminuer la taille de leurs télomères et accroître ainsi l'instabilité génétique. Puis la prolifération de ces cellules est limitée par une deuxième barrière proliférative, la crise ou catastrophe génétique, caractérisée par une forte instabilité chromosomique et par une mort cellulaire massive. La crise des télomères commence à la sénescence et se poursuit pendant de nombreuses divisions cellulaires, jusqu'à ce que la fonction télomérique soit restaurée. La stabilisation, voire l'allongement de la longueur des télomères sont requis pour le processus de cancérisation après la crise.

Figure et Légende d'après [Gire, 2005]

Lors de la division cellulaire, la duplication des chromosomes s'accompagne d'un raccourcissement progressif des répétitions télomériques. À partir d'une certaine taille critique, une barrière à la prolifération dépendante de p53 et RB conduit à la sénescence des cellules. L'inactivation de p53 et RB est nécessaire pour permettre aux cellules d'échapper à la sénescence et de continuer à se diviser. La taille des télomères continue de diminuer et donc l'instabilité génétique augmente ce qui engendre une deuxième barrière, la crise des télomères. Cette crise commence à la sénescence et se poursuit pendant de nombreuses divisions cellulaires, jusqu'à ce que la fonction télomérique soit restaurée. La plupart des cellules cancéreuses réexpriment une activité télomérase qui

stabilise la longueur de leurs télomères et les cellules échappent au contrôle normal de la sénescence et deviennent immortelles.

Certaines cellules cancéreuses ont gardé la propriété d'entrer en sénescence et de nombreuses approches de thérapie anticancéreuse visent actuellement à reproduire les signaux télomériques de la sénescence pour inhiber la croissance des tumeurs [Shay and Roninson, 2004]. Les cellules sénescents mêmes si elles ne se divisent pas restent métaboliquement active et produisent des facteurs sécrétés qui peuvent stimuler la croissance des cellules du microenvironnement tumoral. La sénescence aurait cependant des effets secondaires néfastes en contribuant aux dérèglements progressifs associés au vieillissement [Kim et al., 2002].

1.3.2.2 Résistance à la mort cellulaire

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, sert de barrière au développement de cancer. La machinerie apoptotique est composée de régulateurs en amont et d'effecteurs en aval. Parmi les régulateurs, il y a ceux qui répondent aux signaux externes (Fas ligant / récepteur) et ceux qui répondent aux signaux d'origine intracellulaire tels que les dommages à l'ADN, des déséquilibres dans les voies de signalisation dus à l'activation d'oncogènes ou encore des phénomènes d'hypoxie. Le déclenchement de l'apoptose s'effectue grâce à la transmission du signal entre les régulateurs et les effecteurs par des membres pro- ou anti-apoptotique (Bax, Bak ou Bcl-2 respectivement). Les effecteurs finaux sont les caspases (8 et 9).

Une résistance au mécanisme d'apoptose peut être acquise par les cellules cancéreuses de différentes manières. La plus commune est la perte d'un régulateur pro-apoptotique comme le gène suppresseur de tumeur p53. L'inactivation de p53 est observée dans plus de 50% des tumeurs et résulte en l'inactivation d'un élément clé dans la détection de dommages à l'ADN [Harris, 1996].

Alternativement, les stratégies pour résister au phénomène d'apoptose peuvent être l'augmentation de facteurs anti-apoptotique comme Bcl-2 ou des signaux de survie comme IGF1/2.

Parallèlement au phénomène d'apoptose, l'autophagie représente un bon mécanisme d'homéostasie cellulaire et est impliquée à la fois dans la survie des cellules tumorales et dans leur mort. Les cellules cancéreuses présentent généralement une capacité autophagique plus réduite que les cellules normales. La voie de signalisation impliquant PI3K, AKT et les kinases mTOR activée par des signaux de survie et donc qui bloque l'apoptose, bloque également l'autophagie. L'autophagie peut être un mécanisme pro-tumoral en permettant la survie des cellules exposées à des variations de leur microenvironnement telle que l'hypoxie ou les carences nutritionnelles. Ce mécanisme peut également avoir un rôle anti-tumoral de par son implication dans la réduction de l'instabilité chromosomique, de la prolifération et de l'inflammation des cellules tumorales. Le processus autophagique est induit en réponse à divers traitements anti-cancéreux. Cette réponse peut s'avérer être un mécanisme permettant la survie des cellules, ou favorisant et amplifiant la mort induite par ces traitements.

Par opposition à l'apoptose, on peut également évoquer la mort par nécrose. Pendant l'apoptose, les cellules mourantes se contractent sur elles-mêmes et sont absorbées par les cellules voisines, les cellules nécrotiques pour leur part, explosent et relarguent leur contenu dans leur microenvironnement. Bien que la nécrose soit généralement considérée comme un processus aléatoire et non contrôlé, il apparaît que la mort cellulaire par

nécrose est clairement sous contrôle génétique dans certaines circonstances [Galluzzi and Kroemer, 2008]. Ces cellules peuvent libérer des agents tel que IL-1 α qui aiderait les cellules viables environnantes à proliférer. Ce phénomène de nécrose, en apparence bénéfique pour l'homéostasie cellulaire pourrait donc dans le cas de néoplasme servir à stimuler la survie des cellules de la tumeur par relargage de facteurs de croissance dans le microenvironnement.

1.3.3 Maintien de la masse tumorale

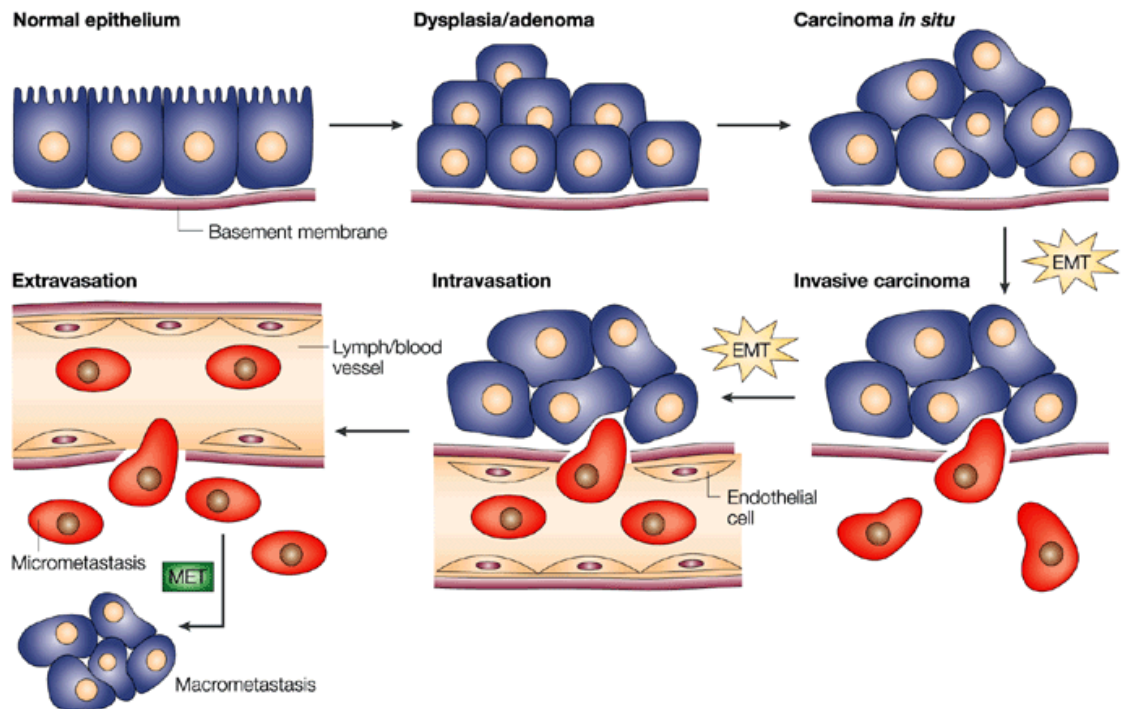
Les vaisseaux sont indispensables à la survie des cellules pour leur apporter oxygène et nutriments et évacuer les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone. L'angiogénèse est indispensable pendant l'embryogénèse. Elle est active de façon transitoire chez un adulte lors de blessure ou pendant le cycle reproducteur féminin. Par contre, durant la progression tumorale l'angiogénèse est toujours active permettant la croissance des néoplasmes [Hanahan and Folkman, 1996]. Respectivement, le VEGFA (vascular endothelial growth factor A) et la TSP1 (thrombospondin 1) sont les acteurs les plus connus dans l'induction et l'inhibition de l'angiogénèse. Ce phénomène est une caractéristique importante des cellules tumorales car au départ on pensait que l'angiogénèse était nécessaire seulement pour la croissance des grosses tumeurs, cependant il s'avère qu'elle est induite très tôt dans le processus tumoral et contribue également à la croissance de néoplasmes microscopiques pré-malins.

Dans certaines tumeurs la sur-expression des oncogènes RAS ou MYC entraîne la sur-expression de facteurs angiogéniques alors que dans d'autres cette sur-expression est induite par des cellules du système inflammatoire. Les inhibiteurs endogènes de l'angiogénèse qui modulent l'aspect transitoire de ce processus en condition normale doivent également jouer le rôle de barrière à l'induction ou la persistance de l'angiogénèse par les néoplasmes naissants.

1.3.4 Activation du potentiel invasif et migratoire

Pendant le développement de nombreux types de cancer, les cellules de la tumeur primaire envahissent les tissus adjacents et des sites distants. Ces colonies distantes, les métastases, sont la cause de 90% des décès par cancer. Le mécanisme sous-jacent à l'invasion et au potentiel métastatique est resté longtemps une énigme même si des modifications de formes et des problèmes d'adhérence cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire sont des caractéristiques évidentes des cellules tumorales. La perte de E-cadherin, facteur clé dans l'adhésion cellulaire est une des altérations qui apparaît centrale tout comme l'activation des protéases extracellulaires, les molécules d'adhésion cellules-cellules et les intégrines.

Les recherches sur les mécanismes d'invasion et de migration des cellules tumorales ont principalement avancé ces dix dernières années. Elles se basent sur un processus décrit pendant le développement embryonnaire chez de nombreuses espèces et permet aux cellules de migrer vers les organes en formation, il s'agit de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Il a fallu du temps avant que l'EMT soit considérée comme un mécanisme potentiel de la progression des carcinomes (Fig. 1.4) car il est difficile à reconnaître sans ambiguïté à cause de la grande diversité d'organisation cellulaire observée dans les tumeurs humaines [Thiery, 2002].



Nature Reviews | Cancer

FIG. 1.4: Sites de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et transition mésenchymato-épithéliales (MET) et la progression des carcinomes.

Les épithéliums normaux sont bordés par une membrane basale et peuvent proliférer localement pour donner naissance à un adénome. Des transformations ultérieures par des changements épigénétiques et génétiques conduisent à un carcinome *in situ*, toujours défini par une membrane basale intacte. Des modifications supplémentaires peuvent induire la diffusion locale des cellules de carcinome, éventuellement par une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), et la membrane basale est alors fragmentée. Les cellules peuvent alors atteindre les vaisseaux lymphatiques ou sanguins, permettant leur transport passif à des organes éloignés. Sur les sites secondaires, les cellules de carcinome peuvent former un nouveau carcinome grâce à une transition mésenchymateuse-épithéliales (MET).

Figure et Légende d'après [Thiery, 2002]

Un ensemble de facteurs de transcription tel que Snail, Slug, Twist et Zeb1/2 organisent l'EMT pendant l'embryogénèse. Ces facteurs de transcription ont été décrits comme importants dans l'invasivité de modèles de carcinomes [Yang and Weinberg, 2008].

Une fois le site distant atteint, les cellules doivent retrouver leur état non invasif. Ainsi, les cellules de carcinome qui ont subi une EMT pendant l'invasion initiale et la dissémination métastatique peuvent passer par le processus inverse, dit de transition mésenchymato-épithéliales (MET).

Même si la recherche a bien progressé, il reste des questions sans réponse dans le développement métastatique. Nous ne savons pas quand et où les cellules tumorales acquièrent la capacité à coloniser des tissus extérieurs ni pourquoi elles se développent dans tel ou tel organe.

1.3.5 Reprogrammation du métabolisme

Les cellules tumorales doivent adapter leur métabolisme énergétique afin de soutenir leur prolifération.

En condition aérobie, les cellules normales passent par la phosphorylation oxydative dans les mitochondries pour produire de l'adénosine 5'-triphosphate (ATP). Le glucose est transformé en pyruvate par la glycolyse dans le cytosol puis en dioxyde de carbone dans les mitochondries, avec une production minimale de lactate. En condition anaérobie, la glycolyse est favorisée et relativement peu de pyruvate est expédié vers les mitochondries [Heiden et al., 2009].

Otto Warburg a été le premier à constater le métabolisme énergétique anormal des cellules cancéreuses [Warburg et al., 1924]. Celles-ci tireraient principalement leur énergie de la fermentation anaérobie du glucose (glycolyse anaérobie) et par conséquent la présence d'oxygène ne serait pas nécessaire à leur développement. Les cellules cancéreuses produisent une grande partie de leur énergie par glycolyse, même en présence d'oxygène. Elles produisent une grande quantité de lactate indépendamment de la disponibilité d'oxygène, un état appelé glycolyse aérobie.

La glycolyse est moins efficace pour produire de l'ATP par rapport à la phosphorylation oxydative mais les cellules cancéreuses choisissent ce type de production d'énergie car leurs besoins ne se limitent pas à l'ATP. En effet, la réplication cellulaire nécessite de grandes quantités de nucléotides, d'acides aminés et de lipides [Heiden et al., 2009]. Donner la priorité à la glycolyse permet l'exploitation des intermédiaires glycolytiques nécessaires dans les différentes voies de biosynthèse lors de la formation de nouvelles cellules.

L'effet Warburg étant accompagné d'un excès de lactate, une hypothèse est que les cellules tumorales sont hétérogènes quant à leur métabolisme et certaines utilisent ce lactate comme carburant pour la phosphorylation oxydative [Sonveaux et al., 2008].

Les mécanismes utilisés par les cellules tumorales pour passer de la phosphorylation oxydative à la glycolyse reposent sur plusieurs processus. Un des mécanismes potentiels repose sur la sur-expression de transporteurs de glucose comme GLUT1 ce qui permet d'augmenter la quantité de glucose dans le cytoplasme.

La régulation de l'activité mitochondriale implique l'activation d'oncogènes comme RAS ou MYC et du gène suppresseur de tumeur p53. Il a été montré que RAS régule HIF1A, modulateur potentiel du lien entre glycolyse et phosphorylation oxydative, qui supprimerait l'activité des mitochondries dans les cellules tumorales [Gogvadze et al., 2008].

1.3.6 Microenvironnement et système immunitaire

Ces dernières années, la recherche a montré toute l'importance du microenvironnement des cellules tumorales dans la formation et la progression des néoplasmes. Pour la grande majorité des cancers, ces données suggèrent que l'on ne doit plus considérer ce phénomène sur des cellules individuelles mais plutôt sur des tissus composés de différents types cellulaires et dont les cellules hôtes jouent un rôle majeur à la manière d'un système complexe (Fig. 1.5).

Ce microenvironnement tumoral est composé de la matrice extracellulaire et de différents types cellulaires tel que des fibroblastes, des adipocytes, des cellules endothéliales et des cellules du système immunitaire (granulocytes, lymphocytes, macrophages,

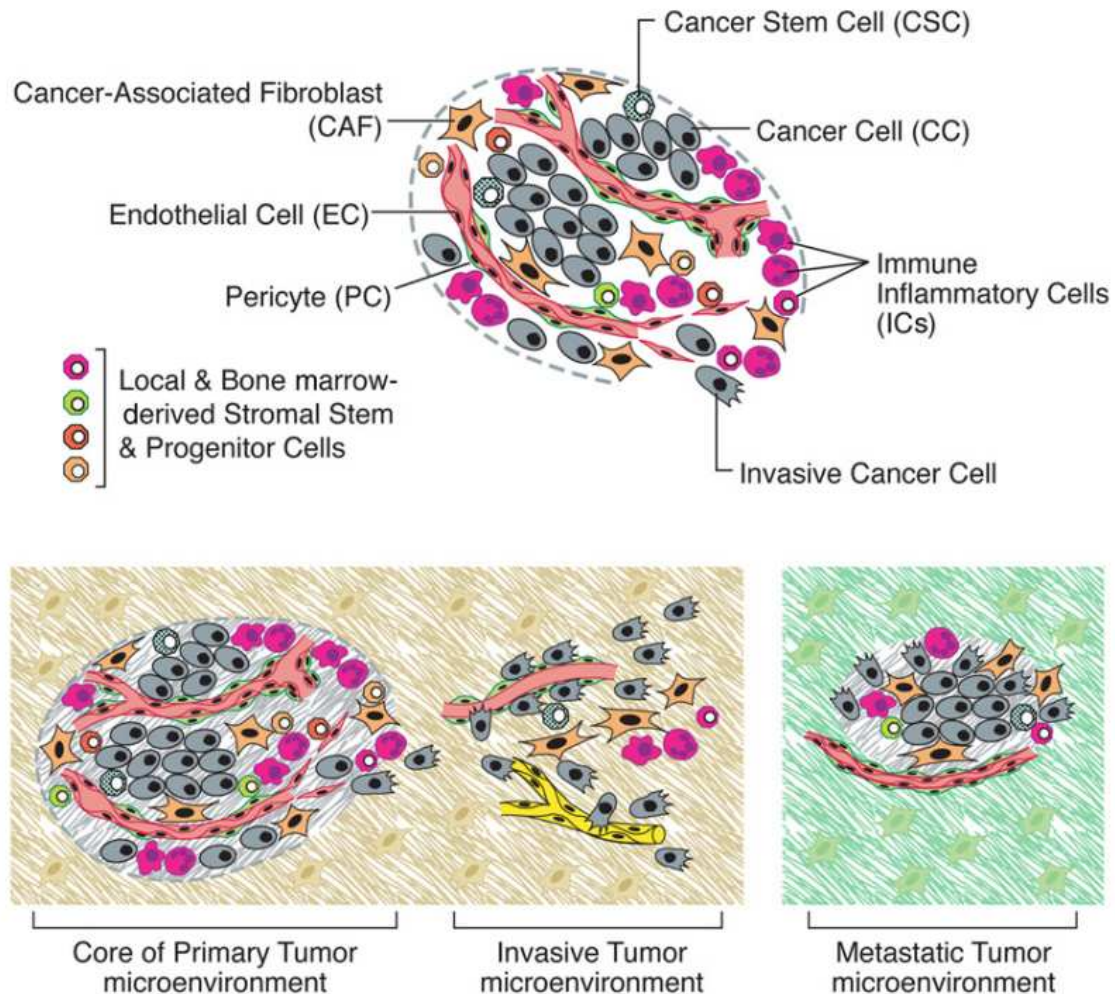


FIG. 1.5: Les cellules du microenvironnement tumoral.

En haut- Un assemblage de types cellulaires distincts constitue la plupart des tumeurs solides. Le parenchyme et le stroma des tumeurs contiennent des types cellulaires différents et des sous-types cellulaires qui permettent la croissance et la progression tumorale. Notamment, les cellules immunitaires inflammatoires présentes dans les tumeurs peuvent à la fois inclure des cellules qui induisent la tumeur et d'autres qui la tue.

En bas- Les microenvironnements distincts des tumeurs. Les différents types de cellules stromales créent une succession de microenvironnements tumoraux qui varient au fur et à mesure que les tumeurs envahissent les tissus normaux et par la suite s'implantent et colonisent les tissus éloignés. L'abondance, l'organisation histologique, et les caractéristiques phénotypiques des cellules stromales, ainsi que de la matrice extracellulaire (fond hachuré), évoluent pendant la progression, permettant ainsi la croissance primaire et métastatique ainsi que l'invasion. Les cellules normales environnantes des sites primaires et métastatiques, affectent probablement aussi le caractère varié des microenvironnements néoplasiques. Légende et figure d'après [Hanahan and Weinberg, 2011]

cellules dendritiques). Ce microenvironnement forme avec les cellules tumorales un réseau d'interactions complexes où les communications s'effectuent grâce à des molécules

sécrétées ou membranaires. Des études ont montré l'importance de ce microenvironnement tumoral dans la formation et le développement des néoplasmes alors que d'autres ont montré un effet bénéfique dans le pronostic.

Les cellules immunitaires occupent une grande place dans le stroma tumoral mais leur rôle dans le développement tumoral n'est pas encore bien établi. Une des premières interrogations concerne son activation. En effet, comparé à un agent pathogène classique, les cellules tumorales ne présentent pas d'antigène étranger à leur surface (hormis pour les cancers viro-induits), ni de modification membranaire pouvant alerter le système immunitaire. Des études ont montré que les altérations génétiques nécessaires à la transformation néoplasique pouvaient jouer un rôle sur l'environnement tumoral [Eng et al., 2009]. La seconde interrogation concerne son incapacité à détruire les cellules tumorales. Plusieurs hypothèses peuvent être émises : soit les cellules tumorales sont capables d'échapper au système immunitaire [Mantovani et al., 2008], soit elles le bloquent, soit celui-ci est activé trop tardivement et les cellules sont déjà invasives [Ochsenbein, 2005]. Dans ce cas, l'immunogénicité des cellules tumorales pourrait être restaurée par des traitements de chimiothérapie ou radiothérapie [Tesniere et al., 2008]. Il a tout de même été montré que la croissance tumorale pouvait être inhibée par la réponse immunitaire. En effet, une abondance de lymphocytes T dans le stroma a été associée à un meilleur pronostic dans certains types de cancer comme le mélanome [van Houdt et al., 2008] ou d'autres types de cancer [Pagès et al., 2010].

Ces dernières années, il a également été montré que l'activation du système immunitaire pouvait avoir l'effet paradoxal de faciliter la tumorigénèse en relargant dans l'environnement tumoral des molécules permettant la croissance des cellules cancéreuses [Qian and Pollard, 2010; DeNardo et al., 2010], comme le facteur de croissance EGF, le facteur de croissance angiogénique VEGF, ou encore des enzymes de dégradation de la matrice extra-cellulaire comme les métalloprotéinases [Qian and Pollard, 2010].

Cette existence non intuitive de cellules immunitaires pro- et anti-tumorales peut être rationalisée par l'explication des différents rôles du système immunitaire. Ce système, détecte d'un côté les agents infectieux à éliminer et d'un autre est impliqué dans la cicatrisation des plaies et le nettoyage des cellules mortes et des débris cellulaires. Ces actions sont effectuées par différentes catégories de cellules immunitaires qui sont les macrophages conventionnels et les neutrophiles, et des sous-classes de macrophages activés, des neutrophiles et des progéniteurs myéloïdes. Ces dernières sont les sources majeures de relargage de facteurs de croissance, angiogéniques, épithéliaux et d'enzymes de remodelage, indispensables pour la cicatrisation. De la même façon des sous-classes de lymphocytes B et T peuvent faciliter le recrutement et l'activation de tels macrophages et neutrophiles [Hanahan and Weinberg, 2011].

Heureusement, d'autres lymphocytes T et B et macrophages jouent un rôle dans la destruction des tumeurs.

Chapitre 2

Les technologies haut débit dans l'étude des cellules tumorales

2.1 Introduction

Depuis la fin des années 1970, où les premiers oncogènes ont été découverts [Stehelin et al., 1976; Roussel et al., 1979], les techniques d'analyses en biologie moléculaire ont incroyablement évolué. En effet, à partir des années 1990, les techniques dites « haut débit », ont fait leur apparition. Ces technologies permettent ainsi de rechercher des variations sur des milliers de gènes simultanément et donc de pouvoir réaliser des études de génome entier. La technologie des biopuces peut-être appliquée dans différents domaines [Hoheisel, 2006] tel que ADN, ARN, protéines, etc

Dans cette présentation nous nous concentrerons sur les puces à ADN et notamment celles qui permettent d'étudier le génome et ainsi rechercher entre autre le nombre de copie d'ADN et celles qui permettent d'étudier le transcriptome et mesurer l'activité transcriptionnelle dans les cellules étudiées. Depuis leur création, les puces à ADN ont elles aussi bien évoluées, principalement en terme de taille, de résolution et de supports utilisés (membrane de nylon, de verre, de plastique ou de silicium), mais le principe sous-jacent est le même. Cette technologie repose sur le principe de l'hybridation moléculaire décrite par Southern [1975] qui est à la base du *southern blot*. Sur les biopuces, les sondes, choisies pour être spécifiques d'un locus donné sur le génome ou d'un transcript, sont amplifiées et fixées sur un support solide miniature (Fig. 2.1). Les cibles (ici



FIG. 2.1: Exemple d'une puce Affymetrix®

ADN ou ARN) sont extraites des cellules tumorales étudiées, marquées puis hybridées

sur la puce. Une séquence d'ADN donnée ou un transcript, si présent dans l'échantillon étudié, va se fixer sur les sondes correspondantes. Le signal est ensuite quantifié par fluorescence ou marquage radioactif. Au vu du nombre de sondes pouvant être fixées sur le support (plusieurs millions pour les dernières générations de puces), ces technologies haute densité représentent des outils performants dans l'étude des cancers par le criblage de génome entier.

Dans ce chapitre, nous allons détailler les différentes technologies de puces et l'ensemble des altérations qu'il est possible d'étudier au niveau génome et transcriptome.

2.2 Principe général

On distingue deux grands types de puces à ADN : les puces par dépôt et les puces à oligonucléotides synthétisés *in situ* qui diffèrent dans la manière où les sondes sont déposées sur la puce. Il existe également un troisième type de puce où les sondes sont fixées sur des microbilles. Parmi ces différents types de puces, on peut ensuite différencier celles qui permettent d'analyser deux échantillons co-hybridés (et sont donc des puces à deux canaux de fluorescence) et celles à un seul canal où un échantillon à la fois peut être analysé.

2.2.1 Les puces à ADN par dépôt

Les sondes présentes sur ces puces peuvent être des oligonucléotides, des cDNA ou encore des fragments de PCR qui correspondent aux cibles d'intérêt. Les sondes sont synthétisées avant d'être déposées sur le support puis y sont fixées. Elles sont ensuite déposées et fixées sur le support à l'aide d'aiguilles dirigées par un bras robotisé. La grille de sondes ainsi obtenue est prête à être hybridée avec les ADNc des cibles extraites depuis les échantillons à étudier. Cette technique est largement utilisée car elle permet de produire des puces à façon selon les cibles d'intérêt. Les équipes de recherche peuvent choisir les sondes à étudier, les synthétiser et les fixer sur le support avec un coût moindre que les puces commerciales. L'expérience consiste à réaliser une hybridation compétitive (Fig. 2.2) entre les sondes de la puce et les cibles de deux conditions différentes marquées avec deux fluorochromes distincts (usuellement la cyanine 3 qui émet dans le vert et la cyanine 5 qui émet dans le rouge). Après lavage pour éliminer les cibles non hybridées, la puce est scannée deux fois pour mesurer les intensités de fluorescence pendant qu'un laser excite spécifiquement les deux fluorochromes dans leur longueur d'onde d'excitation. Les intensités de fluorescences associées à chaque sonde sont transformées en valeur numérique. Le rapport des intensités pour chaque sonde correspond au signal relatif des deux conditions entre elles afin d'identifier les gènes sur- ou sous-exprimés [Tang et al., 2007] par rapport à la condition de référence.

2.2.2 Les puces à ADN à oligonucléotides synthétisés *in situ*

Le terme oligonucléotides synthétisés *in situ* fait référence à la technique de fabrication de ces puces. En effet, ici les sondes sont produites directement sur le support solide de la puce. Les méthodes de synthèse et la longueur des sondes varient selon les fabricants. Les sondes peuvent être longues (environ 60-mer pour les puces Agilent) ou plus courtes (25-mer pour les puces Affymetrix). Plus les sondes sont longues plus elles

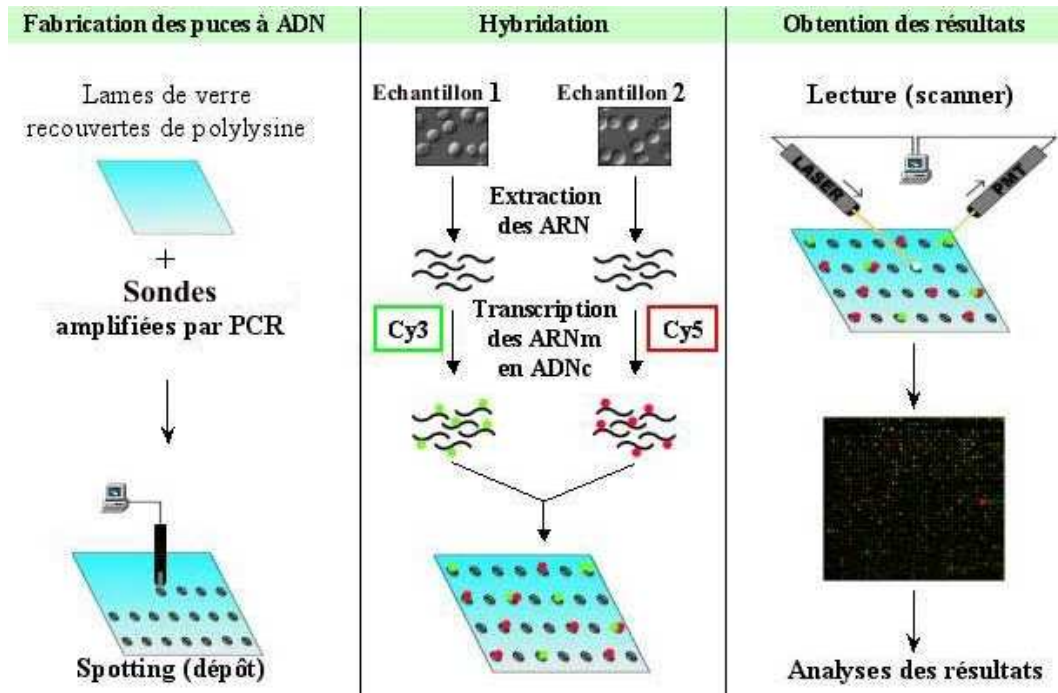


FIG. 2.2: Principe d'une puce à ADN par hybridation compétitive.

sont spécifiques d'un gène cible, plus les sondes sont courtes plus la densité de couverture est importante sur la puce et plus le coût de fabrication est moindre. La précision avec laquelle les sondes sont fixées sur le support permet de s'affranchir de la variabilité de la quantité de sondes déposées. Avec cette technologie, un seul échantillon marqué est déposé sur une puce et la lecture de l'intensité de fluorescence par un scanner est directement liée à la quantité de cibles présentes dans l'échantillon qui s'hybrident avec les sondes. Cependant cette mesure ne révèle pas une quantité absolue des cibles mais plutôt une quantité relative qu'il faut comparer aux autres gènes et autres conditions de l'expérience.

Un des plus gros avantages de cette technologie, mis à part la résolution, est la très bonne reproductibilité [Piper et al., 2002]. De plus, un échantillon aberrant ne peut affecter la totalité des données brutes de l'expérience puisqu'il ne sera pas co-hybridé sur une puce. Il suffira de le supprimer de l'analyse. En termes de limite, comparé aux puces à deux canaux de fluorescence, deux fois plus de puces sont nécessaires pour comparer des échantillons dans une expérience.

2.2.3 Les puces à ADN à microbilles (*Bead Chip*)

En 2002, la société Illumina développa une nouvelle technologie de puces pour l'analyse d'expression, le génotypage ou encore l'analyse de protéines. Leur technologie est basée sur des microbilles de silice d'environ 3 microns qui s'auto-assemblent de façon aléatoire dans des micro-puits sur l'un de leur deux substrats : faisceaux de fibres optiques ou plaque de silice plane (Fig. 2.3). Ces billes sont détenues dans les puits présents sur le support selon les forces de Van der Waals et des interactions hydrostatiques.

Chaque bille est recouverte de centaines de milliers de copies d'un oligonucléotide spécifique qui agissent comme des séquences de capture pour l'échantillon à analyser. En moyenne, une trentaine de billes représentent la même séquence. Chaque bille est marquée par un code barre lisible par un scanner afin de la localiser. Les billes sont donc assemblées aléatoirement sur le support et leur localisation est donc spécifique de chaque puce analysée. Cette répartition aléatoire des billes sur le support permet à cette technologie de s'affranchir des biais spatiaux pouvant être rencontrés avec les autres types de puces.

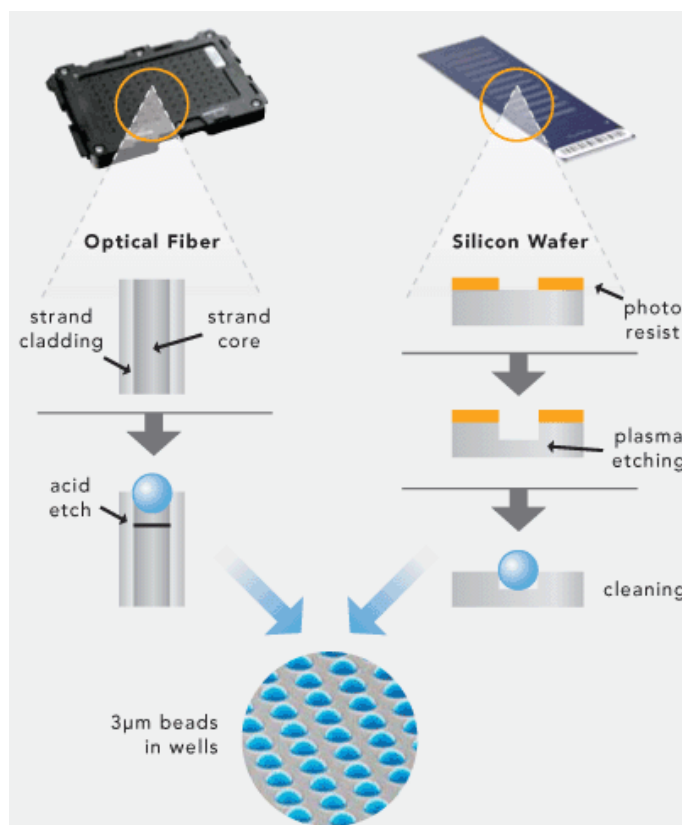


FIG. 2.3: La technologie des puces à microbilles (Bead Array) de la société Illumina. Les sondes sont ici fixées sur des microbilles qui sont distribuées aléatoirement sur le support de la puce.

2.3 Haut-débit et étude des cancers

Comme il a été décrit dans le chapitre 1, le développement d'une tumeur est un processus qui comporte plusieurs étapes et une seule altération génétique ne suffit pas en général pour aboutir à la transformation maligne. Les cellules cancéreuses continuent à accumuler des mutations qui leur confèrent de nouvelles propriétés. Les multiples altérations observées au niveau du génome de ces tumeurs entraînent des altérations d'expression des gènes (transcriptome) et bien entendu, des modulations du transcriptome ont des répercussions sur l'ensemble des protéines (protéome) de la cellule. Dans

ce contexte, les technologies haut-débit trouvent tout leur intérêt car elles permettent de réaliser des études à grande échelle sur les cellules tumorales et ainsi étudier l'ensemble des modulations possibles sans *a priori*. Le phénotype d'un individu résulte de la fonction des protéines en aval de l'expression de son génotype (Fig. 2.4). Les gènes codant pour des protéines sont transcrits en pré-ARN messagers qui sont eux-mêmes épissés afin d'être traduits en protéines. Certains gènes sont transcrits en ARN non codant comme les micro ARN qui contrôlent l'expression des gènes en s'appariant aux ARN messagers. Ils entraînent leur dégradation ou bloquent leur traduction en protéines.

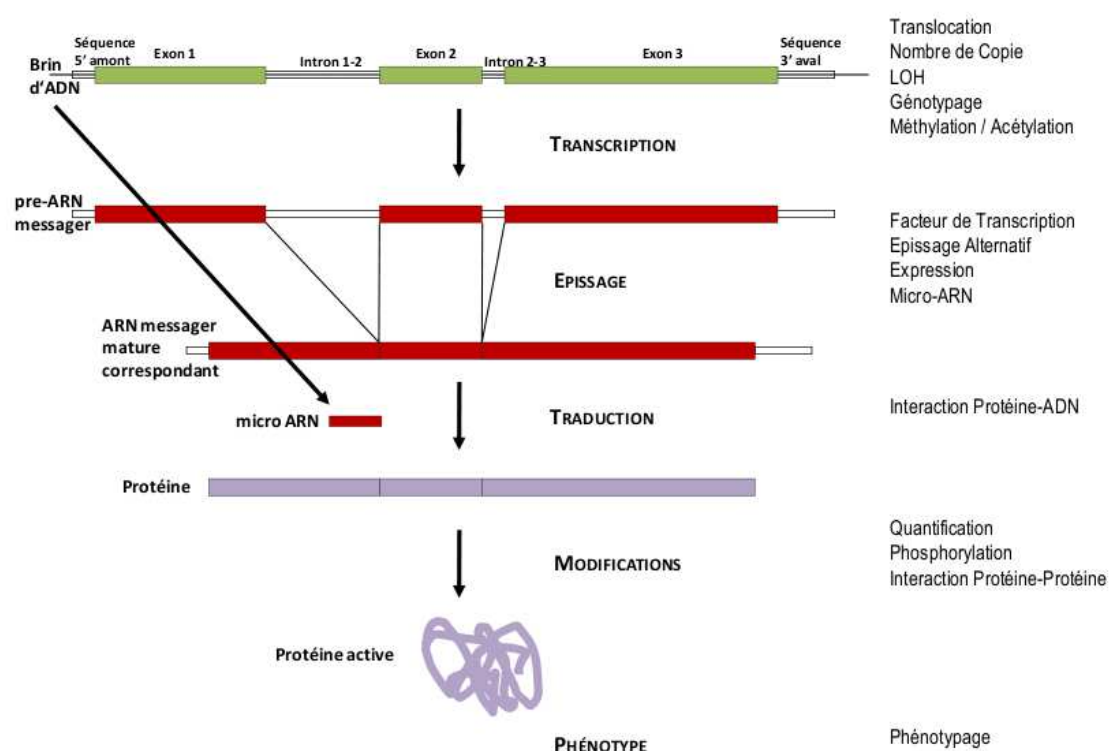


FIG. 2.4: Du gène à la protéine - Différents niveaux d'altération dans les cellules cancéreuses

Toutes ces étapes peuvent être altérées dans les cellules tumorales. La molécule d'ADN peut être modifiée par des mutations, des gains ou des pertes ou encore des anomalies de méthylation sur les histones changeant ainsi la conformation de la double hélice et l'accessibilité à la machinerie transcriptionnelle. Au niveau de la molécule d'ARN, la quantité de transcripts générés est régulée ainsi que les différents isoformes produits par épissage alternatif des pré-ARN. Au niveau protéique, outre la quantité, différentes modifications post-traductionnelles peuvent être dérégulées dans les cellules cancéreuses.

Comme nous allons le voir, la technologie des biopuces permet d'étudier à grande échelle les différentes étapes du passage de génotype à phénotype et joue donc un rôle majeur dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de cellules tumorales. Plus récemment, l'essor du séquençage nouvelle génération permet également de réaliser ces analyses à haut débit, mais avec un coût encore bien supérieur

pour le moment.

2.3.1 Étude au niveau de l'ADN

2.3.1.1 Analyse du nombre de copie

Il existe une relation étroite entre altération des profils génomiques et cellules tumorales. Il a été montré qu'il existe un lien direct entre l'analyse des gains et des pertes et le diagnostic des tumeurs [Bauer and Bastian, 2007] voire même dans le pronostic [Ali et al., 2010]. Des études ont également montré que la recherche de régions gagnées ou perdues permet également de mettre en évidence des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs comme acteurs clés dans l'acquisition de capacités tumorales [Hui et al., 2002; Ishizuka et al., 2002; Lassmann et al., 2007].

Différents types de puces permettent d'analyser ces altérations avec des résolutions plus au moins fines et nous décrivons plus en détail dans la partie 2.4 les puces CGH arrays et les puces SNP dans l'étude du nombre de copie d'ADN.

2.3.1.2 Polymorphismes

Chez l'homme, entre deux individus non apparentés, il existe des variations de séquence non pathologiques nommées polymorphismes. Ces polymorphismes peuvent être localisés dans des régions codantes ou non. Ils peuvent jouer un rôle dans divers mécanismes physiologiques et être à l'origine de la susceptibilité accrue d'individus à des maladies comme le cancer.

Parmi ces variations on peut distinguer les SNP pour Single Nucleotide Polymorphism qui constituent la forme la plus abondante de ces changements entre les individus et qui correspond à une modification au niveau d'un nucléotide et doit exister chez plus de 1% des individus. Ils sont présents toutes les 100 à 300 paires de bases. Dans les régions codantes, ces SNP peuvent modifier ou non (grâce à la redondance du code génétique) la protéine produite, et dans les régions non codantes, ces variations peuvent modifier les sites d'épissage, les séquences des ARN non codant ou encore les régions régulatrices.

Il existe également dans notre génome des séquences nucléotidiques répétées en tandem les unes à la suite des autres. Le nombre de répétition est extrêmement variable entre les individus d'où leur nom de VNTR (Variable Number of Tandem Repeat). On distingue les minisatellites qui sont des répétitions de motif de 10 à 60 paires des bases et les microsatellites qui sont des répétitions de motif de 1 à 6 paires de bases.

Enfin, il existe des séquences d'ADN répétées dispersées qui sont réparties sur l'ensemble du génome. Parmi ces séquences, on distingue les séquences SINE (Short Interspersed Elements) dont la longueur varie entre 130 et 500 pb et dont les plus fréquentes sont les séquences ALU, et les séquences LINE (Long Interspersed Elements) dont la longueur est de l'ordre du kilobase.

Les insertions de séquences ALU peuvent entraîner des troubles héréditaires et avoir toute leur importance dans l'étude des cancers. Le premier rapport entre des recombinaisons ALU et cancer date de 1995 lors d'une étude sur le cancer colorectal [Nyström-Lahti et al., 1995].

2.3.1.3 Méthylation

Outre des altérations du nombre de copies ou des mutations nucléotidiques, l'expression des gènes peut également être contrôlée par une régulation épigénétique. L'épigénétique peut être définie par l'ensemble des opérations qui modifie le profil d'expression des gènes sans changement dans la séquence nucléotidique. En effet, le contrôle de la structure de la chromatine (ADN + histones) influence l'expression génique. Pour être exprimés, les gènes doivent être localisés dans une région où la chromatine est décompactée afin de permettre la fixation de facteurs trans et ainsi activer la transcription. Lors d'une conformation en chromatine ouverte, l'ADN est hypo-méthylé au niveau des cytosines des îlots CpGs et s'enroule de façon lâche autour d'histones hyper-acétylés ce qui permet aux facteurs de transcription de se fixer et d'activer la transcription. En conformation chromatine fermée et donc blocage de la transcription, les histones sont hypo-acétylés et les îlots CpGs qui se trouvent dans les régions proximales des promoteurs pour une grande partie des gènes sont hyper-méthylés. Ces modifications chimiques se font grâce à différentes enzymes, les méthyltransférases, les déméthylases, ou encore les acétyltransférases et les déacétylases (Fig. 2.5). L'hyper méthylation de l'ADN peut être requis pour des cas particuliers comme l'inactivation du chromosome X chez les femmes ou encore pour protéger l'intégrité chromosomique dans des régions répétées. Il a également été montré que ces phénomènes épigénétiques pouvaient jouer un rôle dans le cancer [Kouzarides, 1999; Das and Singal, 2004]. L'hyper-méthylation de gènes suppresseurs de tumeurs pourrait rendre silencieux certains gènes cruciaux et une hypo-méthylation pourrait activer des gènes impliqués dans l'invasion et le processus métastatique.

La méthylation des îlots CpGs ne peut pas être mesurée par des sondes d'ADN complémentaires comme pour les autres puces décrites car ni la séquence d'ADN ni le nombre de copie d'ADN est directement modifié. Afin de rendre ces altérations mesurables, la technique la plus couramment utilisée, est de faire subir aux échantillons un traitement bisulfite préalable. Les amorces oligonucléotides inspectent les sites de méthylation des gènes putatifs dans l'ADN génomique traité au bisulfite. Le traitement au bisulfite du CpG non méthylé convertit la cytosine en uracile, tandis que les cytosines méthylées ne sont pas converties. Deux ensembles de sondes sont donc conçus pour chaque cible CpG. Un ensemble correspondant à la séquence non méthylée traitée au bisulfite (uracile) tandis que l'autre correspond à la séquence non traitée (5-méthylcytosine) [Bibikova et al., 2006].

Avec le développement du séquençage haut-débit, les puces ne sont plus les seules technologies qui permettent de faire de la recherche de régions hyper-méthylées ou hypo-méthylées sur génome entier [Bibikova and Fan, 2010].

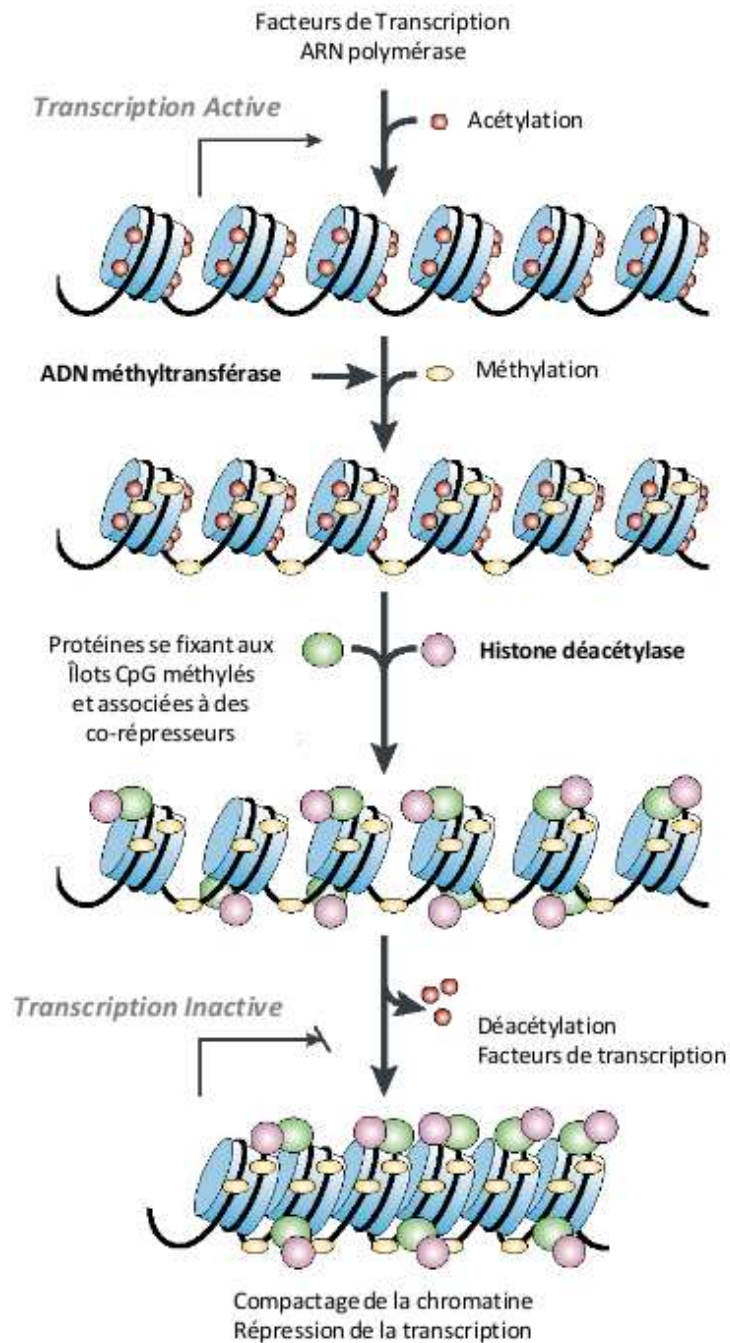


FIG. 2.5: Le contrôle de la transcription par la méthylation de l'ADN. Une région transcriptionnellement active ciblée pour devenir inactive est méthylée au niveau de l'ADN par l'action de méthyltransférases ce qui conduit au recrutement de protéines se liant aux îlots CpG méthylés associées à des co-répresseurs et des histones déacétylases (HDACs). Les histones déacétylés prennent une conformation plus compacte qui empêche la fixation des facteurs de transcription sur leur site. Figure et légende d'après [Robertson and Wolffe, 2000]

2.3.1.4 Fixation de régulateurs

La fixation de régulateurs trans dans les régions promotrices des gènes est indispensable au bon fonctionnement de la machinerie transcriptionnelle. La technique d'immunoprécipitation de la chromatine a été adaptée sur puce pour l'étude de génomes entier afin de pouvoir identifier de nouveaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de gènes cibles [Ren et al., 2000]. La technique de *ChIP-on-chip* pour Chromatine ImmunoPrécipitation sur puce peut-être divisée en deux grandes étapes. La première pour l'immunoprécipitation de la chromatine, où les protéines sont fixées *in vivo* par liaison covalente à l'ADN à l'aide de formaldéhyde ; l'ADN est ensuite extrait et découpé ; les fragments associés à la protéine étudiée sont sélectionnés grâce à un anticorps ; après lavage de l'excédent les complexes protéine-ADN sont dénaturés. La deuxième étape consiste à hybrider les fragments d'ADN sélectionnés sur puces afin de les identifier (Fig. 2.6).

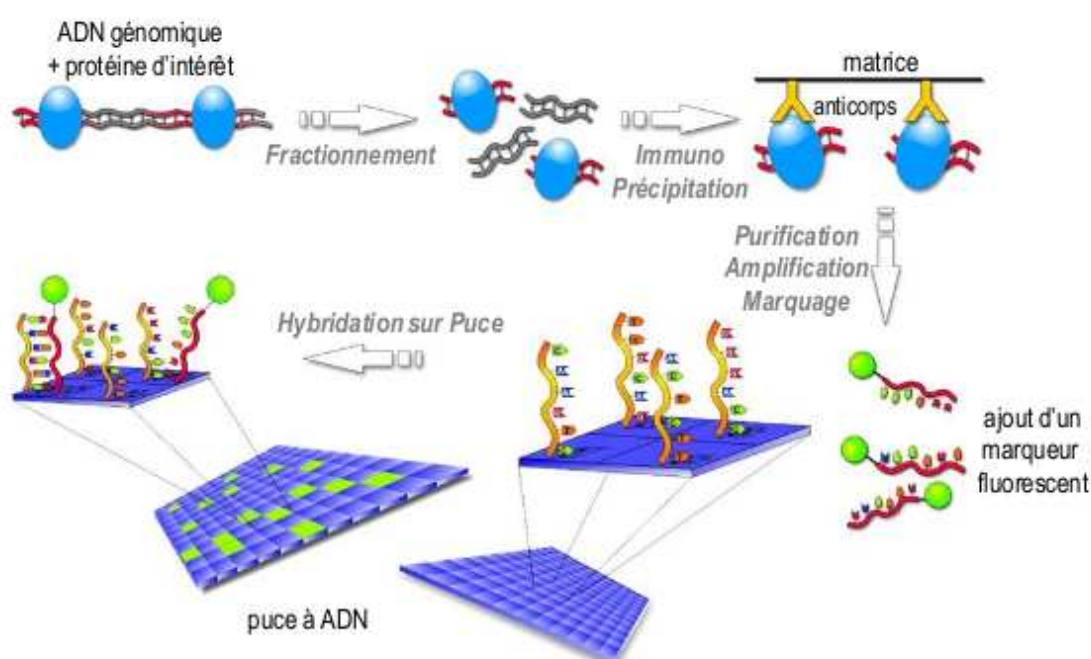


FIG. 2.6: Schéma représentant les différentes étapes de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine sur puce.

Les protéines sont liées de façon covalente à l'ADN (avec du formaldéhyde), l'ADN est ensuite extrait puis fractionné. Les fragments d'intérêt, associés à la protéine étudiée, sont sélectionnés grâce à un anticorps. Après précipitation des complexes ADN-protéine-anticorps et élimination du surnageant, les complexes ADN-protéine sont séparés. Les fragments recueillis sont finalement analysés sur puce à ADN pour les identifier.

2.3.2 Étude au niveau de l'ARN

Nous décrivons plus en détail dans la partie 2.5 les deux types de puces utilisés dans notre projet d'analyse du transcriptome sur le mélanome de la choroïde.

2.3.2.1 Quantification

La technique des puces à ADN permet de comparer les profils d'expression de cellules présentant des phénotypes différents et permet donc de comprendre les bases moléculaires associées à ces phénotypes. La comparaison entre tissu sain et malade permet d'identifier les gènes dérégulés dans la pathologie. Ces analyses permettent également de générer des cartes d'identité des tumeurs selon leurs profils d'expression et ainsi les classer selon les gènes sur- ou sous-exprimés et qui peuvent avoir un intérêt en terme de pathogénèse, diagnostic, pronostic et traitement. L'analyse de ces profils d'expression en termes de corrélation permet également de mettre en évidence des groupes de gènes qui peuvent être fonctionnellement reliés par des régulateurs communs. Ces analyses permettent de mettre en évidence bon nombre de paramètres moléculaires caractéristiques de chaque tumeur et donc adapter les traitements.

2.3.2.2 Epissage

Le passage d'un ARN pré-messager à un ARN mature suscite également de l'intérêt dans la progression tumorale. Il a été montré dans l'étude de cellules tumorales l'importance que des dérèglements au niveau de l'épissage alternatif peuvent avoir dans la prolifération cellulaire ou encore l'apoptose [Venables, 2004]. Certaines de ces perturbations sont causées par des mutations aux sites d'épissage (Fig. 2.7) et leurs éléments de contrôle, tandis que d'autres sont provoquées par des changements dans l'expression des protéines contrôlant la sélection des sites d'épissage.

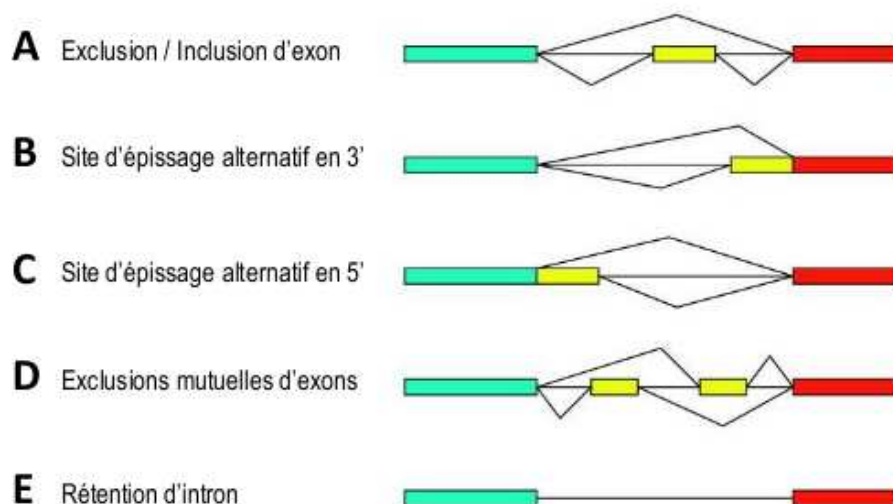


FIG. 2.7: Quelques exemples d'épissage alternatif.

A- l'utilisation de deux sites faibles (donneur et accepteur) permet, si les protéines requises sont présentes en quantité suffisante, de définir un exon supplémentaire à inclure. **B-** Utilisation d'un seul site alternatif, ici 3' (accepteur). **C-** Utilisation d'un seul site alternatif, ici 5' (donneur) avec dans ces deux cas l'inclusion d'un exon supplémentaire comme en A. **D-** Situation dans laquelle il y a deux paires de sites faibles et donc deux possibilités d'inclusion d'exon, qui sont exclusives l'une de l'autre. **E-** Absence d'épissage d'un intron entraînant sa rétention dans le messager

Il existe donc des puces qui permettent de quantifier les différents variants d'épissage exprimés dans la cellule en mesurant la présence des exons spécifiques de chaque isoforme.

2.3.2.3 micro ARN

Dans les années 90, la découverte d'ARN messagers qui ne conduisent pas à la production d'une protéine chez *C. elegans* s'apparente à une véritable révolution [Lee et al., 1993]. D'autant plus que ces ARN ont la capacité de bloquer de façon sélective certains gènes. En 2001, le premier micro ARN est découvert chez les mammifères [Lagos-Quintana et al., 2001] et depuis leur nombre ne cessent d'augmenter.

Des études dans la progression tumorale révèlent l'importance croissante de ces petits ARN non codants [Garzon et al., 2006]. L'utilisation de puces à micro ARN (dont le principe est similaire à celui des puces pour les ARN messagers en adaptant la technique d'extraction à ces ARN particuliers) ont montré que les profils d'expression de ces petits ARN permettaient de différencier précisément les échantillons tumoraux des échantillons normaux. L'équipe de Robert Weinberg, a analysé une liste de micro ARN présents dans des tissus cancéreux et dans des tissus sains et a étudié leur rôle dans le développement de métastases. Ils ont découvert qu'un micro ARN était présent en plus grande quantité dans des cellules cancéreuses métastasées. En forçant des cellules humaines de cancer du sein à sur exprimer ce micro ARN et en les injectant chez des souris, ces cellules ont entraîné des métastases. Une des explications possibles serait que ce micro ARN bloque un gène qui freine la migration cellulaire.

D'autres études ont montré que certains micro ARN favorisaient une division rapide et incontrôlée des cellules favorisant ainsi la formation des tumeurs.

Mais si l'on connaît le rôle de certains micro ARN, la plupart ont une fonction qui reste encore inconnue.

2.3.3 Étude au niveau protéique

Le niveau d'expression d'un gène ne reflète pas nécessairement la quantité de protéines produites. Cependant les protéines sont elles-mêmes soumises à des régulations traductionnelles et post-traductionnelles. Ainsi, analyser le protéome, c'est arriver à déterminer la quantité de protéines actives présentes dans les cellules étudiées. Les puces pour l'étude du protéome sont donc très prometteuses dans la compréhension du processus tumoral. Cependant la technique est plus difficile à mettre à œuvre car il n'existe pas de règle simple comme la complémentarité des acides nucléiques et il n'est pas toujours évident de trouver des anticorps avec une bonne spécificité. Une des possibilités pour étudier les protéines à grande échelle est de procéder de façon inverse comparé aux puces à ADN et ainsi étudier une protéine par support solide sur lequel est déposé différents échantillons à analyser. Il s'agit de la technique de RPPA pour Reverse Phase Protein Array. Cette technique est une technique innovante qui nécessite une petite quantité de matériel biologique (environ 1 ng) contrairement au western blot classique. Les échantillons sont déposés de façon automatique sur une lame recouverte de nitrocellulose qui peut en contenir plus de 1000 simultanément. En utilisant des anticorps dirigés contre des modifications spécifiques comme la phosphorylation de certaines protéines, la RPPA peut être utilisée pour analyser l'état d'activation des voies de signalisation dans des cellules tumorales.

2.3.4 Étude phénotypique

En plus de s'appliquer au niveau moléculaire, les approches haut débit peuvent également permettre l'analyse au niveau phénotypique. Des puces TMA (pour Tissue MicroArray) permettent de tester par immunohistochimie (IHC) l'intensité de l'expression et la localisation cellulaire et subcellulaire du produit d'un ou plusieurs gènes ou bien encore de rechercher les anomalies génétiques par FISH. Sur une lame, jusqu'à 1000 coupes tissulaires peuvent être analysées simultanément [Kononen et al., 1998].

2.4 Analyse du génome

2.4.1 Les puces CGH

L'hybridation génomique comparative (CGH) est une technique de cytogénétique moléculaire qui a été décrite par Kallioniemi [Kallioniemi et al., 1992]. Elle permet de caractériser les gains et les pertes de segments chromosomiques observés dans l'ADN tumoral. Son principe est basé sur l'hybridation compétitive de deux ADN (un normal et un tumoral) marqués par des fluorochromes différents avec des chromosomes en métaphase. Le rapport des deux fluorescences visualisées de manière optique le long des chromosomes renseigne ainsi sur le gain ou la perte de régions chromosomiques au sein de l'ADN tumoral par rapport à l'ADN contrôle. Cette technique permet donc de discerner, avec une résolution d'environ 10 à 20 mégabases, l'ensemble des gains et pertes chromosomiques de grande taille présent dans une tumeur donnée. Cependant, cette résolution est très faible et la technique de CGH a été améliorée par notre connaissance du génome humain combinée aux apports de la biologie à grande échelle. Dans la technique des puces CGH, les ADN ne sont plus hybridés sur des chromosomes mais sur des fragments d'ADN bien identifiés (Fig. 2.8).

Ces sondes sont principalement issues des banques de chromosomes artificiels bactériens clonés (BACs) contenant un fragment d'ADN humain d'environ 150 kilobases. Ces fragments sont extraits, amplifiés, et déposés sur une puce [Pinkel et al., 1998; Pollack et al., 1999]. Chaque spot à la surface de la puce correspond à un BAC et donc à une zone précise du génome. La résolution de la puce CGH dépend donc du nombre de BACs déposés et leur espacement sur le génome. Depuis la première étude pangénomique réalisée par l'équipe de Pollack [Pollack et al., 1999] sur une puce à 4000 points, la résolution n'a cessé d'augmenter. En 2001 avec environ 2400 BACs, ces puces permettaient d'avoir une résolution de 1,4 megabases [Snijders et al., 2001]. Il existe aujourd'hui des puces couvrant la totalité du génome grâce à l'emploi de plus de 30 000 BACs se recouvrant partiellement permettant d'atteindre des résolutions de l'ordre d'une centaine de kilobase. Par ailleurs il existe également des puces CGH dont les sondes sont des oligonucléotides et ces séquences étant bien plus courtes que des clones BACs permettraient d'atteindre des résolutions très élevées.

L'analyse des gains et des pertes dans le génome des tumeurs présente un double intérêt : d'une part pour l'établissement d'une carte des altérations chromosomiques tumorales, cette carte des gains et des pertes étant associée de façon très étroite au diagnostic, voire au pronostic [Wilhelm et al., 2002], et d'autre part pour l'identification précise des gènes dont un gain ou une perte de fonction est associée à ces altérations et à la progression tumorale. Plusieurs études ont mis à profit cette stratégie pour identifier des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs, les premiers étant associés à des

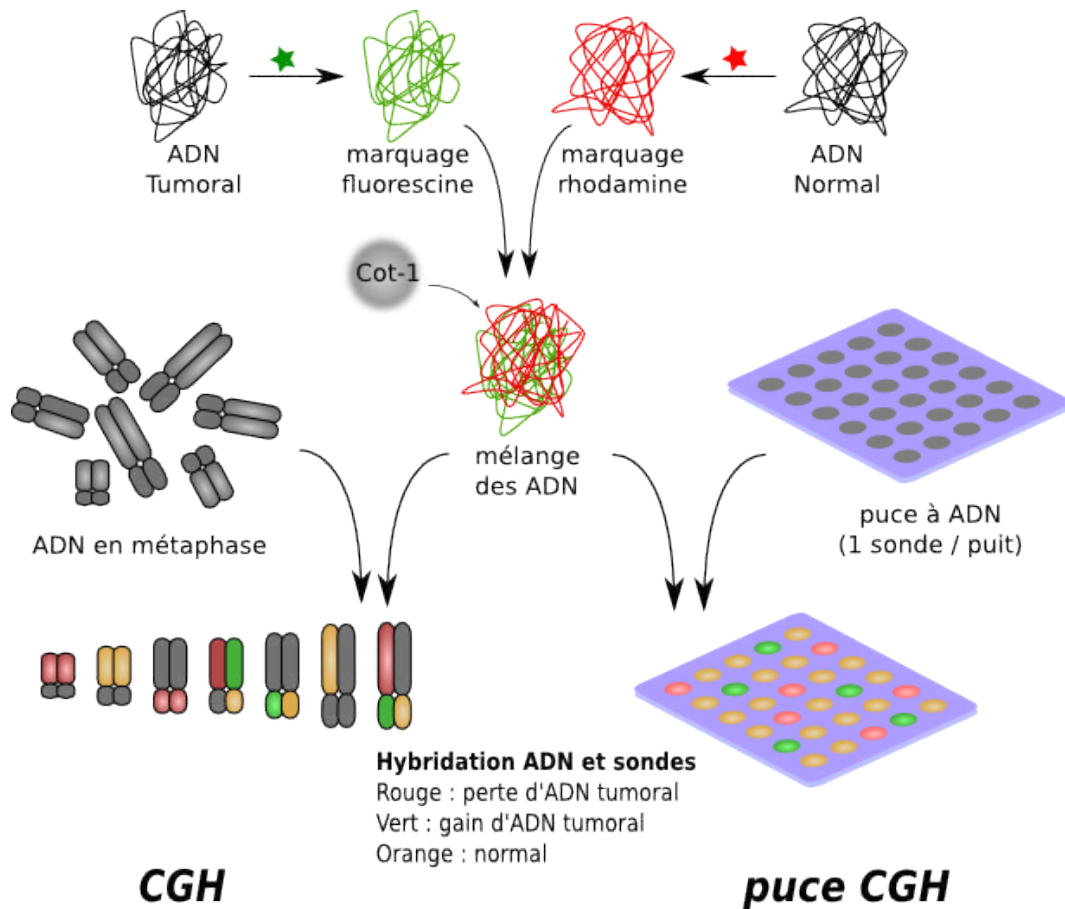


FIG. 2.8: Principe de la technique d'hybridation génomique comparative (CGH) et adaptation aux puces CGH.

Figure d'après http://fr.wikipedia.org/wiki/Hybridation_g%C3%A9nomique_comparative

régions de gain, et les seconds à des régions de perte [Albertson et al., 2000; Kauraniemi et al., 2001; Garcia et al., 2005]. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que le génome des tumeurs et les altérations qu'il comportent étaient stables au cours du temps [Waldman et al., 2000; Albertson, 2003] ce qui souligne l'intérêt de la recherche des altérations récurrentes car celles-ci apportent à la tumeur un avantage sélectif constant.

Cependant cette technique a ses limites. En effet, elle permet de détecter seulement les modifications chromosomiques non équilibrées, c'est à dire qu'il est impossible de mettre en évidence les translocations réciproques ou les inversions. De plus, le ratio des fluorescences utilisé pour l'analyse quantitative ne permet pas d'avoir des informations concernant la ploïdie.

2.4.2 Les puces Affymetrix SNP6.0

La plus grande différence entre les puces CGH et les puces SNP au niveau du protocole est qu'il n'y a pas d'échantillon normal utilisé comme référence. Les puces SNP sont des puces à ADN élaborées pour étudier les polymorphismes génétiques. Comme expli-

qué au préalable, cette variation est la plus grande source de variabilité génétique entre individus. En effet, il existe environ 10 millions de SNPs dans le génome humain [Cargill et al., 1999] présents tous les 100 à 300 paires de bases en moyenne. Ces polymorphismes sont hautement conservés dans l'évolution et dans les populations. Ainsi leur cartographie a été entreprise voici une dizaine d'années et les connaissances acquises sont rassemblées dans des bases de données (projet HapMap et base de données dbSNP, NCBI) [Consortium, 2005; Sherry et al., 2001]. Lors d'analyses non appariées (dans ce cas l'appariement signifie échantillons tumoral + sain du même patient), 270 échantillons du HapMap sont utilisés comme référence. Les puces Affymetrix Genome-Wide Human SNP array 6.0 contiennent plus de 1,8 millions de marqueurs génétiques avec environ 900000 sondes pour l'étude du polymorphisme ou encore SNPs et 950000 sondes pour la détection du nombre de copie ou encore CNVs (Copy Number Variations). Les CNVs sont définies comme des segments de chromosome d'au moins 1000 nucléotides de long qui varient en nombre de copies d'un humain à un autre. D'après l'étude de Redon *et al.* [Redon et al., 2006], sur 270 individus les CNVs représenteraient 12% du génome ce qui permet d'avoir une résolution d'environ 0,7 kb. En pratique, les puces SNPs sont composées de sondes de 25 nucléotides. Pour les sondes SNPs, il y a deux sondes pour chaque SNP, une pour chaque allèle, et pour chaque SNP, et elles sont répétées 3 à 4 fois sur la puce à des localisations différentes. Pour les sondes CNVs, il n'y a qu'un type de sonde pour chaque CNV puisque les deux allèles sont identiques et il n'y a pas de réplicat à d'autres positions sur la puce.

Deux valeurs sont communément utilisées lors de l'analyse de ces puces, le log R ratio (LRR) et le B allèle fréquence (BAF). R est la somme des fluorescences des deux allèles pour un SNP donné et le LRR correspond au logarithme du ratio entre la somme des deux sondes d'un SNP donné dans l'échantillon étudié et la même somme obtenue dans la référence. Il ne s'agit donc pas du même log ratio utilisé dans les puces CGH qui correspond au rapport des fluorescences issu de l'hybridation compétitive de deux échantillons marqués par un fluorochrome différent. Le B allèle fréquence représente la fraction d'allèle B par rapport à l'intensité totale issue de l'allèle A et de l'allèle B. Concrètement dans une région normale, le LRR est à 0 et le BAF peut avoir 3 valeurs : 0 (correspondant à un génotype homozygote AA), 0.5 (pour un génotype hétérozygote AB) ou 1 (pour le génotype homozygote BB) (Fig. 2.9).

En plus de l'analyse du nombre de copie à la manière des puces CGH, l'intérêt de ces puces SNP pour l'étude du cancer est double car elles permettent une étude pangénomique des polymorphismes dans un échantillon, et elles permettent de réaliser un dosage de chaque allèle, elles peuvent ainsi être également utilisées pour réaliser une étude des pertes d'hétérozygotie. Elles deviennent donc un outil alternatif d'une grande précision pour l'étude des altérations génomiques grâce aux informations supplémentaires qu'elles apportent notamment au niveau du génotype [Lindblad-Toh et al., 2000; Mei et al., 2000; Zhou et al., 2005]. La perte d'hétérozygotie (LOH) est une forme de déséquilibre allélique où il y a perte complète d'un des 2 allèles. Comparé aux puces CGH, pour un nombre de copie normal les puces SNPs permettent de détecter une perte d'hétérozygotie lors d'une isodisomie où les deux copies présentes proviennent en fait du même chromosome. La mise en évidence de ces déséquilibres alléliques est un atout dans l'analyse de tumeurs car de nombreuses études ont montré leur importance dans la cancérogénèse [O'Keefe et al., 2010], dans la prédisposition tumorale [Li et al., 2010] ou la prédiction de la survie [Parkin et al., 2010; Iwakawa et al., 2011]. De plus, en combinant à la fois le nombre de copie et le génotype la détection d'événements comme la

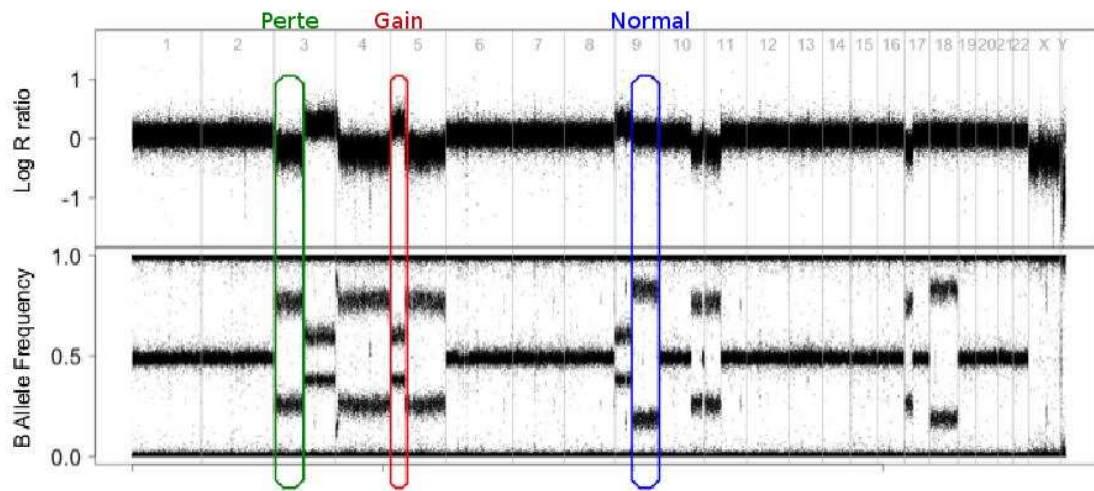


FIG. 2.9: Exemple de profil SNP6.0. Sur cette figure est représenté en haut le nombre de copie d'ADN centré sur 0 (ce qui correspond à 2 copies d'ADN) et en bas la fréquence allélique. Dans une région normale (en bleu) le log R ratio est égal à 0 et la fréquence allélique varie entre 0 (AA), 0.5 (AB) et 1 (BB). Le log R ratio diminue dans les régions perdues (vert) et augmente dans les régions gagnées (rouge). La fréquence allélique varie pour les SNPs hétérozygote dans les régions altérées ou dans le cas de pert d'hétérozygotie dans les régions normales (LOH). Dans une région perdue les SNPs hétérozygotes vont être séparés en deux groupes théoriques un pour le génotype A (BAF=0) et un pour le génotype B (BAF=1). Dans les régions gagnées les SNPs hétérozygotes sont également séparés en deux groupes et la valeur du BAF dépend du nombre de copie. Si on passe à de deux à trois copies on aura deux génotype hétérozygotes AAB (BAF=1/3) et ABB (BAF=2/3).

perte d'hétérozygotie ou connaître la ploïdie des cellules devient possible [Staaf et al., 2008; Popova et al., 2009]

2.4.3 Extraction du signal

Dans toutes les analyses de puces à ADN une première étape de normalisation est requise afin de corriger les biais expérimentaux et extraire l'information biologique. Les protocoles en amont des technologies des puces CGH et des puces SNP étant différents, les méthodes de normalisation sont également différentes.

2.4.3.1 Traitement des puces CGH

Dans les puces CGH, parmi les variations non biologiques systémiques, les biais spatiaux sont les artefacts prédominants. On peut distinguer les gradients spatiaux continus et les biais spatiaux locaux qui se traduisent par des variations d'intensité de fluorescence localisées. Ces variations ont un impact direct sur le signal quantifié par les logiciels d'analyse d'images.

Dans l'équipe de bioinformatique, Neuvial *et al.* [Neuvial et al., 2006] ont développé une méthode, MANOR (MicroArray Normalisation), qui permet de corriger ces biais spatiaux (Fig. 2.10). Cette méthode consiste à faire un lissage spatial des données suivi d'une segmentation des zones présentant la même tendance de valeurs puis identifier

les zones aberrantes affectées par ces biais spatiaux. Cette méthode apparaît comme étant l'algorithme le plus adapté pour la correction des biais spatiaux [Koren et al., 2007] et est utilisée en routine au laboratoire.

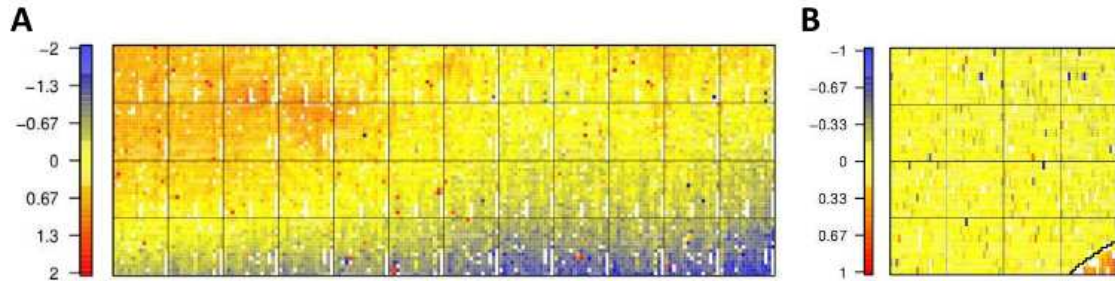


FIG. 2.10: Biais spatiaux observés dans les puces CGH. **A-** Gradient spatial continue. **B-** Biais spatial local.

Figure d'après [Neuvial et al., 2006]

2.4.3.2 Traitement des puces SNP6.0

Nous décrivons ici deux algorithmes majoritairement utilisés pour l'étude des SNP6.0 : tout d'abord celui commercialisé par Affymetrix puis celui proposé par Henrik Bengtsson du département de biostatistique de Berkeley (USA) dans le projet aroma, un projet open-source pour l'analyse de données de puce (<http://www.aroma-project.org/>).

Affymetrix propose une suite de logiciels (Affymetrix Power Tools) pour analyser leurs puces. Parmi les algorithmes proposés dans le logiciel Affymetrix Genotyping Console, la méthode CN5 permet d'estimer le nombre de copie. Dans CN5, les signaux des sondes sont normalisés (avec une correction du bruit de fond) pour les variations systémiques. L'ensemble de ces sondes est ensuite normalisé par quantile via un algorithme propriétaire d'Affymetrix. Pour les sondes SNPs, les effets puces sont estimés séparément pour chacun des allèles en utilisant l'algorithme PLIER (Probe Logarithmic Intensity Error). Le nombre de copie total est obtenu en faisant la somme des intensités de chaque allèle. Le log ratio est ensuite calculé avec la référence choisie. Pour finir, les log ratios sont ajustés afin que la médiane de tous les signaux médians des chromosomes autosomiaux soit à zéro. Cette méthode ne peut s'appliquer qu'en utilisant les CDF par défaut et n'utilise que les femmes (hommes) quand le calcul de la référence se fait sur le chromosome X (Y). Il n'est pas possible de forcer l'estimation des ratios des chromosomes X et Y sur l'ensemble des échantillons puisque les chromosomes sexuels diffèrent entre les femmes et les hommes.

La méthode ACNE (Allele specific Copy Number Estimation) [Ortiz-Estevéz et al., 2010] est la dernière méthode développée par le groupe du projet Aroma pour l'analyse des puces SNP6.0. Cette méthode se base sur la méthode CRMAv2 également proposée par ce groupe [Bengtsson et al., 2009] pour calculer le nombre de copie et permet également d'estimer la fréquence allélique. C'est une méthode puce à puce. Les résultats ne sont pas dépendants de l'ensemble du jeu de données. La méthode ACNE permet un pré-traitement des données et un regroupement des informations des différentes sondes afin d'obtenir une estimation du nombre de copie total. Les différentes étapes de la méthode consiste à calibrer les différents signaux entre les paires de sondes des allèles A et

B, puis à normaliser les effets dus à la position des sondes dans la séquence des gènes cibles. Les sondes répliquées sont regroupées par un modèle de moyenne robuste (et en sommant les allèles A et B pour les sondes SNPs). Ce signal est normalisé pour les effets longueur de PCR puis les nombres de copie sont calculés en faisant le ratio des groupes de sondes de l'échantillon test sur celui utilisé comme référence.

D'après leur publication, ACNE donnerait de meilleurs résultats que ceux produits par la suite logicielle d'Affymetrix. Cependant, suite à la comparaison de profils SNP6.0 en sortie des deux algorithmes qui étaient assez similaires et parce que la méthode ACNE est plus chronophage, nous utilisons en routine les sorties de CN5.

2.4.4 Segmentation des données

En sortie de ces méthodes d'extraction du signal, on obtient des valeurs quantitatives proportionnelles au nombre de copie d'ADN. Cependant, il y a une fluctuation résiduelle du signal inhérente aux technologies haut-débit. Le nombre de copie d'ADN est quasiment semblable entre des locus contigus sauf pour certains d'entre eux où on observe un changement abrupt, ces locus sont appelés points de cassure. Des méthodes de segmentation ont été développées afin de mettre en évidence ces points de cassure le long des chromosomes. Ces méthodes de segmentation doivent analyser les données tout en prenant en compte la présence de valeurs aberrantes ou la contamination des cellules normales présentes dans tous les échantillons qui ont pour effet de minimiser plus ou moins les changements de nombre de copie. Plus la résolution des puces augmente plus la mise en évidence d'aberrations de petites tailles est facilitée mais plus la complexité des données augmente et donc nécessite des algorithmes performants. Différents algorithmes de segmentation ont été développés et comparés [Willenbrock and Fridlyand, 2005; Lai et al., 2005].

Parmi ces méthodes nous pouvons citer : AWS (Adaptive Weights Smoothing) [Polzehl and Spokoiny, 2000], méthode de lissage itérative ; CBS (Circular Binary Segmentation) [Olshen et al., 2004] basée sur l'application d'un test statistique avec permutation ; Jong *et al.* [Jong et al., 2004] ont proposé une méthode qui maximise la vraisemblance avec un terme pénalisant sur le nombre de points de cassure ; Wang *et al.* [Wang et al., 2005] ont proposé une méthode basée sur la classification hiérarchique ; CBS amélioré [Venkatraman and Olshen, 2007] pour que le temps de calcul soit linéaire en nombre de sondes afin de s'adapter aux nouvelles versions de puces ; une méthode basée sur les chaînes de Markov (HMM - Hidden Markov Model) [Fridlyand et al., 2004] ; CGHseg [Picard et al., 2005] basée sur une approche de programmation dynamique avec vraisemblance pénalisée afin de choisir le nombre de points de cassures adaptés au profil ; une méthode de lissage par quantile [Eilers and de Menezes, 2005] ; une méthode qui cherche à débruiter les données en utilisant un découpage en vague [Hsu et al., 2005] ; les méthodes proposées par Engler, Broet, Guha [Engler et al., 2006; Broët and Richardson, 2006; Guha et al., 2008] se basent sur des modèles de mixture Gaussien ; Lai *et al.* [Lai et al., 2008] utilisent un modèle de segmentation Bayésienne ; haarseg [Ben-Yaacov and Eldar, 2008] est basée sur un découpage en vague avec seuillage et est définie comme étant 1000 fois plus rapide que les méthodes précédentes.

Ces méthodes ont été développées pour la segmentation des puces CGH. En 2010 Rigai *et al.* a proposé une adaptation de la méthode CGHseg pour les données SNP6.0 qui sont plus complexes que les données de puces CGH [Rigai, 2010a,b].

Alors que beaucoup de méthodes ont été proposées pour la segmentation des don-

nées, peu traitent le problème de l'assignement d'un statut. L'algorithme GLAD (Gain and Loss Analysis of DNA) [Hupé et al., 2004] permet dans un premier temps de détecter les points de cassure dans le profil génomique (étape de segmentation via *AWS* ou *haarseg*) puis attribue à chaque segment son statut, c'est à dire normal, perte, gain ou amplification (étape d'attribution du statut génomique). Cette étape d'attribution du statut de façon automatique permet de s'affranchir d'un travail manuel long et non reproductible et permet d'éviter les erreurs de perception.

2.4.5 Attribution du génotype pour les puces SNP6.0

Les puces SNP6.0 sont plus riches en information que les puces CGH. En effet avec deux sondes SNP par locus, en plus de pouvoir estimer le nombre de copie par le log R ratio (LRR) de façon comparable aux puces CGH, ces puces permettent d'estimer la fréquence allélique. Cette information supplémentaire peut être très informative, par exemple lors d'une perte d'hétérozygotie dans une région à 2 copies. C'est une information qui n'aurait pas pu être mise en évidence avec les puces CGH. La fréquence allélique permet également d'estimer le niveau de contamination par les cellules normales dans l'échantillon analysé en comparant le niveau réel du BAF au niveau théorique (0 ou 1 dans les régions délétées) [Nancarrow et al., 2007].

De plus, comme nous l'avons déjà cité précédemment, la prise en compte à la fois du nombre du log ratio pour le nombre de copie et la fréquence allélique permet d'assigner plus précisément un statut à chaque segment. Popova *et al.* ont proposé une méthode graphique (GAP - Genome Alteration Print) qui permet d'analyser automatiquement les profils complexes comme les échantillons de tumeurs qui sont fréquemment polyploïdes ou contaminés [Popova et al., 2009]. Cette méthode permet donc de déterminer la ploïdie de chaque échantillon analysé et le nombre exact de copie de chaque segment (Fig. 2.11).

Loo *et al.* [Loo et al., 2010] ont également proposé une approche bioinformatique ASCAT (allele-specific copy number analysis of tumors) qu'ils ont appliqué sur des tumeurs de seins et qui permet précisément de décrire le nombre de copie de façon allèle spécifique et ainsi estimer la ploïdie des tumeurs et la contamination de cellules normales.

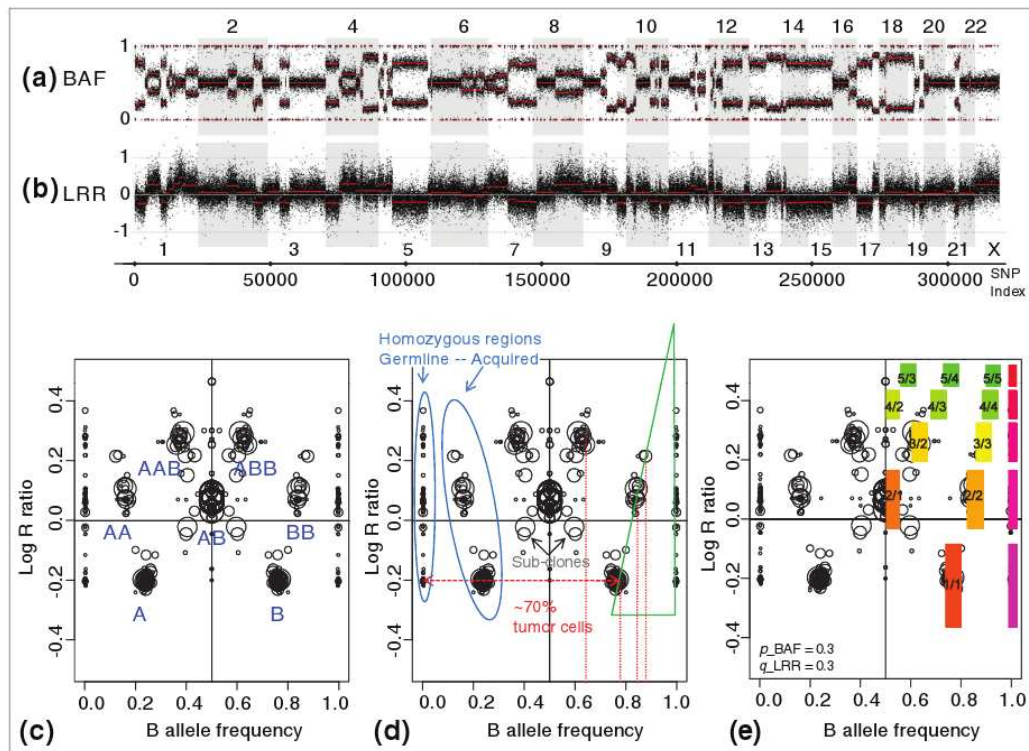


FIG. 2.11: GAP (Genome Alteration Print).

A ; B- Les signaux BAF et LRR sont utilisés pour segmenter les données. **C-** Il s'agit d'une projection combinée de LRR et BAF combiné. Chaque région du génome est représentée par deux cercles symétriques dans le cas d'un déséquilibre allélique et d'un cercle centré à BAF=0.5 dans le cas d'équilibre allélique. Il s'agit ici d'un échantillon diploïde. **D-** Le degré de contamination par des cellules normales peut être déterminé à partir de la position des points et les altérations caractérisant les sous-clones peuvent être identifiés. **E-** Le modèle GAP permet d'interpréter la structure de l'ensemble et d'estimer le nombre de copie exact de chaque segment.

Figure et légende d'après [Popova et al., 2009]

2.5 Analyse du transcriptome

Dans cette partie nous décrivons plus précisément les deux types de puces Affymetrix utilisées dans ce projet.

2.5.1 Les puces 3'IVT d'Affymetrix

Les puces Affymetrix 3'IVT GeneChip sont des puces commercialisées par la société Affymetrix pour l'étude du transcriptome [Lockhart et al., 1996]. La dernière version de ces puces transcriptome (version U133 plus 2.0) présente à sa surface plus de 1300000 oligonucléotides différents synthétisés et présents à des coordonnées précises sur la surface de la puce à l'aide de la technique de photolithographie. Ces sondes permettent au final de dresser le profil d'expression de 47000 transcrits ou variants de transcription dont 37500 sont caractérisés. Pour quantifier l'expression de ces transcrits, la société affymetrix utilise 11 paires d'oligonucléotides pour chaque ARN messager.

D'une part des combinaisons de 11 oligonucléotides d'une longueur de 25 bases sont choisis sur une séquence dite « cible » d'environ 500 paires de bases, située préférentiellement en 3' de l'ARN messager étudié et aussi spécifique que possible de la séquence cible. Ce sont les oligonucléotides « Perfect Match » (PM). D'autre part, afin de mieux quantifier une éventuelle compétition d'hybridation avec d'autres séquences, à chaque oligonucléotide PM est associé un oligonucléotide modifié, dont la 13ème base est inversée. Les bases azotées s'apparient par couple A-U et C-G ; en inversant une base (A en U par exemple), l'hybridation avec la séquence correspondante ne devrait pas avoir lieu. Ceci a pour objectif d'évaluer l'hybridation dite non spécifique, correspondant à un « bruit de fond » biologique (hybridation à la cible de transcrits différents mais dont la séquence est proche de celle recherchée). Ces 11 oligonucléotides appariés sont appelés « MisMatch » (MM) (Fig. 2.12).

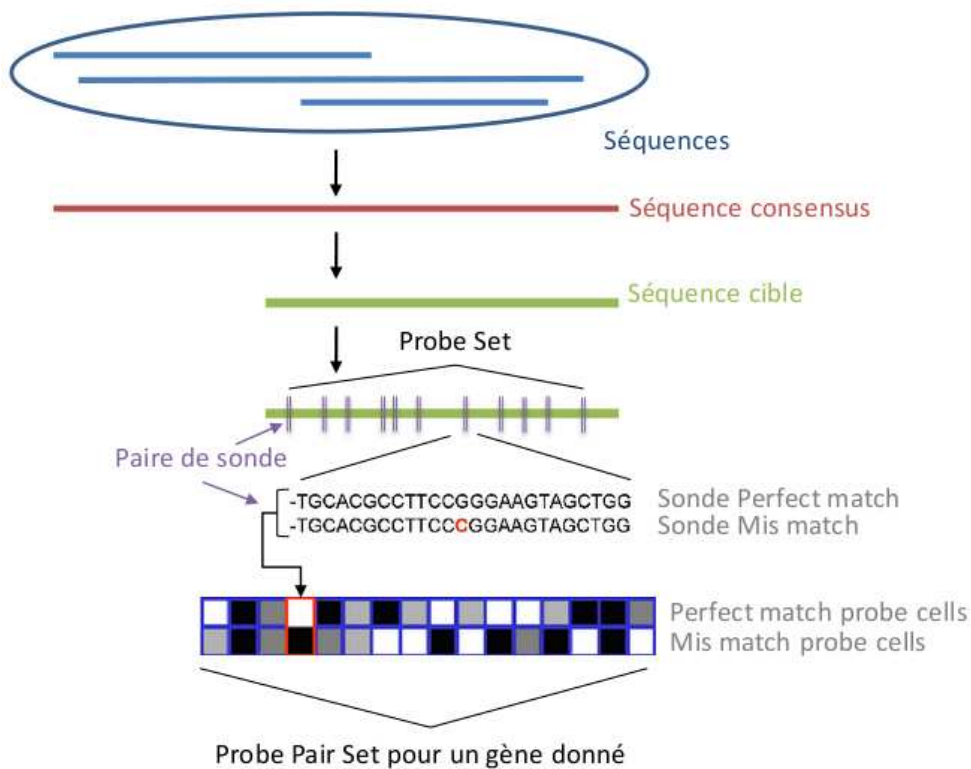


FIG. 2.12: Définition d'un probesets sur les puces Affymetrix 3'IVT. Il s'agit d'un ensemble de sondes match et mismatch en région 3' du transcrit ciblé.

L'ensemble des sondes pour un même transcrit seront groupées ensemble lors de l'extraction du signal et formeront ce qu'on appellera un « probeset ».

Préalablement à l'hybridation, les ARN messagers extraits des échantillons à étudier sont rétrotranscrits puis amplifiés et marqués. Le marquage est réalisé en même temps que l'amplification et fait intervenir une étape de transcription in vitro en présence de ribonucléotides biotinylés. Les ARN ainsi marqués sont fragmentés puis déposés sur la puce pour réaliser l'hybridation, et enfin la révélation de la puce est faite en employant une protéine de fusion streptavidine-phycoerythrine, couplée à l'utilisation d'un anticorps

anti-streptavidine associé à la biotine pour amplifier le signal. Du fait de l'affinité très forte de la streptavidine pour la biotine, les agents de révélation se fixent spécifiquement sur les nucléotides marqués à la surface de la puce, et la fluorescence détectée grâce à un scanner est proportionnelle, en chaque point, de la quantité de nucléotides marqués qui se sont fixés. Le scanner permet donc d'obtenir une image de la fluorescence de la puce, qu'il faut ensuite analyser pour quantifier la fluorescence en chaque point.

2.5.2 Les puces Exon Array d'Affymetrix

Comme indiqué plus haut, le phénomène d'épissage alternatif peut être fortement altéré dans les cellules tumorales. Il existe donc des puces permettant de quantifier les différents variants d'épissage exprimés dans la cellule en mesurant la présence des exons spécifiques de chacun de ces variants.

Les puces Human Exon 1.0 ST de la société Affymetrix peuvent être considérées aujourd'hui comme l'une des puces à ADN qui proposent la meilleure résolution sur le marché puisqu'elles sont composées de plus de 5 millions de sondes qui permettent d'interroger environ 1 million d'exons connus ou prédits. Cette puce est constituée d'environ 40 sondes par gène, distribuées le long du transcrit, ce qui offre une mesure plus précise que les puces 3' décrites précédemment (Fig. 2.13). A l'échelle de l'exon, environ 4 sondes permettent de mesurer un signal d'expression et ainsi détecter des épissages alternatifs.

Affymetrix a défini 3 niveaux d'annotation de ces sondes en fonction de la fiabilité des exons qu'elles ciblent : les sondes « core » ciblent les exons définis par des alignements sur la longueur totale des ADNc et contiennent ainsi l'information complète de la séquence codante ; les sondes « extended » ciblent les exons définis par des alignements d'ADNc partiels et d'EST ainsi que des exons définis par homologie de séquence avec des exons décrits chez la souris, le rat ou l'humain ainsi que des gènes mitochondriaux ; les sondes « full » ciblent uniquement les exons prédits informatiquement.

Ces différents niveaux d'annotation peuvent être utilisés comme filtre afin de cibler les sondes sur lesquelles on veut travailler selon leur qualité. Ces puces offrent ainsi la possibilité d'identifier des épissages alternatifs connus ou d'en découvrir de nouveaux, en plus de permettre la mesure de l'expression globale du transcriptome (tous variants confondus) avec une meilleure couverture des transcrits par les sondes.

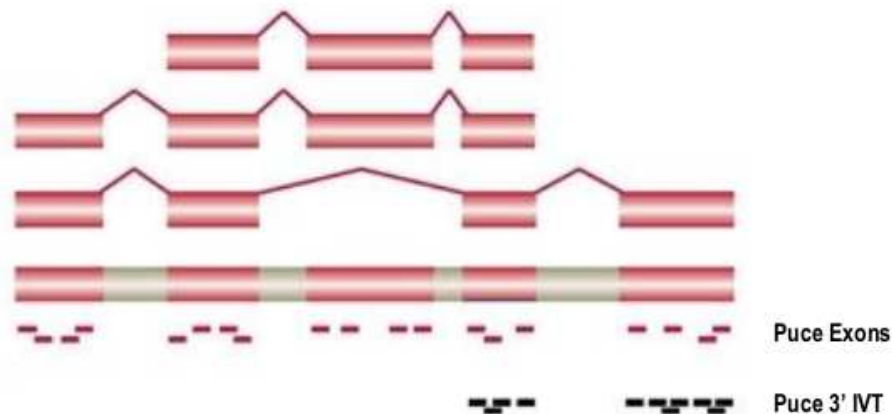


FIG. 2.13: Différence de positionnement des sondes dans les puces 3'IVT et dans les puces exons.

2.5.3 Algorithmes pour l'extraction du signal des puces d'expression Affymetrix

Après hybridation, la puce est scannée pour obtenir une image qui représente le niveau de fluorescence proportionnel à la quantité d'oligonucléotides fixés. En sortie de scanner, ces fichiers images sont traités afin d'obtenir une valeur numérique pour chaque oligonucléotide. Cependant, lors d'une expérience de puces, il y a plusieurs sources de variations qui participent au signal, comme des différences dans le marquage ou les quantités d'ARN déposées et leur qualité également. Différentes méthodes permettent ainsi d'obtenir un signal d'expression associé à chaque gène ou ARN messager, en prenant en compte les différentes sources de variations qui se révèlent être non spécifiques.

2.5.3.1 MAS 5.0

L'algorithme MAS 5.0, développé par Affymetrix, génère deux types de valeurs : un signal proprement dit qui représente la quantité relative du transcrit dans l'échantillon analysé, et une p-value associée qui représente la probabilité que le transcrit soit absent de l'échantillon. Toutes les valeurs de fluorescence sont d'abord corrigées d'un bruit de fond éventuel en se basant sur les intensités de fluorescence des cellules adjacentes. Puis le signal est calculé en prenant en compte l'intensité d'hybridation des sondes PM et des sondes MM, lesquelles sont censées rendre compte du bruit de fond d'hybridation non spécifique, le principe de base étant de soustraire la fluorescence des oligonucléotides MM à celle des oligonucléotides PM et d'estimer une moyenne robuste de $\log(\text{PM} - \text{MM})$. Le calcul du statut Absent ou Présent est basé quant à lui sur l'utilisation d'un score discriminant qui est une mesure relative de la différence entre les intensités PM et MM. Les couples d'oligonucléotides pour lesquels les intensités PM et MM sont semblables sont ignorés, et la p-value résulte d'un test de Wilcoxon, où ces scores discriminants sont comparés à une valeur seuil fixée par la méthode à 0,0015. Le statut Absent, Présent ou Marginal résulte directement de cette p-value. Suite au calcul du signal et de la p-value, l'algorithme MAS 5.0 procède à une normalisation de toutes les puces afin de les ajus-

ter, chacune à une même intensité moyenne appelée « target value » (habituellement, cette valeur est de 500). Cette étape repose sur l'hypothèse que l'intensité moyenne des sondes à la surface de la puce doit être égale d'un échantillon à l'autre et permet donc de comparer les valeurs d'expression d'un gène entre les échantillons.

En plus d'être relativement obscur, l'algorithme MAS 5.0 présente l'inconvénient de reposer sur beaucoup de valeurs arbitraires. Il présente également des performances discutables pour les faibles valeurs d'hybridation.

2.5.3.2 RMA et GCRMA

La méthode RMA pour Robust Multiarray Average, est une alternative à MAS 5.0 développée par Irizarry *et al.* [Irizarry et al., 2003]. Sans tenir compte des MM, la méthode RMA vise à établir des critères de comparaison tangibles entre les différentes puces d'une expérience, là où MAS 5.0 se contentait d'ajuster le niveau moyen de toutes les puces. Après avoir estimé et soustrait le bruit de fond calculé globalement à partir de toutes les valeurs de PM, les puces sont normalisées entre elles par la méthode des quantiles [Bolstad et al., 2003], c'est-à-dire que les signaux sont ajustés de manière à ce que toutes les puces aient la même distribution d'intensité des sondes. Enfin, un algorithme « median-polish » est appliqué aux signaux de chacun des probe sets pris séparément en partant des observations suivantes : l'affinité d'une sonde pour sa cible devrait être constante d'une puce à l'autre et la variance des sondes devrait être globalement constante. Un signal est alors obtenu pour chaque ensemble de sondes, représentant la valeur d'expression du transcrite cible.

La méthode GCRMA, pour GeneChip RMA [Wu et al., 2004b] diffère de la précédente par le calcul du bruit de fond. Cette correction du bruit de fond est réalisée en fonction du contenu en nucléotides G et C de chacune des sondes à la surface de la puce. En effet, si l'on fait l'hypothèse qu'il existe un bruit de fond dû à une homologie partielle des séquences entre la sonde et des acides nucléiques en solution, il existe une hybridation entre ces séquences, et donc un bruit de fond, proportionnelle au contenu en nucléotides G/C dans chaque sonde. GCRMA utilise un modèle prenant en compte la composition nucléotidique de chaque sonde, ainsi que la position des nucléotides G et C, le reste de la procédure étant semblable à celle de la méthode RMA.

2.5.3.3 Autres algorithmes

Il existe d'autres méthodes de normalisation des données Affymetrix mais celles-ci ne sont pas utilisées en routine. On peut citer la méthode Li-Wong [Li and Wong, 2001] notamment implémentée dans le logiciel D-Chip. Plus récemment, les méthodes FARMS, pour Factor Analysis for Robust Microarray Summarization [Hochreiter et al., 2006] basée sur l'hypothèse d'une distribution Gaussienne du bruit, et la méthode non paramétrique DFW [Chen et al., 2007] pour Distribution Free Weighted method, sont censées donner d'excellents résultats en termes de spécificité et de sensibilité.

Chapitre 3

Analyse de données haut débit

Comme nous venons de le décrire, les technologies haut débit génèrent un grand nombre d'information. Leur analyse nécessite donc un ensemble de méthodologies adaptées afin d'extraire au mieux l'information biologique répondant aux questions posées.

Dans cette partie nous allons aborder les différentes méthodes communément utilisées dans l'analyse de données haut débit. Nous verrons dans un premier temps les méthodes de clustering hiérarchique et d'analyse en composantes principales qui permettent l'analyse exploratoire multivariée des données. Nous aborderons ensuite les analyses supervisées qui permettent de mettre en évidence les gènes impliqués dans les questions biologiques posées. Enfin, nous aborderons les méthodes qui permettent de regrouper les gènes d'intérêt en sous groupe afin d'extraire au mieux l'information biologique.

Nous prendrons comme exemple dans cette partie des données d'expression représentées par une matrice de n observations (échantillons) et p variables (gènes).

3.1 Analyses exploratoires non supervisées

Les analyses non supervisées consistent à prendre en compte l'ensemble des p gènes et/ou l'ensemble des n échantillons de manière à les séparer en groupes distincts de façon automatique sans que la connaissance de classes existantes ne vienne interférer dans le résultat. Ces analyses permettent de mettre en évidence des similitudes entre groupes d'échantillons ou de gènes et permettent par exemple de découvrir de nouveaux sous-groupes dans un cancer donné en se basant sur leur profil d'expression (ou sur le profil de leur altérations chromosomiques).

3.1.1 Clustering Hiérarchique

Le clustering hiérarchique est une méthode puissante et largement utilisée pour l'analyse de grands jeux de données génomiques. L'idée sous-jacente est d'assembler un ensemble d'objets comme des gènes ou des biopuces afin de former un arbre. Si ces objets sont reliés par de courtes branches, ils sont très similaires entre eux et plus la longueur des branches augmente plus cette similarité diminue.

Prenons comme exemple un clustering hiérarchique des n échantillons d'une expérience. La première étape consiste à calculer la matrice des distances entre les n échantillons décrits par les p gènes de leur profil d'expression. Le processus d'agglomération

hiérarchique consiste ensuite en une succession de cycles répétés où les deux objets les plus proches, donc ceux qui ont la plus petite distance, sont regroupés par une branche de l'arbre avec une longueur de branche proportionnelle à la distance calculée entre ces deux objets. Les deux objets regroupés sont supprimés de l'ensemble des échantillons et sont remplacés par un nouvel objet représentant leur regroupement. Les distances entre ce nouvel objet et les autres sont re-calculées et ce processus est répété jusqu'à ce qu'il ne reste plus d'objet à relier.

Deux niveaux de mesure sont importants dans un clustering hiérarchique : la distance entre les objets appelée la métrique et la distance entre les groupes d'objets appelés le critère de lien.

3.1.1.1 Métriques

Il existe différentes métriques parmi lesquelles nous pouvons citer :

La distance euclidienne Comme toutes les distances, il s'agit d'une mesure de dissimilarité. Plus cette mesure est élevée moins les objets comparés sont similaires. Il s'agit de la distance la plus utilisée dans l'analyse de données d'expression [Quackenbush, 2001]. Deux tumeurs seront proches selon la mesure de la distance euclidienne si leurs profils d'expression ont un niveau similaire, c'est à dire si le niveau d'expression des gènes est semblable.

La formule de la distance euclidienne entre deux échantillons x et y dans un espace à n gènes peut s'écrire :

$$d(x, y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}$$

La corrélation de Pearson En opposition à la distance euclidienne, la corrélation de Pearson est une mesure de similarité. Plus la corrélation est grande plus les échantillons comparés sont similaires. La méthode de clustering nécessite une mesure de dissimilarité, il faudra donc transformer cette mesure en mesure de dissimilarité en utilisant 1-corrélation.

Cette mesure permet de mettre en évidence si les objets comparés évoluent dans le même sens. Elle mesure le lien linéaire entre les deux. Lors de la comparaison de deux tumeurs, celles-ci seront proches si l'expression de leurs gènes évolue dans le même sens. Ce qui signifie que ces gènes peuvent ne pas avoir le même niveau d'expression, l'un peut être bien plus exprimé que l'autre, mais doivent varier de la même façon.

Le coefficient de corrélation de Pearson n'est donc pas sensible aux échelles et permet donc de comparer des objets définis par des échelles différentes. En revanche cette mesure de distance est relativement sensible aux valeurs aberrantes.

La formule pour calculer le coefficient de corrélation de Pearson r entre deux échantillons x et y dans un espace à n gènes peut s'écrire :

$$r_{xy} = \frac{\text{cov}(x,y)}{\sqrt{\text{var}(x)} \cdot \sqrt{\text{var}(y)}} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

La corrélation de Spearman Le coefficient de corrélation de Spearman est un coefficient de corrélation non paramétrique basé sur les rangs. Le coefficient de corrélation de Spearman n'est pas sensible aux valeurs aberrantes et est plus adapté lorsqu'il y a peu de points.

La formule de la corrélation de Spearman entre deux échantillons s'écrit de la même façon que la formule de la corrélation de Pearson sauf qu'on utilise les rangs au lieu d'utiliser les valeurs de x et y .

3.1.1.2 Les critères de liens

Il existe différents critères de lien pour mesurer les distances entre les groupes d'objets (Fig. 3.1) :

Le lien simple est l'algorithme de clustering le plus simple. Il est encore appelé méthode du plus proche voisin et correspond à la distance minimale entre les éléments de deux clusters. Cette méthode tend à produire des clusters non compacts, lâches, car deux clusters peuvent être proches si deux membres sont proches, bien que le reste ne le soit pas. En particulier, cette méthode a souvent pour conséquence d'inclure des éléments supplémentaires et isolés à un cluster déjà existant. Ceci produit de grands arbres avec plusieurs branches sans ramification, ce qui rend cette méthode peu propice à l'analyse de données de puces à ADN.

Le lien complet est également connu comme la méthode du voisin le plus éloigné. La distance entre deux clusters est la distance maximale calculée entre chacun de leurs éléments. De manière naturelle, cette méthode tend à produire des clusters très compacts, de tailles uniformes.

Le lien centroïde La distance entre deux clusters correspond à la distance entre leur deux barycentres

Le lien moyen La distance entre deux clusters est la moyenne des distances entre toutes les paires d'éléments des clusters. Les méthodes qui s'en approchent font intervenir la médiane au lieu de la moyenne.

Le lien de ward constitue des clusters de manière à minimiser la somme des carrés des distances entre les groupes. Cette approche tend à produire des groupes compacts et de petite taille. Il s'agit du critère de lien le plus approprié pour les données de puces à ADN.

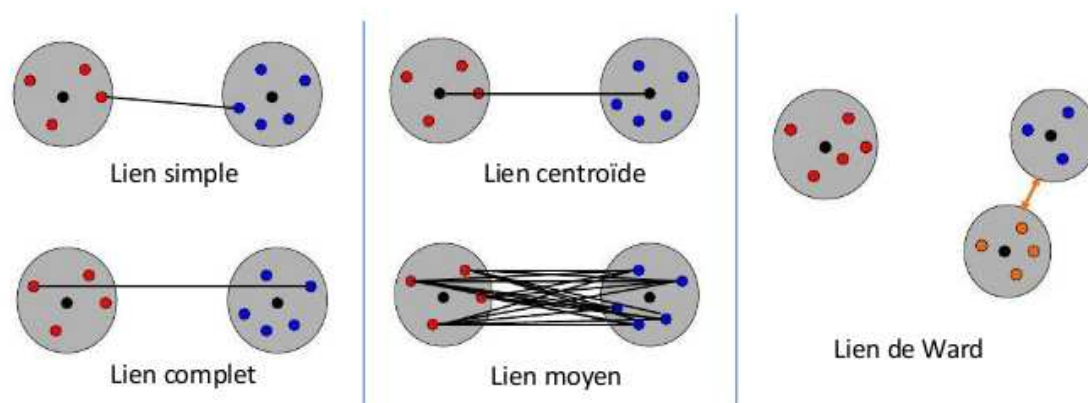


FIG. 3.1: Représentation schématique des différents critères de lien pour l'agrégation des groupes d'objet

3.1.2 Analyse en Composantes Principales

L'analyse en composante principale est une technique proposée par Pearson [Pearson, 1901] et Hotelling [Hotelling, 1933] qui permet la compression et la classification des données. Cette méthode est une transformation linéaire qui consiste à réduire un jeu de données multidimensionnel en un nouvel ensemble de variables plus petit que l'ensemble d'origine mais qui préserve autant que possible l'information importante contenue dans l'échantillon. Cette information est définie par la variabilité présente dans l'échantillon et par les corrélations existantes entre les variables originelles. Ces nouvelles variables appelées composantes principales sont non corrélées et ordonnées selon la quantité d'information qu'elles contiennent. La première composante contient donc la plus grande quantité de variation et la deuxième composante contient en deuxième lieu la plus grande quantité de variation. Par exemple, pour représenter un nuage de points elliptique placé dans un espace à 3 dimensions, la première composante principale serait le plus long axe de l'ellipsoïde, la seconde composante serait le second plus long perpendiculaire au premier et la troisième composante serait le plus petit axe. Les composantes principales sont donc ordonnées par la quantité de variance qu'elles expliquent. Elles peuvent être trouvées en calculant les vecteurs propres de la matrice de covariance des données. Les valeurs propres correspondantes déterminent combien la variance présente dans les données est expliquée par chacune des composantes principales.

Les résultats obtenus par puces à ADN montrent qu'il existe toujours des gènes corrélés dans leur comportement. Ceci indique qu'une partie de l'information contenue dans ces grands jeux de données est redondante et peut donc certainement être ignorée sans en perdre pour autant. Par exemple, si plusieurs échantillons sont très proches, il doit être possible d'ignorer une partie de l'information redondante et de moyenner un ensemble de gènes sans perte d'information. Des exemples pratiques d'application de l'ACP sur de l'analyse de données d'expression ont été présentées par Yeung et Ruzzo [Yeung and Ruzzo, 2001] ou Raychaudhuri [Raychaudhuri et al., 2000]

L'objectif de l'ACP est de réduire la dimension de l'espace des données en représentant le mieux possible la réalité des données dans un espace de dimensions réduites. Il

s'agit par exemple de représenter les n échantillons analysés dans un espace à 3 dimensions, au lieu d'un espace à p dimensions, p étant le nombre de gènes sur la puce. Pour cela, l'algorithme détermine une série d'axes orthogonaux (indépendants et donc non corrélés), les composantes principales. Les composantes principales sont ordonnées de telle sorte que la première composante représente la plus grande variance comparés aux autres composantes et ainsi de suite. Les composantes peuvent être interprétées comme les directions qui maximisent la variation. Si les données sont très corrélées entre elles, enlever 50% des dimensions pourra entraîner une perte de moins de 10% de l'information alors que sur des données non corrélées, une suppression de 50% des dimensions pourra engendrer un taux de perte de 50%. En général, ce sont donc les 2 ou 3 premières composantes qui sont utilisées car généralement elles suffisent à elles seules à résumer correctement l'information contenue dans les données, mais également car elles permettent une représentation visuelle adéquate.

L'analyse en composantes principales possède donc des avantages indéniables dans la mesure où, en réduisant la dimension de l'espace des données, elle peut non seulement faciliter la visualisation de ces dernières, mais également permettre de séparer les données en groupes. Elle permet également de mettre en évidence des données aberrantes, que ce soit des échantillons problématiques par rapport à l'ensemble du jeu de données ou des probesets car ils seront à l'extérieur du nuage de points central. Cependant à la manière du clustering hiérarchique, il n'existe pas de séparation directe des données en classes et la tâche revient à l'utilisateur d'identifier visuellement les groupes qui ressortent de l'analyse.

3.2 Analyses Supervisées

Contrairement aux analyses non supervisées, ces analyses prennent en compte les différents sous-groupes du jeu de données à analyser et ont pour but de rechercher des gènes différentiellement exprimés de manière significative entre les différentes classes d'échantillons.

Les questions simples et usuelles lors d'une expérience de puces à ADN consistent à identifier les gènes différentiellement exprimés entre deux conditions comme entre des échantillons normaux et des échantillons tumoraux ou entre des différentes classes d'échantillons tumoraux. Afin d'identifier ces gènes, la méthode la plus simple consiste à calculer le rapport des moyennes des expressions entre deux conditions, il s'agit du « fold-change » puis de délimiter un seuil au dessus duquel il y aurait une différence d'expression du gène entre les conditions étudiées. Cependant ce seuil est complètement arbitraire et le test n'est associé à aucune statistique qui permet d'évaluer la confiance que l'on peut avoir dans les résultats.

Nous allons aborder dans cette partie différents tests statistiques pouvant être appliqués aux données à grande dimension ainsi que les contrôles nécessaires à effectuer lors de tests multiples. Parmi les nombreuses méthodes qui ont été publiées, nous avons choisi de présenter également deux méthodes développées pour l'analyse de grands jeux de données et donc adaptées aux expériences de puces.

Pour chaque gène i , on considère les hypothèses suivantes :

– Hypothèse nulle

H_{0i} : Le gène i a le même niveau d'expression dans les deux groupes.

- Hypothèse alternative

H_{1i} : Le gène i a un niveau d'expression différent dans les deux groupes.

Les différents tests décrits dans cette partie cherchent à tester l'hypothèse nulle H_{0i} . Ils peuvent être paramétriques ou non et leur application est plus ou moins adéquate en fonction de la distribution des données, de leur indépendance, si elles sont appariées ou non et de l'égalité des variances intra- et inter- groupes.

3.2.1 Le test de Student

Le test de Student ou test t est un test paramétrique qui permet entre autre de tester que les moyennes de deux populations normalement distribuées sont égales. C'est un test simple appliqué à chacun des gènes de l'expérience pour détecter s'ils sont différemment exprimés entre deux séries d'échantillons. Les hypothèses de départ devant être respectées pour l'utilisation du test de Student sont :

- chaque population doit suivre une loi normale (qui peut être testée en utilisant des tests de normalité comme le test de Kolmogorov–Smirnov).
- les deux populations à comparer doivent avoir la même variance. Le test de Student en sera plus robuste. Une alternative possible est d'utiliser une adaptation du test t, le test de Welch qui n'est pas sensible à ce paramètre d'égalité des variances ni à la taille des deux populations à comparer.
- les données doivent être indépendantes sinon le test t classique aura tendance à mal estimer les résultats.

Deux versions du test t existent suivant l'indépendance ou l'appariement des échantillons.

Le test t pour données non appariées (unpaired t test) permet la comparaison de deux populations différentes. Dans la majorité des cas, l'adaptation de Welch est utilisée car non dépendante de l'égalité des variances. Si \bar{x}_{1i} et \bar{x}_{2i} désignent les niveaux d'expression moyens pour le gène i dans chacune des deux conditions, et s_{1i} et s_{2i} désignent les variances du niveau d'expression du gène i dans les deux conditions, la statistique t pour le gène i peut s'écrire comme suit, avec n_1 et n_2 respectivement le nombre d'échantillons dans chacune des deux conditions.

$$t_i = \frac{\bar{x}_{1i} - \bar{x}_{2i}}{\sqrt{\frac{s_{1i}^2}{n_1} + \frac{s_{2i}^2}{n_2}}}$$

Le test t pour données appariées (paired t test) s'applique par exemple dans le cas où des mesures ont été réalisées pour un même échantillon dans deux conditions différentes (comparaison de tissus sains et pathologiques chez les mêmes patients). Pour chaque échantillon on considère pour un gène i la différence x_i entre les deux intensités d'expression. Le test t pour données appariées consiste donc à regarder si cette valeur est différente de zéro. Si \bar{x}_i désigne la moyenne des valeurs x_i pour le gène i , et s_i désigne la variance de x_i , la statistique t pour le gène i peut s'écrire comme suit, avec n désignant le nombre d'échantillons :

$$t_i = \frac{\bar{x}_i}{\frac{s_i}{\sqrt{n}}}$$

La statistique de test est alors convertie en p-valeur au moyen des tables de la loi de Student (avec un degré de liberté approprié).

La critique principale pouvant être faite au test t est qu'il s'agit d'un test sensible aux valeurs extrêmes. En effet, dans le cas d'un test non apparié, la statistique de test peut être élevée (et donc une p -value anormalement petite) si le numérateur est grand ou si le numérateur très petit. Ensuite, si le nombre d'échantillon dans chacun des groupes est trop faible il sera peu puissant pour détecter les gènes différentiellement exprimés. Et enfin, l'hypothèse de normalité rend ce test difficilement applicable en l'état aux expériences de puces à ADN [Hatfield et al., 2003; Jeanmougin et al., 2010].

3.2.2 L'analyse de la variance

Lorsque qu'une expérience de puces à ADN implique plusieurs conditions et interactions, l'analyse de variance ou ANOVA, est la méthode la plus appropriée [Kerr et al., 2000]. L'analyse de la variance suppose que la variabilité de la quantité mesurée (l'expression des gènes) peut être divisée en différentes sources identifiables. Parmi les sources de variabilités nous pouvons citer les facteurs expérimentaux et le bruit aléatoire. L'analyse de la variance permet de déterminer si la variabilité due à un facteur particulier, ou une combinaison de facteurs, est statistiquement significative par rapport à la variabilité de mesure des sources aléatoires [Pavlidis, 2003].

Chaque gène est considéré à la fois. Le modèle ANOVA décompose l'expression d'un gène en une somme de termes représentant les contributions (effets) des différents facteurs. Les termes incluent les facteurs du design expérimental et les facteurs relatifs aux conditions biologiques de chaque échantillon [Churchill, 2004].

Dans une ANOVA à deux facteurs le logarithme du niveau d'expression d'un gène est décomposé comme suit :

$$E_{ijk} = \mu + T_i + S_j + (T \cdot S)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \begin{cases} i = 1 \dots n \\ j = 1 \dots m \\ k = 1 \dots p \end{cases}$$

Il s'agit du modèle linéaire de l'expression d'un gène dans k réplicats pour le facteur T à i niveaux et pour le facteur S à j niveaux (traitement reçu et groupe de patients par exemple) avec n et m niveaux respectivement et p réplicats par groupe. μ représente le niveau moyen d'expression du gène et ε le bruit aléatoire, ou l'erreur de mesure, de moyenne 0 et de variance σ^2 . Le niveau d'expression E peut être touché par des effets dus à T , S et à leur interaction $(T \cdot S)$. Les paramètres de ce modèle sont ajustés pour chacun des gènes. La nullité de chacun est testée statistiquement, ce qui donne dans ce modèle trois statistiques avec des p -value correspondantes pour chaque gène.

Il y a un certain nombre d'hypothèses à prendre en compte pour une bonne application de l'ANOVA. Ces hypothèses comprennent l'indépendance, la normalité et l'homogénéité de la variance des erreurs et bien entendu que le modèle linéaire décrive correctement les données. Dans les données de puces à ADN, il y a des gènes pour lesquels les hypothèses seront valables et d'autres pas. Des tentatives de correction pourraient améliorer la situation pour certains gènes et l'aggraver pour d'autres. L'utilisation de méthodes non paramétriques pourrait permettre de s'affranchir de ces hypothèses de départ mais les analyses subiraient une perte de puissance. Dans la pratique, il apparaît que l'ANOVA paramétrique donne d'excellents résultats biologiquement significatifs.

3.2.3 Le test de Wilcoxon

Parmi les tests non paramétriques, l'équivalent du test t sur des données appariées est le test des signes de Wilcoxon (signed-rank test) quand la population ne présente pas une distribution normale des données. Ce test ordonne les valeurs absolues des différences entre les valeurs d'expression mesurées dans chacune des conditions et attribue un rang à chacune d'elles. La somme des rangs signés de ces différences est ensuite calculée et comparée à la table de Wilcoxon pour en déduire la p -value.

Le test de Mann-Whitney (également appelé test U ou test de la somme des rangs de Mann et Withney) est, quant à lui, l'équivalent non paramétrique du test t sur les données non appariées. Les données des deux groupes sont combinées en un seul classement et classées dans un ordre croissant. La statistique obtenue est comparée à la table de Mann-Whitney pour obtenir une p -value.

Ces tests possèdent l'avantage d'être applicables à des données dont la distribution ne suit pas une loi normale ou lorsque l'hypothèse d'égalité des variances dans chacun des groupes n'est pas vérifiée. Toutefois, le test de Wilcoxon requiert une distribution symétrique des données. De plus, ces tests sont globalement moins puissants que leur équivalent paramétrique.

3.2.4 Contrôle du taux d'erreur

Les tests statistiques permettent de trancher entre H_0 et H_1 mais il existe deux risques d'erreurs lors de l'utilisation de tests statistiques pour tester une hypothèse. L'hypothèse H_0 peut être rejetée à tort, c'est à dire que l'on considère qu'il y a une différence significative entre les groupes testés alors qu'il n'y en a pas. Il s'agit du risque α ou risque de 1^{ère} espèce. Lorsqu'un test est appliqué de nombreuses fois comme dans les expériences de puces, il faut considérer le risque d'obtenir des valeurs significatives par hasard. L'hypothèse H_0 peut également être acceptée à tort, c'est à dire qu'on ne considère pas de différence entre les groupes testés alors qu'il y en a une. Il s'agit alors du risque β ou risque de 2^{ème} espèce. Il est possible que cette différence ne soit pas mise en évidence par manque de puissance dans le test utilisé, il est donc parfois nécessaire d'avoir un plus grand jeu de données pour mettre en évidence des différences peu marquées.

	Réalité	
	H_0 vraie	H_0 fausse
Décision	H_0 acceptée	Erreur β
	H_0 rejetée	Erreur α

TAB. 3.1: Les deux risques statistiques α et β .
 α s'énonce quand dans la réalité H_0 est vraie et β s'énonce quand H_1 est vraie.

Il existe des méthodes qui prennent en compte le problème des comparaisons multiples et qui contrôlent les faux positifs. Deux critères sont principalement utilisés : la probabilité globale d'erreur (FWER) qui correspond à la probabilité d'avoir au moins un faux positif et l'espérance du taux de faux positifs (FDR) [Pounds, 2006].

3.2.4.1 Le taux d'erreur globale

Le FWER [Hochberg and Tamhane, 1987] a été le premier critère proposé pour tenir compte de la multiplicité des tests effectués. Il correspond à la probabilité de rejeter à tort au moins une des hypothèses testées (erreur de type I).

La procédure de Bonferroni, la plus connue des procédures permettant le contrôle du FWER, est telle que pour garantir un FWER de niveau α à 5%, tous les tests seront effectués individuellement au niveau α/p , avec p le nombre de tests à effectuer (dans notre cas le nombre de gènes). On voit immédiatement le caractère limitatif d'une telle procédure lorsque p est très grand. D'autres procédures permettent également de contrôler ce risque global mais dépendent toutes du nombre de gènes p étudiés.

3.2.4.2 Le taux de faux positifs

Le FDR (False Discovery Rate), introduit par Benjamini et Hochberg en 1995 [Benjamini and Hochberg, 1995], correspond à l'espérance du taux de faux positifs. Dans une liste d'hypothèses H_0 rejetées (gènes significativement différents entre les conditions testées), le FDR contrôle la proportion attendue d'hypothèses rejetées à tort (faux positifs, erreurs de type I). Le contrôle du FDR est une procédure moins conservatrice avec une meilleure puissance et moins restrictive que le FWER. L'interprétation du FDR n'est cependant pas la même que celle du FWER. En effet, le contrôle du FDR au seuil de 5% permet de conclure qu'en moyenne, le taux de faux positifs est de 5%, sans que sa dispersion soit connue. Dans leur travail original, Benjamini et Hochberg ont présenté une méthode de contrôle du FDR et discuté d'un autre critère, appelé plus tard le pFDR ou « positive False Discovery Rate » par Storey [Storey and Tibshirani, 2003], qui est l'espérance du taux de faux positifs conditionnellement au fait qu'il y ait au moins un positif. Benjamini et Hochberg n'ont pourtant pas considéré ce critère, ne pouvant en assurer le contrôle quelle que soit la configuration. En effet, sous la configuration correspondant à l'hypothèse nulle complète (toutes les hypothèses nulles testées sont vraies), tout résultat significatif est nécessairement un faux positif. Dans ce cas, le pFDR est égal à 1 et il n'est pas possible d'assurer un contrôle pour un seuil plus petit que 1. Storey et Tibshirani ont montré en 2001 que le pFDR (pour une région de rejet donné) est égal à la probabilité pour un gène de ne pas être modifié conditionnellement au fait que sa statistique de test appartienne à la région de rejet considérée. À partir de ce critère, ils ont proposé différentes méthodes d'estimation pour le pFDR. De plus, ils ont montré que lorsque le nombre d'hypothèses testées est grand, la probabilité d'avoir au moins un positif est proche de 1. Les estimations du pFDR et du FDR sont alors équivalentes. Pour cette raison, le terme générique de FDR est souvent utilisé pour désigner le pFDR. Les procédures les plus couramment utilisées pour estimer le FDR sont celles développées par le département de biostatistiques de l'Université de Stanford, et implémentées dans les logiciels SAM et Qvalue [Tusher et al., 2001; Storey and Tibshirani, 2003]. Ces procédures, qui ne font pas d'hypothèse sur les distributions des gènes modifiés, sur-estiment le FDR [Storey and Tibshirani, 2003]. De plus, elles ne permettent pas de calculer la probabilité pour un gène d'être modifié conditionnellement à sa valeur dénommée local FDR par Efron [Efron and Tibshirani, 2002].

3.2.5 Exemple de la méthode SAM

Pour s'adapter au mieux aux dimensions des matrices d'expression (petit n , nombre d'échantillons et large p , nombre de gènes) et afin de répondre aux problèmes statistiques, Tusher *et al.* [Tusher et al., 2001] ont proposé un test t modifié et une estimation du taux de faux positifs (FDR) par permutation. Leur méthode porte le nom de SAM pour « Significance Analysis of Microarrays ». Les auteurs sont partis de plusieurs constatations : lors du calcul d'un test t classique, l'écart-type s au dénominateur est fonction de l'intensité des gènes et peut être très faible si les gènes ne varient pas beaucoup dans l'ensemble de l'expérience, ceci induit donc artificiellement de fortes valeurs de la statistique de test t et ainsi une faible p-value associée et donc de nombreux faux positifs dans les résultats de l'analyse. Par ailleurs, en considérant la définition d'une p-value classique, si un gène a 5% de chance d'avoir une p-value inférieure à 0,05 par le simple fait du hasard, alors si l'on analyse 10 000 gènes pour lesquels on a les résultats de puces à ADN, on peut s'attendre à trouver à tort dans les résultats environ 500 gènes différentiellement exprimés par hasard.

Le test t utilisé dans SAM est modifié de telle sorte que le dénominateur ne soit pas trop sensible aux faibles valeurs de s , réduisant ainsi le taux de faux positifs. Il fait intervenir une constante S_0 qui diminue le poids de l'écart-type dans le calcul du score.

$$t_{SAMi} = \frac{\bar{x}_{1i} - \bar{x}_{2i}}{S + S_0}$$

où $S = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_{1i}^2 + (n_2 - 1)s_{2i}^2}{n_1 + n_2 - 2}}$ avec n_1 et n_2 le nombre d'échantillons par groupe.

De plus, afin d'estimer la proportion de faux positifs, SAM effectue un calcul de FDR en calculant pour chaque gène un grand nombre de statistique t_{SAM} en permutant aléatoirement des échantillons dans les classes. Ce t_{SAM} attendu est comparé au t_{SAM} observé afin de déterminer si la différence observée est due au hasard ou non. L'utilisateur choisit un paramètre Δ qui permet de faire un compromis entre les gènes différentiellement exprimés et le nombre de faux positifs, afin de fixer la limite à partir de laquelle les gènes sont considérés comme statistiquement pertinents. Plus le Δ est grand plus le FDR est faible, mais plus le risque d'avoir des faux-négatifs augmente également.

Ce test statistique peut être appliqué sur les données en utilisant les packages R *SAMR* [Tibshirani et al., 2010] ou *SIGGENES* [Schwender, 2009] disponibles dans Bioconductor [Gentleman et al., 2004].

3.2.6 Statistique bayésienne empirique

Cette méthode consiste à développer le modèle hiérarchique proposé par Lönnstedt and Speed [Lönnstedt and Speed, 2002] qui dérive la probabilité a posteriori d'une expression différentielle en utilisant un simple modèle hiérarchique paramétrique. Smyth *et al.* [Smyth, 2004] développe ce modèle hiérarchique pour une approche pratique dans l'analyse de puces à ADN. Il est remis dans le contexte de modèles linéaires avec des coefficients arbitraires et des contrastes d'intérêt. Des estimateurs fixes sont dérivés des hyperparamètres dans le modèle afin que ces estimateurs proposés soient robustes même pour des petits jeux de données et permettent également l'analyse de données incomplètes suite à des filtrages. La statistique de probabilité a posteriori est reformulée en une statistique t modérée dans laquelle des écarts-types résiduels à posteriori sont utilisés

au lieu de simples écarts-types. L'approche bayésienne empirique équivaut à un rétrécissement des écarts-types estimés de l'échantillon vers une estimation globale, résultant en une inférence beaucoup plus stable lorsque le nombre d'échantillons est faible. L'utilisation d'un test t modéré permet d'avoir un nombre d'hyperparamètres à estimer réduits comparé aux calculs de probabilités à posteriori. La statistique t modérée suit une distribution t avec un plus grand nombre de degrés de liberté.

Ce test statistique peut être appliqué sur les données en utilisant le package R *LIMMA* [Smyth, 2004, 2005] disponible dans Bioconductor [Gentleman et al., 2004].

Cette méthode a souvent été décrite comme étant la méthode la plus précise et robuste dans l'analyse de gènes différentiellement exprimés [Jeffery et al., 2006; Murie et al., 2009; Jeanmougin et al., 2010].

3.3 Analyse d'enrichissement

La plus grosse difficulté en sortie de ces analyses est d'exploiter correctement les longues listes de gènes candidats. En effet il n'est pas rare de mettre en évidence des listes de plusieurs centaines de gènes qu'il n'est pas possible d'analyser correctement manuellement. Afin de faire ressortir des messages biologiques de ces listes, la mise en relation de la fonction des gènes ou les voies métaboliques les impliquant est nécessaire. Si l'analyse du transcriptome par la technologie des puces à ADN offre un aperçu des corrélations entre l'expression des gènes et les phénomènes biologiques elle ne permet pas à elle seule d'identifier au sein de ces longues listes de gènes la causalité des mécanismes de régulation [Quackenbush, 2003].

Il est donc nécessaire d'intégrer à ces données d'expression des informations concernant les gènes issus de sources différentes. Diverses bases de données ont été développées afin de mettre à disposition de la communauté des ontologies pour annoter les gènes et ainsi pouvoir les regrouper en termes de fonctions ou de localisation cellulaire par exemple. Dans cette partie, nous avons choisi de présenter deux bases de données renommées et très utilisées ainsi que deux méthodes largement utilisées pour extraire de l'information biologique des listes de gènes candidats.

3.3.1 La « Gene Ontology »

À l'origine, ontologie désigne l'étude des propriétés générales de ce qui existe. Par analogie, le terme est repris en informatique où une ontologie correspond à un ensemble structuré de termes et concepts. Les concepts sont organisés dans un graphe dont les relations peuvent être des relations sémantiques ou des relations de composition et d'héritage (au sens objet). L'objectif premier d'une ontologie est de modéliser un ensemble de connaissances dans un domaine.

Le projet « Gene Ontology » (GO)¹ est un projet bioinformatique mis en place par le Gene Ontology Consortium [Consortium. et al., 2000] qui a pour but de standardiser la façon de décrire les gènes et le produit des gènes à travers les espèces et les bases de données. Le projet intègre un vocabulaire contrôlé de termes pour décrire les annotations des gènes afin que les divers membres du projet utilisent le même langage pour décrire les mêmes choses.

¹<http://www.geneontology.org/>

La base de données GO peut être divisée en trois sous groupes : les composants cellulaires (cellular component), les fonctions moléculaires (molecular function) et les processus biologiques (biological process).

L'ontologie des composants cellulaires décrit la localisation de la forme active du produit du gène, au niveau des structures sub-cellulaires et des complexes macromoléculaires. La description correspond à un composant d'une cellule, mais à la condition qu'il fasse partie de composés plus grand. Ce peut être une structure anatomique (par exemple, le réticulum endoplasmique ou le noyau) ou un groupe de produits de gènes (par exemple le ribosome ou le protéasome). Les fonctions moléculaires décrivent les activités élémentaires du produit du gène au niveau moléculaire comme l'activité catalytique ou enzymatique. Elles correspondent généralement aux activités des produits individuels des gènes, mais certaines activités sont réalisées par des complexes de produits de gènes. Les processus biologiques sont les ensembles des événements moléculaires pertinents pour le fonctionnement des unités de vie : cellules, tissus, organes et organismes. Cela fait référence à la finalité biologique à laquelle un gène ou le produit d'un gène participe comme la croissance cellulaire ou l'apoptose. Il peut être difficile de distinguer le terme processus biologique avec le terme fonction moléculaire, mais la règle générale est que le processus biologique est le résultat d'une ou plusieurs fonctions moléculaires associées.

Les trois ontologies sont structurées sous forme d'un graphe orienté (Fig. 3.2). Chaque terme GO peut être un « enfant » de un ou plusieurs « parents ». En effet, les produits d'un gène possèdent une ou plusieurs fonctions biochimiques. Le terme enfant est toujours plus spécifique que le ou les termes parents. La relation entre un enfant et son parent peut être du type « est un » lorsque le terme enfant est une instance du terme parent. Elle peut aussi être de la forme « fait partie de », si le terme enfant est un élément du parent. Si un terme a plusieurs parents, il peut avoir différentes relations avec chacun de ses parents. Néanmoins, une des contraintes de GO est le respect de la règle « True Path Rule » : si le terme enfant décrit un produit de gène alors tous ses termes parents doivent aussi pouvoir s'appliquer à ce même produit de gène même si c'est de façon moins précise.

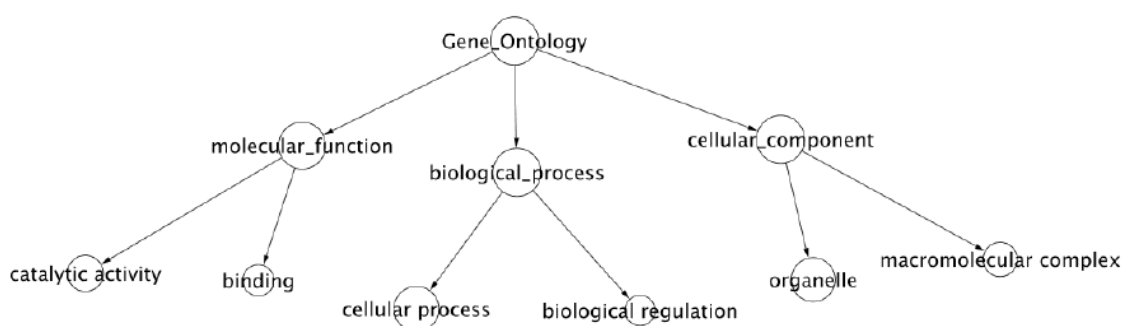


FIG. 3.2: La base de données GO est un réseau de parents/enfants organisé comme un arbre. Plus on descend dans le réseau plus on est précis dans la description du produit du gène.

Les annotations peuvent être plus ou moins fiables en fonction de leur provenance. Une annotation provenant d'une référence scientifique, expérimentale aura plus de poids

qu'une annotation informatique automatique basée sur des similitudes de séquence ou de structure. Toutes ces informations sont organisées de manière à pouvoir utiliser des outils qui permettent de mettre en évidence des catégories ontologiques significativement sur-représentées dans une liste de gènes. On parle alors d'enrichissement ontologique par rapport à la liste de départ qui décrit tous les gènes analysés sur la puce ou bien l'ensemble des catégories ontologiques du génome étudié.

3.3.2 La base de données KEGG

Connaître la fonction et la localisation des produits des gènes sont effectivement indispensables mais pas suffisantes pour expliquer les interactions génétiques et moléculaires. En effet, les annotations stockées dans la base de données GO sont des annotations individuelles gènes à gènes et n'indiquent en aucun cas les relations existantes entre les produits de ces gènes. C'est pour cela que des banques de données comportant des informations sur les voies de signalisation et les voies métaboliques dans la cellule ont été développées. La connaissance de ces voies d'interactions moléculaires permet de relier les gènes d'intérêt obtenus à des voies de signalisation. En effet dans une même voie de signalisation, on peut considérer un effet identique de gènes différents, ce ne sont pas toujours les mêmes gènes qui sont altérés en fonction des échantillons alors qu'ils sont tous impliqués dans la même voie de signalisation.

L'accumulation de nombreuses altérations et mutations dans les génomes des cellules tumorales est à la base de la complexité des cancers. La conséquence de ces altérations est bien entendu la dérégulation de nombreuses voies de signalisation impliquées dans le contrôle des fonctions cellulaires. Les analyses haut-débit permettent de lier la dérégulation de ces voies de signalisation avec des stratégies pronostiques ou thérapeutiques [Bild et al., 2006]. La découverte de ces voies impliquées dans différents types de cancer permet ensuite de pouvoir guider le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Parmi les différentes bases de données qui stockent cette information, la première et la plus connue est la base de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)² [Ogata et al., 1999]. KEGG est la fois une base de données rassemblant un très grand nombre de voies métaboliques connues à ce jour et décrites sous forme d'images facilement utilisables et compréhensibles (Fig. 3.3), mais cette base est également disponible sous forme informatique et peut être utilisée de manière automatique par l'intermédiaire d'autres outils d'analyse.

²<http://www.genome.jp/kegg/>

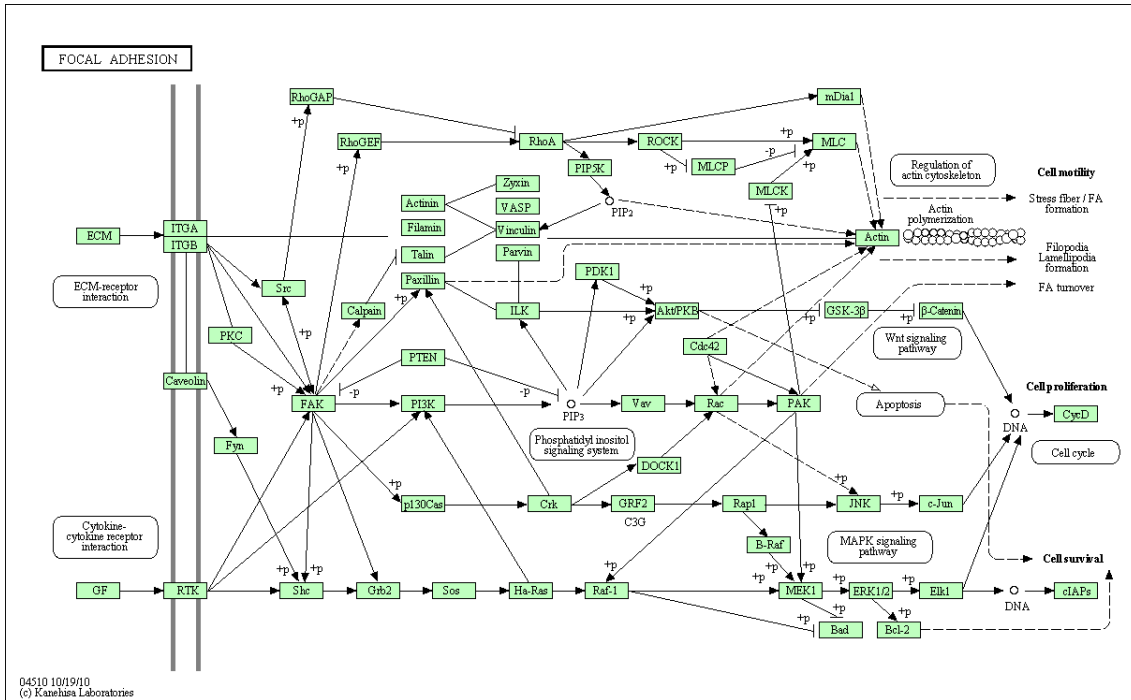


FIG. 3.3: La base de données KEGG rassemble de nombreuses voies métaboliques. Exemple de la voie de l'adhésion focale.

3.3.3 Les Tests Hypergéométriques

Une solution possible afin d'organiser les gènes d'intérêt mis en évidence lors d'une analyse différentielle, est d'utiliser les tests hypergéométriques qui sont basés sur une méthodologie simple.

Prenons une catégorie de gènes (par exemple GO :0005925 focal adhesion) notée C qui regroupe N_c gènes sur un total de N gènes présents sur la puce à ADN. La fréquence de cette catégorie est défini par $\pi_c = \frac{N_c}{N}$.

Une expérience met en évidence n gènes différentiellement exprimés dont n_c appartiennent à C . La fréquence de la catégorie C dans ce sous-groupe de gènes est définie par $\pi_e = \frac{n_c}{n}$.

L'enrichissement sera défini par $v_c = \frac{\pi_e}{\pi_c}$. Le test d'enrichissement doit déterminer si l'enrichissement observé dans le groupe de gènes d'intérêt est significatif par rapport à un tirage au hasard qui correspond à l'hypothèse nulle.

Les tests hypergéométriques permettent de répondre à cette question en se basant sur la formule suivante pour déterminer la probabilité d'avoir n_c gènes dans n :

$$P(n_c | n) = \frac{C_{N_c}^{n_c} \cdot C_{N-N_c}^{n-n_c}}{C_N^n}$$

Plusieurs packages R comme *GOstats* [Falcon and Gentleman, 2007] ou *topGO* [Alexa and Rahnenfuhrer, 2009] sont disponibles dans Bioconductor [Gentleman et al., 2004] afin de réaliser facilement des études d'enrichissement des catégories GO ou KEGG à partir d'une liste de gènes d'intérêt.

3.3.4 L'outil GSEA

Parmi les outils disponibles pour associer des fonctions biologiques aux gènes mis en évidence lors de comparaison de classes, on peut retenir GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) [Subramanian et al., 2005] (Fig. 3.4). Sa puissance réside dans le fait qu'il n'est pas nécessaire d'appliquer un seuil arbitraire pour analyser une liste, cette dernière pouvant être considérée dans son ensemble. Les gènes sont ordonnés dans une liste L par corrélation décroissante de leur expression avec la réponse testée. Si on considère S comme un ensemble de gènes définis par les ontologies, comme par exemple les gènes impliqués dans l'apoptose, le but de GSEA est de déterminer si les membres de S sont aléatoirement distribués dans L ou retrouvés essentiellement en tête ou en queue de liste (c'est à dire corrélés à la réponse). Le score ES (Enrichment Score) reflète le degré de sur-représentation des membres de S à un des extrêmes (haut ou bas de liste) de la liste entière L .

Le score ES est calculé pour chaque ensemble de gènes S appartenant à un groupe biologique choisi. En considérant séquentiellement les gènes de la liste L , le score est incrémenté d'une certaine valeur à chaque fois qu'un gène de l'ensemble S est rencontré, et décrémenté à chaque fois qu'un gène qui n'appartient pas à l'ensemble S est rencontré. L'incrément dépend de la corrélation entre la position du gène dans la liste et l'association au phénotype. Afin de déterminer si le score ES pour une ontologie S est significatif, ce score est par ailleurs calculé 1000 fois en ayant au préalable à chaque fois permuté aléatoirement l'ordre des gènes dans la liste, et le score ES est ainsi comparé à la distribution des 1000 scores ES aléatoires. La permutation des phénotypes préserve la structure de corrélation des gènes au sein de S . La dernière étape consiste à normaliser chaque score $ES(S)$ en NES pour prendre en compte la taille de S et donc rendre comparable tous les scores entre eux puis estimer la proportion de faux positifs sur l'ensemble des jeux sélectionnés.

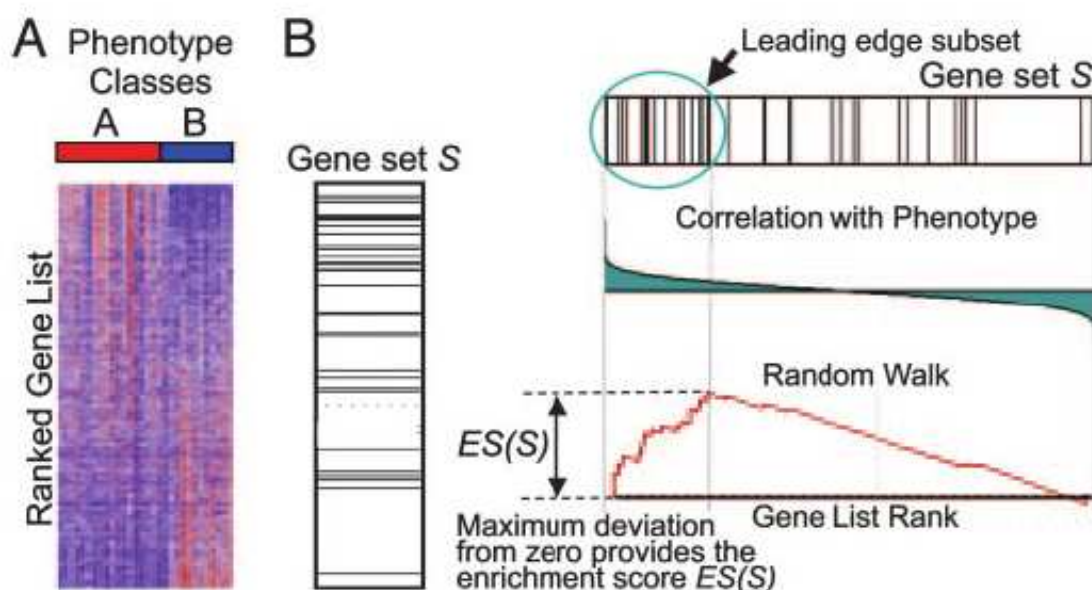


FIG. 3.4: Analyse de type GSEA [Subramanian et al., 2005]

Les ensembles de gènes S utilisés dans GSEA sont assez nombreux et ne se limitent pas aux annotations de la Gene Ontology. Différents catalogues disponibles dans la base de données MSigDB du Broad Institute³ peuvent être utilisés dans GSEA. Ces ensembles sont divisés en cinq grandes collections : des ensembles créés selon la localisation des gènes (chromosomes et cytoband), des ensembles de gènes impliqués dans des voies de signalisation (KEGG...), des ensembles sur les motifs de régulation, des ensembles de gènes définis de façon automatique selon leur implication potentielle dans des cancers, des ensembles issus de la base de données GO.

3.4 Analyse de survie

Les méthodes d'analyse de survie permettent d'associer la fréquence et le délai de survenue d'un événement étudié. Ces méthodes doivent leur qualificatif au fait qu'elles ont d'abord été utilisées en cancérologie, où la survie des patients, c'est-à-dire le temps s'écoulant entre le début du traitement et la survenue du décès, était un des critères d'efficacité du traitement.

Prédire la probabilité de survenue de délai d'apparition de métastases ou de décès chez les patients sur la base de leur profil d'expression peut se révéler d'une importance considérable dans la compréhension et le traitement des cancers. Ces modèles de prédiction sont surtout intéressants lorsqu'ils apportent une information complémentaire aux classifications cliniques, anatomopathologiques et biologiques déjà établies.

Les méthodes d'analyse de survie permettent de décrire la survie (taux et délai de survenue de l'événement étudié) dans un ou plusieurs groupes ; de déterminer la probabilité de survenue d'un événement dans un délai fixé ; de comparer cette probabilité entre différents groupes et de mesurer l'influence d'une variable explicative sur cette probabilité.

Dans cette partie, après avoir défini les termes importants dans ce type d'étude (Fig. 3.5), nous verrons certaines méthodes communément employées.

3.4.1 Définitions

Date de point C'est la date à laquelle on décide d'analyser les résultats.

Date d'origine C'est le point de départ à partir duquel le sujet est observé. Ce peut être la date de diagnostic, la date de début du traitement, la date de randomisation, etc. Le point de départ est défini de la même manière pour tous les sujets, mais la date bien sûr varie d'un sujet à l'autre.

Date des dernières nouvelles C'est la date à laquelle on a eu pour la dernière fois des nouvelles du sujet. Il peut s'agir de la date du décès ou de survenue de l'événement étudié (guérison, métastases, récurrence). Il peut s'agir également de date de la dernière consultation si le sujet n'a pas présenté l'événement étudié ou si le sujet est perdu de vue.

³<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>

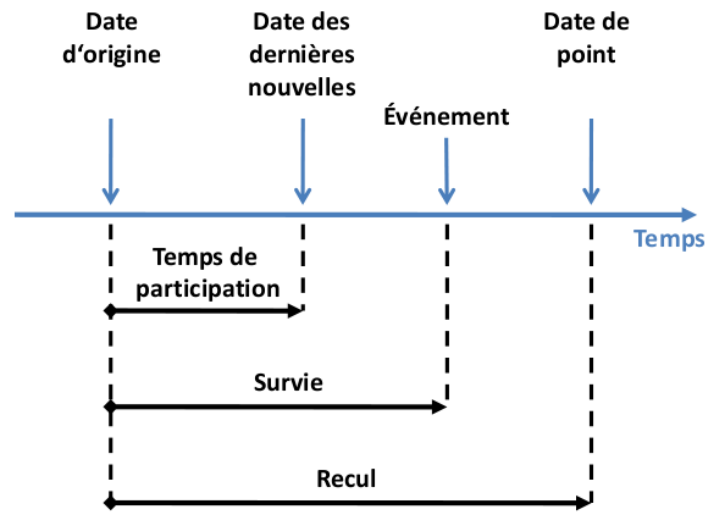


FIG. 3.5: Schéma symbolisant les principales notions utilisées dans les analyses de survie

Etat aux dernières nouvelles Aux dernières nouvelles, le sujet est décédé ou vivant, est guéri ou non guéri, a présenté un événement métastatiques ou non...

Recul C'est le délai écoulé entre la date d'origine et la date de point.

Données censurées à droite On parle de données censurées à droite quand l'événement étudié n'a pas été observé à la date de point. On sait alors seulement que le délai exact de survenue de l'événement étudié (non observé) est supérieur ou égal au temps de participation. Par ailleurs, il peut arriver que l'événement se soit produit avant la date de point sans qu'il soit possible d'en connaître la date exacte. L'observation est dite censurée à gauche. C'est-à-dire que le véritable délai de survie du patient est inférieur au délai d'observation. Le plus souvent on se trouve dans les conditions de censure à droite et c'est ce cas qui sera traité dans ce chapitre.

Temps de participation C'est le temps écoulé entre la date de dernière nouvelle et la date d'origine si la date de dernières nouvelles est antérieure à la date de point et le temps écoulé entre la date de point et la date d'origine sinon.

Médiane de survie C'est le délai à l'issue duquel 50% des sujets sont encore en vie ou 50% des sujets présentent l'événement étudié.

3.4.2 Les courbes de survie et la méthode de Kaplan-Meier

Il n'est pas possible d'estimer de façon simple la proportion de patients présentant l'événement étudié x jours après la date d'origine à moins de raisonner en terme de probabilités. Dans une courbe de survie, l'axe des ordonnées est étalonné de 0 à 1 et représente les probabilités que l'événement étudié ne se produise pas pour une période déterminée, et l'axe des abscisses représente le délai (en jours, mois...) écoulé depuis la date d'origine.

La méthode de Kaplan et Meier [Kaplan and Meier, 1958] est la méthode la plus utilisée actuellement. Dans cette méthode, la survie est estimée à chaque temps d'événements et est supposée constante entre chaque temps d'événements, ce qui va donner à la courbe un aspect en « marche d'escalier ». La longueur des marches est déterminée par le délai écoulé entre la survenue de chacun des 2 épisodes successifs de l'événement étudié et la hauteur des marches par la différence entre les probabilités de survenue de 2 épisodes.

La représentation de plusieurs courbes sur le même graphique permet de représenter visuellement la survie de plusieurs groupes distincts de patients (Fig. 3.6).

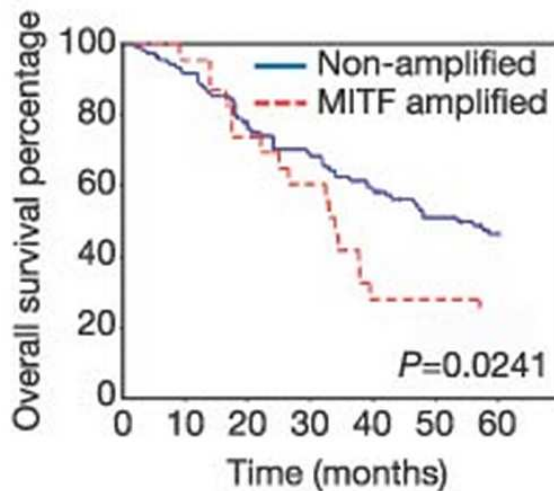


FIG. 3.6: Exemple de courbe de Kaplan-Meier d'après Garraway et al. [Garraway et al., 2005] représentant une analyse de survie chez des patients avec un mélanome métastatique et présentant ou non une amplification du gène MITF.

Mathématiquement, cette méthode définit une fonction de survie S_t qui donne la probabilité de survie jusqu'à un instant t donné. Si l'on considère V_i le nombre de vivants, D_i le nombre de décès et E_i le nombre d'exclus pendant l'intervalle $t_i - t_{i-1}$, alors la probabilité de décès q_i pendant cet intervalle sera égale à $q_i = \frac{D_i}{V_i - E_i}$ et la probabilité de survie p_i pendant ce même intervalle sera égale à $p_i = 1 - q_i$.

La fonction de survie S_i à l'instant t_i sera donc égale à $S_i = p_0 p_1 \dots p_i$

3.4.3 Comparaison de courbes de survie

Deux méthodes sont principalement employées pour comparer des courbes de survie dans leur ensemble : le test du logRank et le modèle de Cox. Le test du logRank ne

permet de prendre en compte qu'un seul facteur alors que le modèle de Cox permet d'étudier simultanément plusieurs facteurs.

3.4.3.1 Test du logRank

Le test du logRank a été décrit par Mantel [Mantel, 1966]. Le principe de ce test (sous l'hypothèse que la survie des deux groupes est la même) est que si pour un jour donné, la moitié des patients observés sont dans le groupe A et la moitié dans le groupe B , alors en moyenne la moitié des événements devrait survenir dans le groupe A et la moitié dans le groupe B , à moins que le traitement A soit beaucoup moins efficace que le traitement B , ou l'inverse. Ainsi, on recense dans chacun des 2 groupes le nombre observé de décès (D_A et D_B) pendant une période considérée. On détermine ensuite le nombre estimé de décès que l'on devrait observer si la mortalité était la même dans les 2 groupes (E_A et E_B). On compare D_A à E_A , D_B à E_B au moyen d'un test du χ^2 dont l'interprétation se lit dans une table à un degré de liberté (1 ddl). Si l'on compare k courbes de survie, on utilise alors un test du χ^2 avec $(k - 1)$ ddl.

Le test du logRank permet également de calculer, dans chaque groupe, le taux relatif de décès ($\frac{D}{E}$). Le rapport des taux relatifs de décès de chacun des 2 groupes s'appelle le risque relatif (RR). Cela permet de conclure que le risque de décès dans le groupe A est X fois supérieur à celui dans le groupe B .

$$RR = \frac{\frac{D_A}{E_A}}{\frac{D_B}{E_B}}$$

La puissance du test du logRank est fonction du nombre d'événements observés dans les groupes et du risque relatif observé entre les groupes. Un nombre d'événements trop faible pourra engendrer l'erreur de considérer qu'il n'y a pas de différence entre les groupes alors qu'il y en a une. Une étude incluant un grand nombre de patients est toujours préférable.

Par ailleurs, comme pour les autres tests statistiques, il faut veiller à considérer le risque d'obtenir des valeurs significatives par hasard lorsqu'un test est appliqué de manière répétée. Dans ce cas, une approche plus appropriée est l'analyse multivariée comme le modèle de Cox.

3.4.3.2 Modèle de Cox

Le modèle de régression de Cox [Cox, 1972] est un modèle multivarié qui permet d'exprimer la relation entre le risque instantané de survenue de l'événement étudié et des facteurs de risque exprimés sous la forme de variables qualitatives ou quantitatives, notées X . Il permet d'étudier la relation entre le temps d'apparition d'un événement (par exemple le décès) et un ensemble de variables explicatives (par exemple les gènes) en présence de censure (en effet, s'il n'y a pas de censure, un modèle de régression logistique peut aussi être utilisé).

Le modèle de Cox permet donc d'exprimer le risque instantané λ (probabilité d'apparition de l'événement dans un intervalle de temps) de survenue de l'événement en fonction du temps t et des variables X et s'exprime sous la forme :

$$\lambda(t, X_1, X_2, \dots, X_p) = \lambda_0(t) \exp\left\{\sum_{i=1}^p \beta_i X_i\right\}$$

L'intérêt du modèle repose sur l'association entre les variables X et la survenue de l'événement étudié et correspond à déterminer les coefficients β .

Si les variables X pour deux classes prennent des valeurs 0 ou 1, le rapport des risques des sujets de la classe 1 par rapport à ceux de la classe 0 correspond à :

$$\frac{\lambda(t,1)}{\lambda(t,0)} = e^{\beta}$$

avec le coefficient β qui représente le logarithme du risque instantané relatif de la classe 1 par rapport à la classe 0. Ces coefficients β représentent l'effet de la caractéristique X choisie. Si β est nul, X n'a pas d'influence sur l'événement étudié, si β est positif, X est associée à un risque plus élevé et inversement si β est négatif.

Le principe du modèle de Cox consiste donc à estimer ces coefficients β en testant l'hypothèse que le vecteur des effets $(\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p)$ est nul (en utilisant par exemple le test de Wald).

Dans nos données haut débit, l'utilisation d'un modèle de Cox permettra de comparer ce qu'apporte la connaissance de l'expression d'un ou plusieurs gènes en regard de facteurs cliniques prédictifs déjà connus. Ce modèle suppose cependant, comme tout modèle de régression linéaire multiple, qu'il y ait plus d'observations que de variables, des données complètes et des variables non fortement corrélées entre elles, ce qui est difficile à satisfaire dans la pratique. Lors de l'application de ce modèle à l'analyse de puces ADN, la recherche de prédicteurs biologiques liés à la durée de survie suppose de prendre en compte l'expression de milliers de gènes pour généralement seulement quelques dizaines d'individus. Des sélections doivent donc être effectuées au préalable.

Chapitre 4

Les mélanocytes et les mélanomes

Après avoir abordé les principales caractéristiques des cellules tumorales dans le chapitre 1, nous allons nous intéresser à un type de cellules particulières qui sont les mélanocytes puis à leur transformation en mélanome.

Les mélanocytes font partie des cellules pigmentées de l'organisme. Ces cellules pigmentées ont pour origine la crête neurale et jouent un rôle crucial dans l'organisme aussi bien au niveau de la peau, avec un rôle protecteur contre les ultraviolets qu'au niveau d'autres organes tels que l'œil, l'oreille interne ou les méninges.

Nous allons dans un premier temps nous intéresser à l'origine de ces mélanocytes, puis à la description des organes où ils se localisent. Nous aborderons ensuite les pathologies impliquant des mélanocytes de l'œil, puis nous décrirons plus en détail le mélanome de la choroïde qui est la pathologie étudiée dans cette thèse. Après avoir décrit la pathologie en général nous aborderons les aspects moléculaires.

Il existe quatre types de mélanomes différents : les mélanomes cutanés, acraux, muqueux et uvéaux. Les mélanomes cutanés représentent la plus grande partie des mélanomes (75%) et les 3 autres types sont des tumeurs plus rares et représentent chacun 5% des mélanomes totaux. Le mélanome cutané est le mélanome le plus étudié, en revanche le mélanome uvéal est moins bien décrit, bien qu'étant la tumeur intra-oculaire la plus fréquente chez l'adulte. Même si l'origine embryologique et les gènes impliqués dans leur développement sont les mêmes, il s'agit de deux entités carcinologiques différentes. Nous utiliserons les connaissances sur le mélanome cutané pour décrire le mélanome uvéal et ses spécificités.

En plus des mélanocytes, il existe d'autres cellules pigmentées dans notre organisme, qui ont une origine embryonnaire différente. Ces cellules sont issues du tube neural (système nerveux central) et elles correspondent aux cellules de la rétine pigmentaire qui tapissent le fond de l'œil. Ces cellules n'étant pas impliquées dans les mélanomes uvéaux nous ne les décrivons que brièvement lors de la description de l'œil.

4.1 Origine des Mélanocytes

Le développement embryonnaire est le résultat de la mise en place de trois feuillets : l'endoderme, à l'origine des viscères ; le mésoderme à l'origine des muscles et du squelette ; l'ectoderme, à l'origine du système nerveux et de la peau.

Les cellules pigmentées de l'organisme, hormis les cellules de la rétine pigmentaire

(qui proviennent du neuroectoderme), sont issues des crêtes neurales [Douarin et al., 1992]. Il s'agit d'une structure embryonnaire transitoire et la formation des crêtes neurales va se faire pendant l'étape de neurulation. Les bords de la plaque neurale récemment formée vont s'épaissir et former les bourrelets neuraux qui délimitent la gouttière neurale (Fig. 4.1). Les bords de la gouttière vont se rapprocher pour se transformer en tube neural. Au moment de la fermeture du tube neural, des amas de cellules se détachent de la plaque neurale, constituant ainsi les crêtes neurales. Ces cellules se retrouvent au milieu de l'interaction tube neural et ectoderme de surface (Fig. 4.1 c).

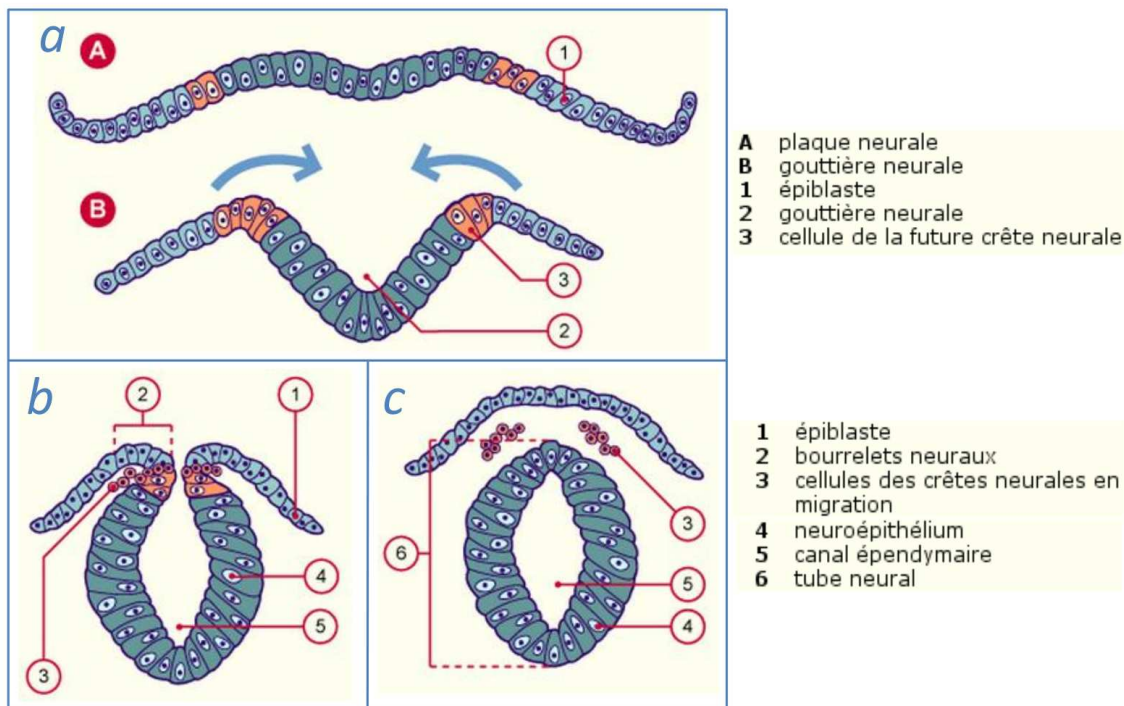


FIG. 4.1: Formation des crêtes neurales. **a** - Début de la neurulation dans la région cervicale avec ébauche de formation de la gouttière neurale. Les flèches indiquent le sens du plissement latéral. En orange les cellules des futures crêtes neurales. **b, c** - Formation à partir de la plaque neurale de la gouttière neurale et finalement du tube neural. Des amas de cellules (orange) se détachent de la plaque neurale, constituant les crêtes neurales. En quittant le neuroépithélium les cellules des crêtes neurales perdent leur caractère cohésif. Figures et légende d'après <http://embryology.ch>

Les cellules des crêtes neurales sont pluripotentes et outre les cellules pigmentées, elles sont à l'origine d'un grand nombre de types cellulaires différenciés (Fig. 4.2) tels que les cellules gliales, adrénérgiques, cartilagineuses et les neurones. On peut distinguer quatre sources de cellules selon l'axe rostro-caudal qui sont les crêtes neurales céphalique, vagale, troncale et lombo-sacrée. Les cellules céphaliques fournissent la majeure partie du tissu mésenchymateux, du squelette crânien, la totalité du système nerveux central et la quasi-totalité du système sensitif et des mélanocytes. Les cellules vagales fournissent le système nerveux entérique. Les cellules troncales fournissent des mélanocytes, les ganglions sympathiques et sensitifs, les cellules de la medulla de la glande

surrénale. Enfin, les cellules lombo-sacrées fournissent le système nerveux intestinal.

Il existe des différences de migration entre ces quatre groupes de cellules. Les cellules de la crête neurale céphalique migrent en masse comparées à celles de la crête neurale troncale et répondent à des facteurs différents [Théveneau et al., 2007]. Ces spécificités pourraient expliquer les différences observées dans la transformation cancéreuse des mélanocytes cutanés et uvéaux.

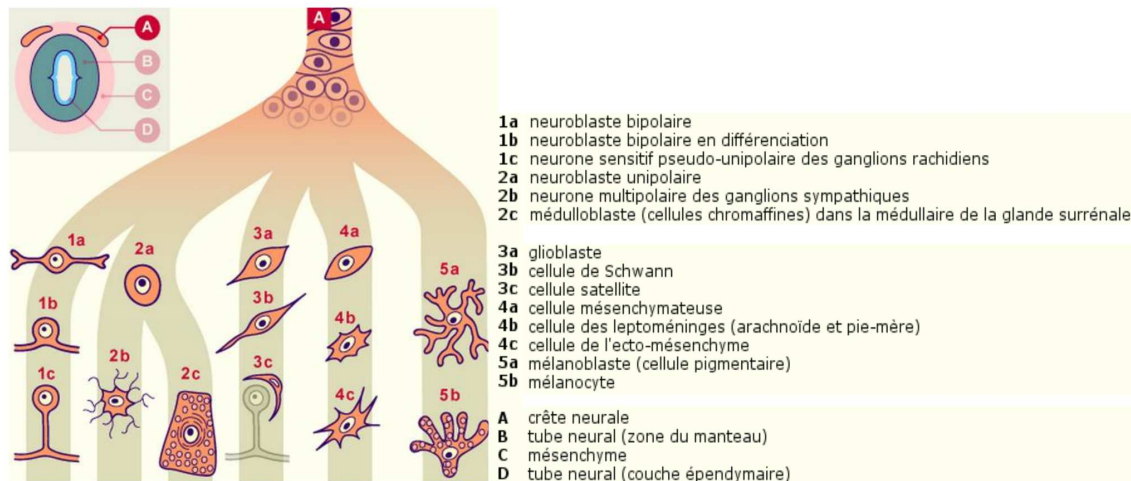


FIG. 4.2: Cellules dérivées des crêtes neurales. De la crête neurale proviennent les neuroblastes du système nerveux périphérique, les glioblastes de la glie périphérique, les médulloblastes, les mélanoblastes, les cellules de l'ectomésenchyme de la région céphalique, les cellules des leptoméninges. Les cellules de la microglie sont des cellules particulières dont l'origine est éloignée des autres cellules gliales : ce sont des macrophages cérébraux.

Figure et légende d'après <http://embryology.ch>

4.2 Description anatomique

Les mélanocytes cutanés et uvéaux ont des fonctions différentes dans l'organisme et leur transformation présente également des différences. Étant donné que les mélanomes cutanés sont bien plus étudiés que les mélanomes uvéaux, nous comparerons ces différences dans la partie où nous décrivons les tumeurs. Dans cette section, avant de décrire l'œil, nous décrivons brièvement la peau afin de localiser les mélanocytes dans cet organe.

4.2.1 La Peau

4.2.1.1 Organisation

La peau est un organe complexe constitué de trois couches tissulaires (Fig. 4.3) d'origines embryonnaires différentes. Elle permet de maintenir un équilibre hydrique, la température du corps, l'homéostasie du milieu interne et joue un rôle de barrière contre les agents pathogènes ou toxiques, les chocs, les ultraviolets.

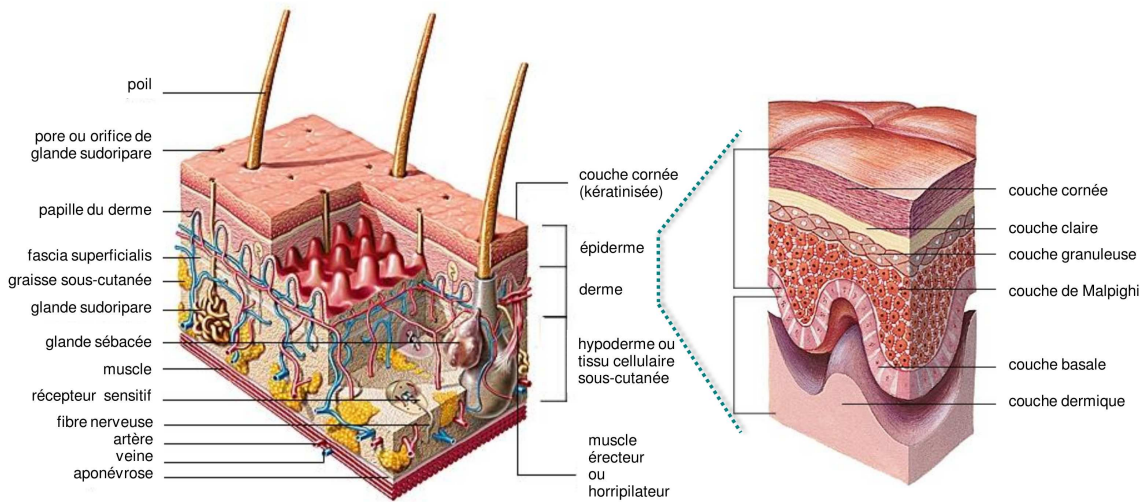


FIG. 4.3: Structure de la peau avec les différentes couches et un agrandissant sur le derme et l'épiderme où sont localisés les mélanocytes.
D'après *larrousse.fr*

De la couche inférieure à la couche superficielle elle est constituée de l'hypoderme, du derme et de l'épiderme.

L'hypoderme est la couche la plus profonde. Il s'agit d'un tissu conjonctif lâche d'origine mésoblastique. Le mésoblaste est le feuillet embryonnaire (sur les trois), qui au cours de la gastrulation s'invagine et se positionne entre l'ectoderme et l'endoderme (les deux autres). En dérive notamment : la musculature, le squelette, le tissu conjonctif, le sang et l'appareil circulatoire, l'appareil urogénital... L'hypoderme est principalement constitué d'adipocytes spécialisés dans le stockage des graisses. Elle joue le rôle d'amortisseur et protège les organes internes des chocs.

Le derme d'origine mésoblastique est un tissu dense et irrégulier, lui même composé de deux couches. En profondeur, une couche plus épaisse, le derme réticulaire est constitué de collagène et d'élastine. La couche superficielle, plus fine correspond au derme papillaire et est composé de tissu conjonctif lâche. Le derme est un tissu richement vascularisé et innervé où les fibroblastes et les mastocytes sont majoritairement représentés.

L'épiderme est la couche la plus superficielle. Il s'agit d'un épithélium de revêtement stratifié d'origine ectoblastique, non vascularisé mais innervé. L'ectoderme correspond au feuillet externe dont dérivent en plus de l'épiderme, le système nerveux et les organes des sens. L'épiderme est composé de quatre types cellulaires différents : les kératinocytes (cellules épidermiques majoritaires), les mélanocytes, les cellules de Merkel et les cellules de Langherans appartenant au système immunitaire et assurant la protection contre les agents pathogènes. Il est stratifié en quatre couches. La plus profonde correspond à la lame basale, puis se trouve la couche muqueuse, la couche granuleuse et

enfin la plus superficielle la couche cornée. Plus on s'approche de la couche cornée plus l'épiderme est riche en kératinocytes. Le rôle de l'épiderme est de protéger l'organisme des agressions extérieures.

4.2.1.2 Rôle des mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques, localisées dans la couche épidermique de la peau où ils sont en contact avec les kératinocytes et représentent 5 à 10% des cellules. Ils synthétisent les pigments mélaniques responsables de la coloration de la peau. Les mélanines produites peuvent être des eumélanines de couleur brune ou noire ou des phéomélanines de couleur jaune orangé [Hunt et al., 1995]. Le mélange de ces deux types de mélanines donne la couleur de la peau et des cheveux. Cette synthèse s'effectue dans des organites spécialisés, les mélanosomes dont la maturation est classifiée en quatre stades morphologiques [Marks and Seabra, 2001] (Fig. 4.4).

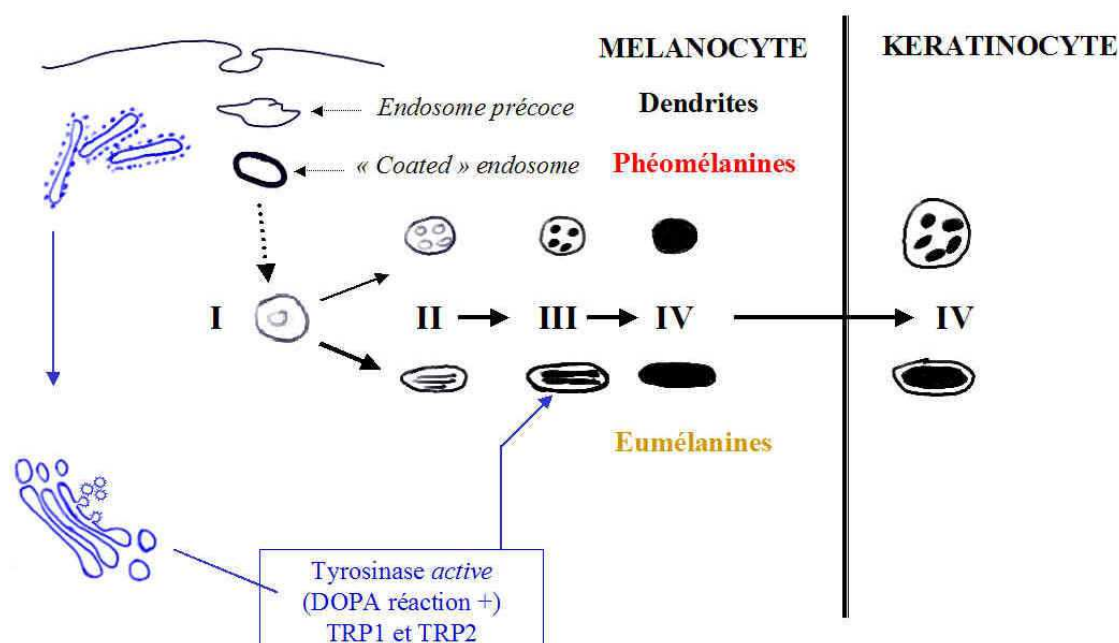


FIG. 4.4: Quatre stades de maturation sont décrits aussi bien pour les mélanosomes à eumélanines que pour les mélanosomes à phéomélanines. Les stades I et II correspondent à la synthèse de l'organite qui contient la tyrosinase non active, le stade III à la synthèse des mélanines après activation de la tyrosinase, alors qu'au stade IV la tyrosinase n'est plus active. Ce sont les mélanosomes de stade IV complètement mélanisés qui sont phagocytés par les kératinocytes. Figure et légende d'après <http://www.histo-moleculaire.com/epiderme/page/page136.htm>

Durant les deux premiers stades, les mélanosomes ne contiennent pas de pigments mélaniques mais des fibrilles protéiques. À la formation de ces fibrilles, la synthèse de mélanine commence et les pigments produits vont se déposer sur ces fibrilles provoquant leur épaissement et leur assombrissement [Raposo and Marks, 2007]. Les mélanosomes matures sont transportés le long des microtubules, allant ainsi de l'intérieur vers les extrémités dendritiques des mélanocytes pour être transférés aux kératinocytes adjacents. Un mélanocyte interagit en moyenne avec 40 kératinocytes adjacents et ils

forment ainsi une unité épidermique de mélanisation [Fitzpatrick and Breathnach, 1963; Costin and Hearing, 2007].

Le processus de synthèse des mélanines, appelé mélanogénèse, est décrit dans la section 4.3.

4.2.2 L'œil

L'œil permet de coder l'information lumineuse perçue en information électrique interprétable par le cerveau. Il est constitué de différents types cellulaires lui conférant cette capacité. La figure 4.5 représente une coupe anatomique de cet organe.

La sclérotique ou tunique fibreuse qui protège l'œil et maintient sa forme. Elle correspond à un tissu conjonctif dense peu vascularisé. La partie antérieure de la sclérotique est remplacée par la cornée, transparente non vascularisée et constituée de fibres nerveuses qui permettent de réagir au contact d'objets. La cornée est en contact direct avec l'air et correspond au point d'entrée des rayons lumineux dans le globe oculaire.

L'uvée est constituée de la choroïde dans la partie postérieure de l'œil et par le corps ciliaire et l'iris dans la partie antérieure. La choroïde et l'iris contiennent des mélanocytes issus de la crête neurale. Ces mélanocytes ne sont pas en contact avec d'autres types cellulaires comme les mélanocytes cutanés. Ils ne sont plus capables de synthétiser la mélanine. La mélanogénèse uvéale chez l'homme apparaît dès la 20^{me} semaine de vie embryonnaire et se termine peu de temps après la naissance. C'est pour cela que l'iris atteint sa couleur définitive aux environs de six mois.

- La choroïde tapisse la face interne de la sclérotique. C'est une couche cellulaire hautement vascularisée dont le rôle principale et d'assurer une fonction nourricière. Elle est riche en mélanocytes responsables de sa pigmentation. Il a été suggéré que la présence de mélanine réduit la probabilité de mélanomes uvéaux en protégeant les mélanocytes du stress oxydatif. Le rôle de la mélanine dans la protection des ultraviolets reste matière à débat [Mouriaux et al., 2005].
- Le corps ciliaire est essentiellement formé de muscles lisses et de vaisseaux sanguins. D'une part, il permet la sécrétion des deux liquides qui composent l'œil, le corps vitré et l'humeur aqueuse, ensuite il contribue à la forme de l'œil en maintenant la pression intraoculaire et enfin participe au phénomène d'accommodation grâce à la contraction de ses muscles ce qui modifie la forme du cristallin.
- L'iris est la partie colorée et visible de l'œil. Il est de structure pigmentée, donnant sa couleur à l'œil et est percé d'un trou, la pupille. Il est situé dans l'humeur aqueuse entre la cornée et le cristallin, séparant ainsi la chambre antérieure de la chambre postérieure de l'œil. Il est innervé par des fibres du système nerveux autonome qui activent les muscles lisses qui permettent de contrôler la taille de la pupille et donc les rayons lumineux pénétrant dans le globe oculaire. La contraction et la dilatation de l'iris sont contrôlées par deux muscles antagonistes, le muscle sphincter pupillaire et le muscle dilatateur de la pupille.

Le cristallin juste derrière l'iris est la lentille de l'œil qui permet la mise au point de par sa plasticité, en modifiant ses courbures et son indice de réfraction lors de l'accommodation. De forme biconvexe, transparent, il est situé à l'intérieur du globe oculaire et

est constitué de cellules anucléées et de fibres spécifiques. Il est maintenu en place par une série de fibres amarrées au corps ciliaire, la zonule de Zinn. Sa position lui permet de séparer le globe oculaire en deux chambres, sa partie antérieure est en contact avec l'humeur aqueuse et sa partie postérieure avec le corps vitré. Il se bombe pour la mise au point d'objets proches.

La rétine est le tissu nerveux tapissant la face interne de l'œil, c'est une couche neuroendocrinienne, directement en rapport avec le corps vitré. Elle contient les cellules permettant aux rayons lumineux d'être captés puis transformés en influx nerveux pour gagner le cerveau via le nerf optique. La rétine est constituée de deux tissus distincts, la rétine neurosensorielle ou neurorétine et l'épithélium pigmentaire ou rétine pigmentaire (RPE).

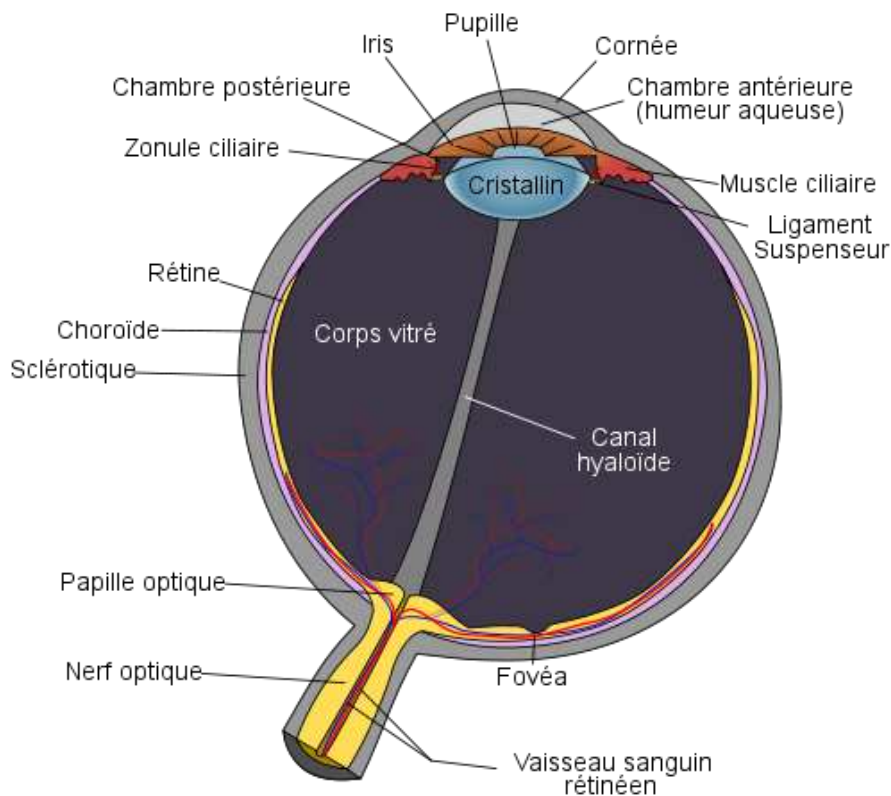


FIG. 4.5: Schéma d'une coupe anatomique de l'œil.
D'après <http://fr.wikipedia.org/>

4.2.3 Formation de l'œil

Durant la phase de neurulation (mise en place du tube neural à l'origine du système nerveux central) pendant l'embryogénèse, l'œil se met en place. Les différentes struc-

tures qui le compose se développent simultanément [Chow and Lang, 2001; Adler and Canto-Soler, 2007]. Il dérive de formations issues de plusieurs feuillets embryonnaires : les tissus épidermiques (cristallin, cornée, iris) et les tissus neurodermiques dérivent de l'ectoderme ; la sclérotique, la choroïde et les muscles oculomoteurs dérivent du mésoderme.

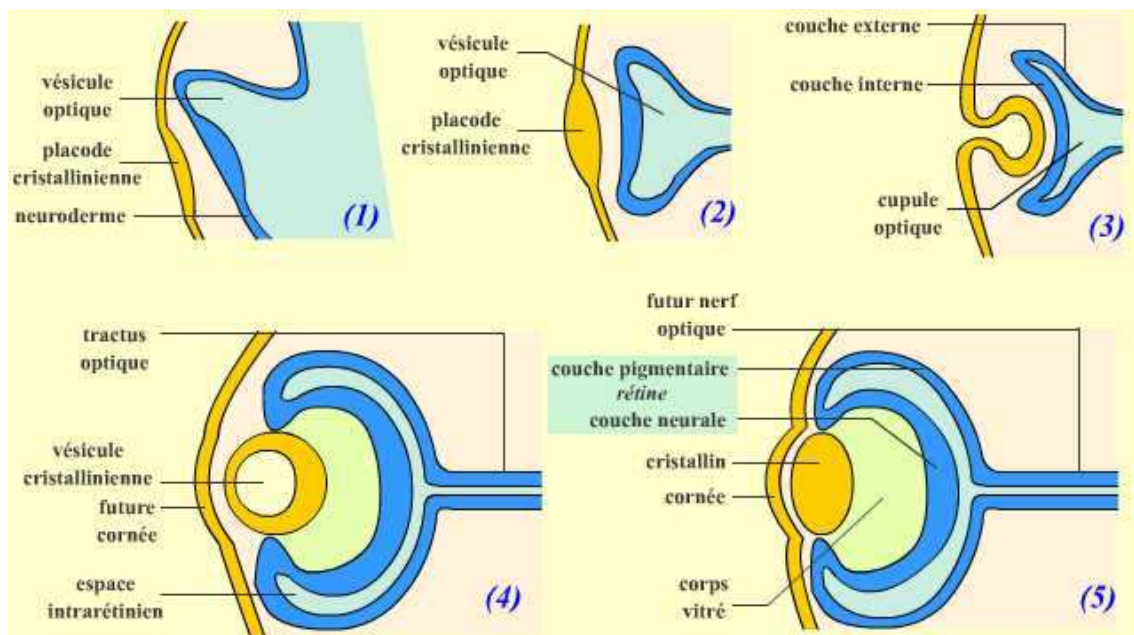


FIG. 4.6: Schémas simplifiés de la formation de l'œil. (1) Bourgeonnement de la vésicule optique à partir du télencéphale. (2) et (3) Mise en place de la cupule optique et de la placode cristallinienne. (4) et (5) Mise en place de la rétine et du cristallin.

D'après <http://www.snv.jussieu.fr/vie/documents/oeil/index.htm>

Chez les vertébrés, la formation de l'œil débute avec l'apparition des vésicules optiques qui sont des expansions latérales du télencéphale [Cobos et al., 2001] (Fig. 4.6 1). Les vésicules optiques sont formées d'un neuroépithélium indifférencié et contiennent les cellules à l'origine de la rétine. La neurorétine et la rétine pigmentaire ont ainsi la même origine malgré leurs différences de structure et de fonction [Okada, 1980; Park and Hollenberg, 1993]. Ces vésicules grandissent jusqu'à entrer en contact avec l'ectoderme de surface qui s'épaissit et se différencie en placode cristallinienne (Fig. 4.6 2). Des études de microscopie électronique chez le rat ont montré que, pendant cette période de contact, la vésicule optique et la placode cristallinienne sont étroitement associées à travers un réseau de fibrilles de collagène [McAvoy, 1978].

Le mésenchyme péri-oculaire est repoussé de part et d'autre de la vésicule et de la placode. La placode cristallinienne s'invagine ensuite afin de former la vésicule cristallinienne. Dans le même temps, la vésicule optique se replie en une cupule optique, qui se referme progressivement en une sphère. Après différenciation, la vésicule cristallinienne donne le cristallin, et la cupule optique la rétine et le nerf optique (Fig. 4.6 3 et 4).

La couche interne de la cupule optique (en face du cristallin) va former la neurorétine, tandis que la couche externe va donner naissance à la rétine pigmentaire. Dans la partie

postérieure, la neurorétine reste connectée au système nerveux central via le futur nerf optique. Au niveau antérieur, au point de jonction des deux feuillets de la rétine vont se développer l'iris et le corps ciliaire.

L'ectoderme qui avait recouvert la vésicule cristallinienne après son internalisation se différencie en donnant la cornée (Fig. 4.6 5).

La condensation du mésenchyme périoculaire forme ensuite la sclérotique qui entoure et protège l'œil.

4.3 La mélanogénèse

La mélanogénèse correspond aux mécanismes biochimiques qui permettent de contrôler et synthétiser les deux types de mélanines, l'eumélanine et la phéomélanine (Fig. 4.7 et 4.8). Ce processus permet de transformer un acide aminé très répandu dans l'organisme, la tyrosine, en mélanine via trois enzymes clés, la tyrosinase (TYR), la tyrosinase-related-protéin-1 (TRP1) et la tyrosinase-related-protéin-2 (TRP2) également appelée dopachrome tautomérase (DCT).

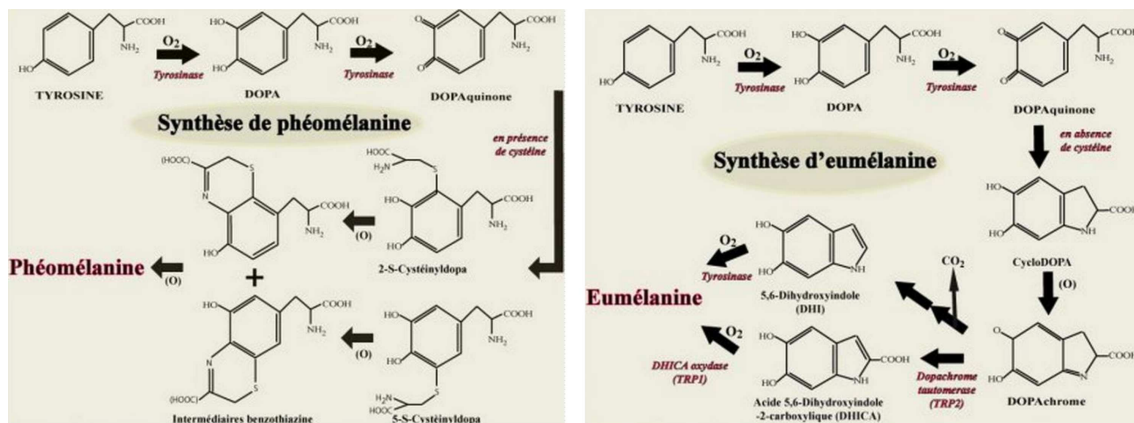


FIG. 4.7: Voies de synthèse des mélanines.
D'après, <http://biologie.lapeau.fr>

Bien que ces protéines aient des structures similaires, elles sont exprimées par des gènes différents et possèdent des activités enzymatiques distinctes. Les régions promotrices de tyrosinase et TRP1 présentent chacune un motif de 11 paires de bases AGTCATGTGCT (boîte M) en amont de la boîte TATA. Ce motif est reconnu par le facteur de transcription MITF (microphthalmia-transcription-factor) qui joue ainsi un rôle clé dans l'expression tissu spécifique de ces gènes. Dans la région promotrice de TRP2, une séquence homologue (GTCATGTGCT) se trouve également en amont de la boîte TATA. Toutefois, il n'a pas été clairement établi si MITF se lie et stimule le promoteur de TRP2 [Bertolotto et al., 1998b]. Il a cependant été montré que MITF coopère avec CREB [Bertolotto et al., 1998b], SOX10 [Ludwig et al., 2004] ou LEF-1 [Ichi Yasumoto et al., 2002] pour activer DCT.

MITF est localisé sur le chromosome 3p12.3-p14.1 chez l'homme. C'est un gène central dans le développement des cellules pigmentées de l'organisme (mélanocytes et cellules de la rétine pigmentaire). Il a un rôle dans de nombreux processus cellulaires.

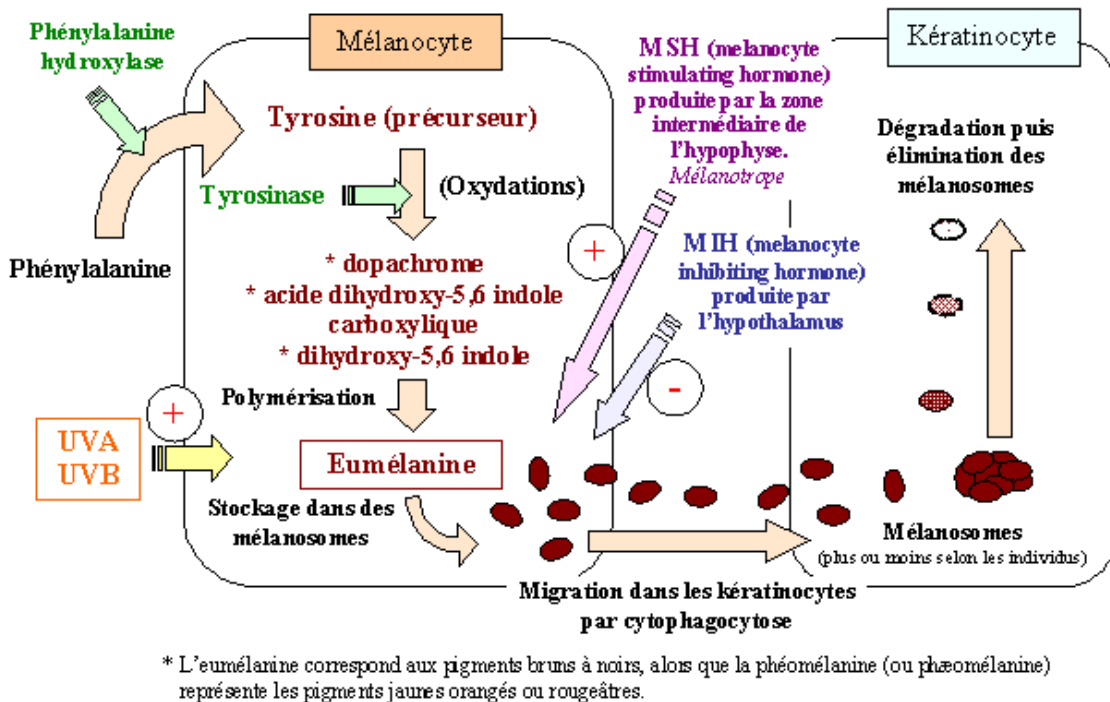


FIG. 4.8: Schéma simplifié de la mélanogénèse.

Dans la mélanogénèse, en plus d'être indispensable pour la synthèse des mélanines, il a un rôle majeur dans le bon développement des mélanosomes et leur lieu de synthèse. En effet, il contrôle le niveau d'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation et le fonctionnement des mélanosomes.

4.4 Pathologies associées aux mélanocytes de la choroïde

4.4.1 Pathologies associées à une anomalie de pigmentation

Une pigmentation correcte dépend de la migration des mélanoblastes, du développement des mélanocytes, et du bon fonctionnement de la cellule pigmentaire et de ses mélanosomes. Plusieurs pathologies présentant des défauts de pigmentation ont été décrites tel que le syndrome de Waardenburg (SW) ou l'albinisme.

Le syndrome de Waardenburg [Waardenburg, 1951] est caractérisé par des défauts de pigmentation tels que des plages dépigmentées sur la peau ou dans les cheveux, une absence de pigmentation des iris (yeux bleus vifs), ou des problèmes de l'audition. Les anomalies de la pigmentation oculaire se manifestent par des iris bleus ou atrophiques et par un aspect albinoïde du fond d'œil par déficience du nombre de mélanocytes uvéaux [Mouriaux et al., 1999]. Chez certains patients, des anomalies du système musculo-squelettal des membres [Pingault et al., 2010] sont également observées. Il existe quatre sous-types de SW identifiés qui se distinguent par la présence ou non d'anomalies supplémentaires aux problèmes de pigmentation.

L'albinisme est la conséquence d'un trouble de la synthèse de la mélanine par les

mélanocytes. Cette pathologie représente un ensemble d'anomalies génétiques caractérisées par une diminution ou une absence de mélanine associée à un nombre de mélanocytes normaux [McHam and Fulton, 1992; Park et al., 1992; Mouriaux et al., 2005]. Il existe différents types d'albinisme qui présentent une hypopigmentation de la peau, des cheveux, des poils et des yeux, qui est la manifestation la plus caractéristique.

Au niveau moléculaire, les anomalies liées à la pigmentation peuvent être le résultat de dysfonctionnement à différents niveaux [Mouriaux et al., 2005].

On peut tout d'abord observer des **anomalies au niveau des facteurs de transcription** régulant l'expression de gènes clés dans la pigmentation comme SNAI2 ou MITF. MITF est connu comme étant le facteur de transcription clé dans le développement des mélanocytes, il est au centre de la régulation de la différenciation des mélanocytes et de l'expression de gènes spécifiques aux mélanocytes (TYR, TRP1, DCT/TRP2). Plus de vingt mutations de MITF (plutôt perte de fonction) ont été décrites dans le syndrome de Waardenburg [Pingault et al., 2010], comprenant des mutations tronquantes, des mutations au niveau de l'épissage ou des mutations faux-sens et des suppressions de cadre de lecture. MITF est régulé par d'autres facteurs de transcription, entre autre SOX10 et PAX3 qui peuvent également être affectés par des mutations délétères. SOX10 et PAX3, en plus d'être impliqués dans la spécification du linéage mélanocytaire en régulant MITF, peuvent également réguler directement des gènes impliqués dans la mélanogénèse comme TRP2.

Les anomalies de pigmentation peuvent également être dues à une **mélanogénèse anormale**. Il a été montré dans différents types d'albinisme oculo-cutané (AOC I, II, III) que la tyrosinase, la protéine P et la protéine TRP1 impliquées dans la formation des mélanines présentaient une fonction anormale. En plus d'un dysfonctionnement au niveau des enzymes qui fabriquent la mélanine, la mélanogénèse peut être altérée par les protéines qui régulent ces enzymes tel que GPR143, récepteur couplé aux protéines G, impliqué dans l'albinisme oculaire.

Une altération dans le **mouvement des mélanosomes** peut également être à l'origine des anomalies pigmentaires. La myosine de type V et RAB27A [Chiaverini et al., 2008] ont été décrits dans le syndrome de Griscelli et sont impliqués dans la régulation du trafic intra-cellulaire et du transfert des mélanosomes. SHP1, protéine membranaire des lysosomes, et des sous-unités de AP3 impliquées dans la régulation du trafic vésiculaire ont été décrits dans le syndrome d'Hermansky-Pudlak. Une anomalie de la protéine SCH1, impliqué dans le trafic lysosomal a été décrite dans le syndrome de Chediak-Higashi.

La **formation des mélanosomes** peut également être touchée. Il a été montré que MITF active l'expression de SILV et MART1 impliquées dans la formation de la matrice et la maturation des mélanosomes [Du et al., 2003] ou encore l'expression de GPR13 qui joue un rôle dans la maturation et la taille des mélanosomes [Vetrini et al., 2004].

4.4.2 Pathologies associées à une hyper prolifération des mélanocytes

Le nævus choroïdien est une tumeur bénigne qui modifie le tissu choroïdien et qui est cliniquement très proche du mélanome de la choroïde. Comme il n'existe pas de définition stricte du nævus choroïdien, selon l'étude collaborative du mélanome oculaire, une lésion des mélanocytes de la choroïde ayant un diamètre $\leq 5mm$ et une épaisseur $\leq 1mm$ est classée comme un nævus choroïdien [Singh et al., 2005].

Les nævi dans la population sont fréquents, petits, évoluent lentement en taille et

affectent rarement l'acuité visuelle [Sumich et al., 1998]. Ce sont des lésions dont la fréquence varie entre 10 à 20% et augmente avec l'âge [Desjardins, 2010]. La pigmentation des ces nævi est variable. En effet même si 87% d'entre eux sont pigmentés, certains peuvent être achromes [Desjardins, 2010]. Il semblerait que le risque de dégénérescence d'un nævus est très faible [Ganley and Comstock, 1973].

Il est important de savoir si les nævi représentent des facteurs de risque pour la transformation en mélanome ou sont indépendants. Il apparaît que l'ensemble des mélanomes de la choroïde se développent à partir de nævus déjà existants, cependant un faible taux d'entre eux subiraient une transformation cancéreuse (1/8845 dans une population blanche des Etats-Unis) [Singh et al., 2005].

Le mélanocytome est une tumeur mélanocytaire de la papille, assimilée histologiquement à un nævus. D'autres sites uvéaux ont été décrits, mais ils sont exceptionnels. Les mélanocytomes sont de petite taille (inférieure en général au diamètre papillaire), de coloration très foncée. Leur croissance est lente et leur pronostic bon. En microscopie, les cellules sont des mélanocytes sans mitose, ce qui est en accord avec le caractère bénin de cette malformation. Le siège papillaire s'expliquerait par la persistance anormale de mélanocytes uvéaux dans le plan « choroïdien » de la lame criblée. La dégénérescence maligne est exceptionnelle [Shields et al., 2000; Mouriaux et al., 2005].

Le mélanome de la choroïde est la tumeur oculaire la plus fréquente chez l'adulte [Shields and Shields, 2009]. Il s'agit du cancer étudié dans cette étude. Nous allons donc le décrire plus en détail et lui consacrer la section suivante.

4.5 Le mélanome de la choroïde

4.5.1 Généralités

4.5.1.1 Épidémiologie et facteurs de risques

Ce cancer bien qu'étant la tumeur intra-oculaire la plus fréquente chez l'adulte [Shields and Shields, 2009] est une tumeur rare. L'incidence annuelle en France est de 500 à 600 nouveaux cas par an [Vidal et al., 1995] avec une proportion comparable aux Etats-Unis. Les données épidémiologiques mondiales montrent une incidence globalement stable, mais l'analyse est difficile en raison de l'absence de registres exhaustifs et donc de données manquantes. Ces analyses sont également compliquées par le développement des techniques de traitement conservateur ne permettant pas les vérifications histologiques [Stang et al., 2005]. Le mélanome uvéal survient chez les sujets dont la moyenne d'âge est de 55 ans (contre 45 ans pour le mélanome cutané) et l'incidence augmente avec l'âge.

Les facteurs de risque sont mal connus. L'exposition aux ultraviolets n'est pas clairement identifiée dans la genèse de la tumeur [Singh et al., 2004], de même pour l'âge et le sexe. Les patients avec un phototype clair sont plus touchés (couleur de l'iris, peau, cheveux) que les sujets noirs ou asiatiques [Saornil, 2004]. Les mélanomes uvéaux comme les nævi présentent des pigmentations non homogènes avec des zones pigmentées et d'autres achromes (Fig. 4.9). Les mécanismes conduisant à la transformation des méla-

nomes sont encore mal connus et il n'existe pas d'association pathologique significative même si la présence de nævi semble prédisposer à la survenue de mélanome.

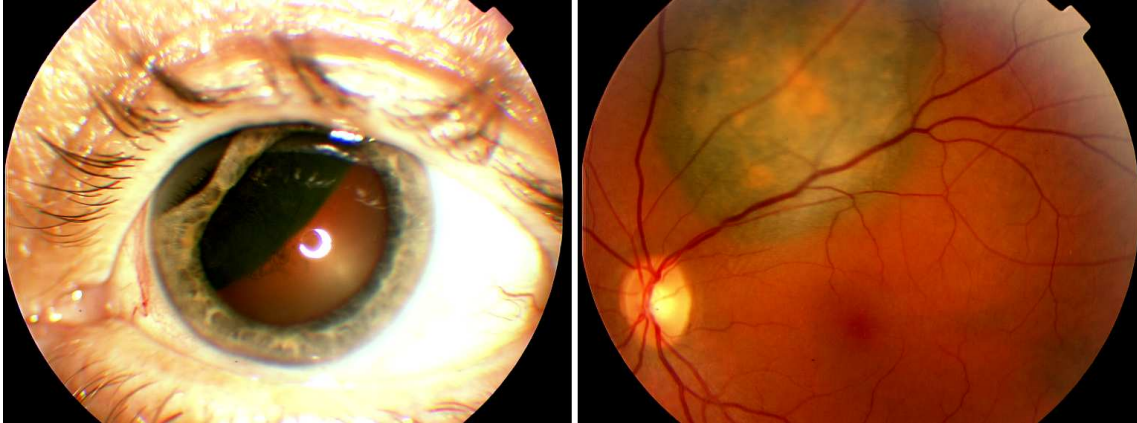


FIG. 4.9: Mélanome de la choroïde. L'image de droite représente une vue au fond de l'œil montrant des zones pigmentées et d'autres achromes.

La localisation de la tumeur primitive est définie par rapport à un axe antéro-postérieur. On peut ainsi distinguer les localisations antérieures et les localisations postérieures. Comme le montre la Fig. 4.10, le nerf optique (1), la macula (2) et le pôle postérieur (3) représentent les localisations postérieures ; la choroïde périphérique (4), les extensions périphériques avec atteinte des corps ciliaires (5) et les corps ciliaires (6) représentent les localisations antérieures. Il peut aussi exister une localisation mixte (7). L'atteinte des corps ciliaires constitue un facteur de mauvais pronostic.

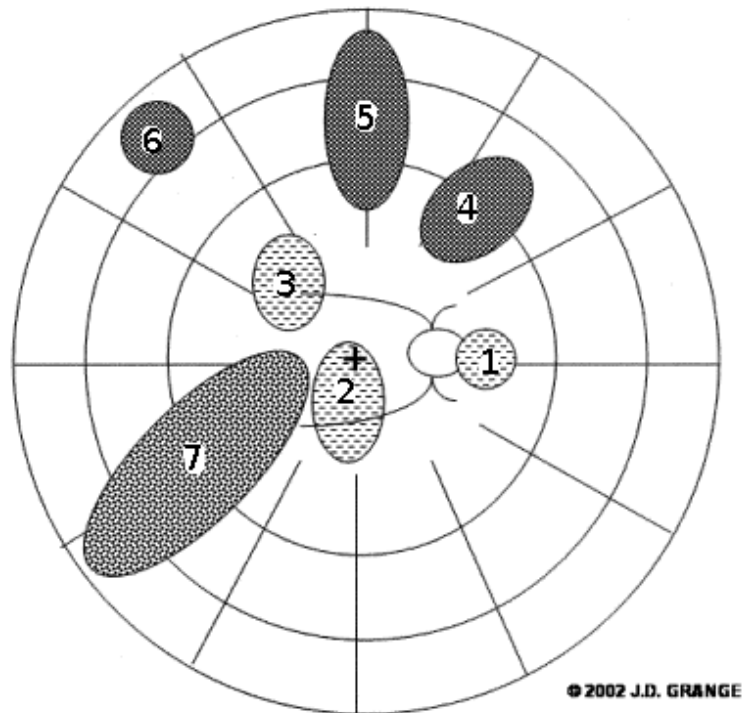


FIG. 4.10: Locations des mélanomes uvéaux.
Figure et légende d'après [Rouberol et al., 2004]

4.5.1.2 Diagnostic

Le diagnostic initial de cette pathologie est ophtalmologique. Il peut être porté à la suite d'un examen oculaire systématique ou en raison de symptômes visuels de type : vision floue, baisse de l'acuité visuelle ou de douleurs. Il ne nécessite que très peu d'examen complémentaires : l'échographie est réalisée en routine et permet d'affirmer le diagnostic. Grâce à cet examen, des critères tels que le diamètre basal, la profondeur, la localisation et l'atteinte extra-sclérale sont définis. Quand une énucléation est réalisée, la description anatomopathologique permet de confirmer la taille, la localisation par rapport au pôle postérieur de l'œil, décrit la présence de boucles vasculaires, l'index mitotique, l'infiltration de la sclère, du nerf optique ou des corps ciliaires. L'ensemble de ces éléments représente également des critères pronostiques [Schmittel et al., 2004]. La description anatomopathologique permet aussi d'identifier deux types de cellules constituant la tumeur : les cellules fusiformes et les cellules épithélioïdes (Fig. 4.11). La présence de ces dernières est associée à un plus fort risque de métastases.

4.5.1.3 Traitement initial

L'énucléation a longtemps été considérée comme la seule option thérapeutique envisageable mais depuis de nombreuses années, des techniques dites conservatrices de l'œil se sont développées. L'ablation de l'œil étant une chirurgie massive et psychologiquement difficile, elle est donc désormais réservée aux tumeurs de grandes tailles ou présentant une extension extra-sclérale.

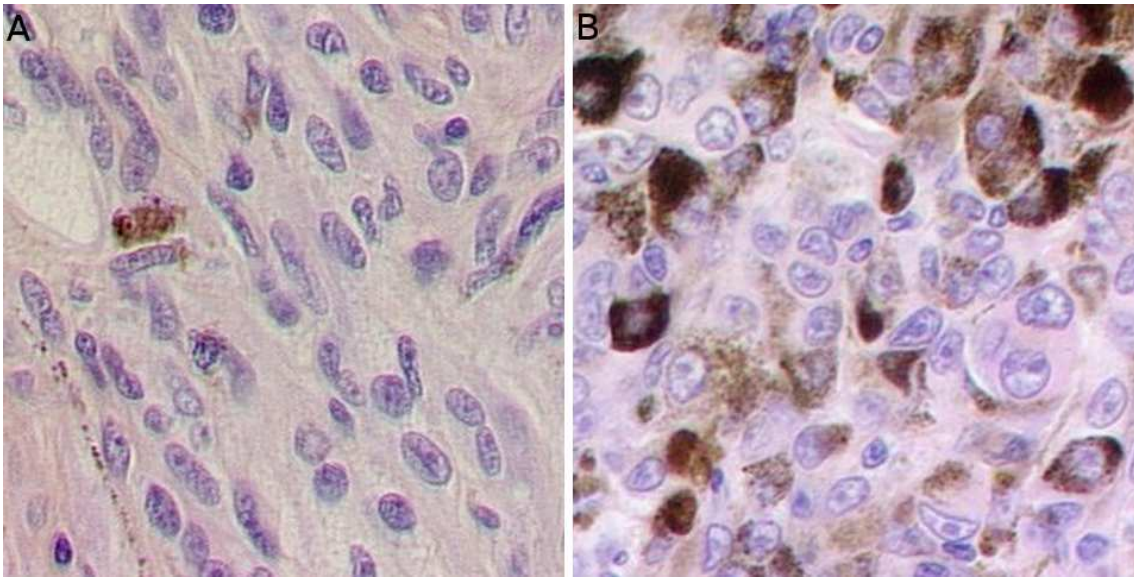


FIG. 4.11: *Types cellulaires des mélanomes choroïdiens.*
 A- Mélanome de type fusiforme. B- Mélanome de type épithélioïde.

Parmi les techniques conservatrices, on peut distinguer :

- la curiethérapie qui consiste en l'application de plaques radioactives au contact de la tumeur. Elles peuvent être constituées d'iode (le plus fréquemment) mais encore de ruthénium ou de palladium [Rouberol et al., 2004].
- la protonthérapie [Kodjikian et al., 2004] qui consiste à administrer des faisceaux de protons sur la tumeur. Cette technique évite les irradiations des structures adjacentes de l'œil grâce à sa grande précision. Il existe en France seulement deux sites de protonthérapie (Orsay et Nice), ce qui fait de l'institut Curie (site d'Orsay) un site de traitement majeur pour cette pathologie.
- la thermo thérapie transpupillaire qui consiste à délivrer un faisceau d'énergie à travers la pupille afin d'induire une nécrose tumorale.

4.5.1.4 Évolution

Malgré un traitement initial bien conduit, la moitié des patients vont récidiver sur le mode métastatique [Shildkrot and Wilson, 2009; Damato, 2010]. Environ 30% des patients récidivent dans les 5 ans, ce chiffre augmente jusqu'à 50% à 15 ans. Il s'agit d'une pathologie agressive avec le foie comme site privilégié de développement de métastases, due à une dissémination exclusivement par voie hématogène puisque l'œil est dépourvu de structures lymphatiques. La médiane de survie après survenue de métastases est de 2 à 6 mois. Il peut exister de façon plus anecdotique des métastases pulmonaires, ganglionnaires, osseuses ou cutanées. Les traitements des métastases quand ils sont envisageables sont généralement décevants. En effet la chirurgie ne peut être proposée que dans 10% des cas, la chimiothérapie améliore la survie d'environ 4 mois et la radiothérapie est utilisée sur les localisations osseuses douloureuses ou menaçantes et les localisations cérébrales [Pyrhönen, 1998].

En plus des facteurs de mauvais pronostics connus, cliniques et histologiques (âge

supérieur à 60 ans, diamètre tumoral supérieur à 16 mm, localisation aux corps ciliaires, extension extrasclérale, type cellulaire épithélioïde, présence d'anomalies vasculaires) [McLean et al., 1983; Al-Jamal et al., 2003; Kodjikian et al., 2004; Gambrelle et al., 2004; Desjardins et al., 2006], l'analyse du génome et du transcriptome de la tumeur représentent les outils à visée pronostique les plus récents et les mieux corrélés à la survenue de métastases hépatiques [Baggetto et al., 2005; Harbour, 2009].

4.5.2 Altérations chromosomiques

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre 2, les cellules cancéreuses présentent des aberrations chromosomiques. Ces anomalies, soit du nombre, soit de la structure des chromosomes peuvent altérer soit l'ensemble du chromosome touché, soit le bras court (p) soit le bras long (q).

Il a été montré que les mélanomes de la choroïde présentent des aberrations chromosomiques non aléatoires et corrélées au pronostic et à la survie des patients [Kilic et al., 2006]. Ces altérations, contrairement à celles observées dans d'autres cancers comme le cancer du sein, impliquent de grandes régions, souvent des bras de chromosomes entiers. Ces réarrangements chromosomiques se retrouvent principalement sur les chromosomes 3, 6 et 8. Ils ont d'abord été mis en évidence par les analyses de karyotype puis par la technique de Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) et par la Comparative Genomic Hybridization (CGH) [Kilic et al., 2006; Harbour, 2009].

Parmi ces altérations, la monosomie du chromosome 3 apparait comme un événement précoce présent dans 50 à 60% des tumeurs et est souvent associée à un isochromosome 8q (mauvaise division durant la mitose et multiplication en plus de trois copies entraînant un fort gain du bras long du chromosome 8) [Kilic et al., 2006]. La monosomie du chromosome 3 est corrélée à la localisation au corps ciliaire, au type épithélioïde des cellules et à un mauvais pronostic alors que la disomie du chromosome 3 est rarement associée à l'apparition de métastases [Mudhar et al., 2004]. L'association monosomie du 3 et gains de 8q représenteraient les facteurs de risque de décès les plus pertinents et seraient corrélés aux autres facteurs de risques cliniques et histologiques connus [Damato et al., 2007, 2009]. Les tumeurs de meilleurs pronostics avec un nombre normal de copies pour le chromosome 3 présentent souvent un gain du bras court du chromosome 6 [Damato et al., 2009] (Fig. 4.12).

Les dernières technologies de puces à ADN (les puces array-CGH et SNP6) (voir partie 2.4) permettent d'analyser les tumeurs avec une meilleure résolution et sans les biais et les limitations des méthodes de cytogénétiques. Les dernières générations de puces SNP permettent de connaître le statut allélique des segments chromosomiques et apporter une meilleure information dans le cas d'isodisomie (paragraphe 2.4.2). Dans le mélanome de la choroïde, il a été décrit des cas d'isodisomie pour le chromosome 3 dans 3 à 5% des tumeurs [Onken et al., 2007; Trolet et al., 2009]. Une copie est perdue et la copie restante est dupliquée ce qui, en nombre de copie, est équivalent à un statut normal, alors que ces tumeurs ont bien perdu une copie et se comportent comme les tumeurs présentant une monosomie du chromosome 3 [Onken et al., 2007; Trolet et al., 2009].

Des analyses de classification des tumeurs basées sur les déséquilibres chromosomiques mettent en évidence que les mélanomes uvéaux sont divisés en deux groupes principaux selon leur statut du chromosome 3 [Tschentscher et al., 2003]. Hughes *et al.* ont défini deux groupes de tumeurs de profils génomiques différents en se basant sur le

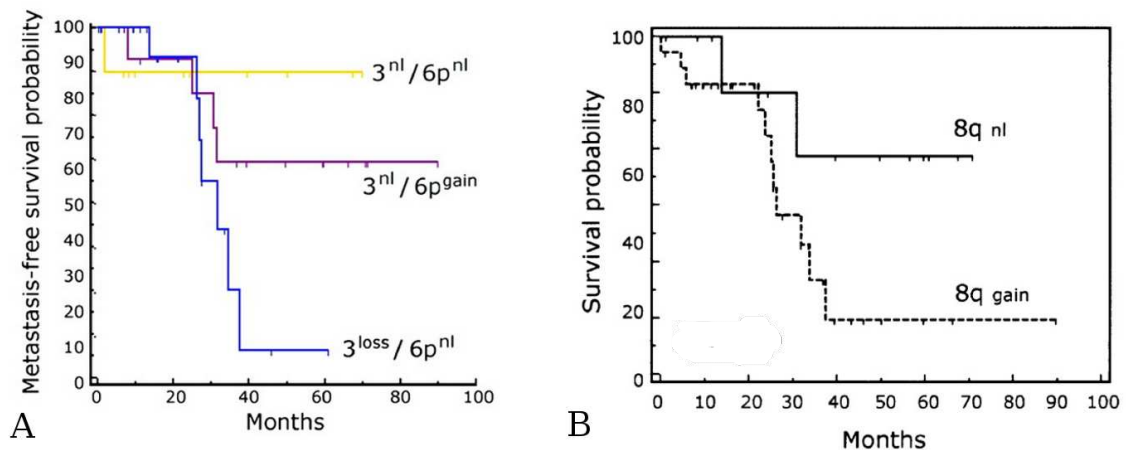


FIG. 4.12: Altérations chromosomiques et survie dans le mélanome de la choroïde. Courbes de Kaplan-Meier montrant les associations entre les sous-groupes de tumeurs et la survie. A- Les patients présentant une monosomie du chromosome 3 et un chromosome 6p normal ont les tumeurs les plus agressives. Un gain du 6p est moins agressif que la monosomie 3. B- Un gain du chromosome 8q est également de mauvais pronostic.

Figures d'après [Ehlers et al., 2008]

statut du chromosome 3 (monosomie du 3 versus disomie du 3). La monosomie du 3 est souvent associée aux gains du 8q et une disomie du 3 aux gains du 6p [Hughes et al., 2005]. On peut également, sur la base des profils génétiques, différencier deux classes de tumeurs avec des pronostics différents. Cette notion de classes 1 et 2 a d'abord été définie sur la base de profil d'expression permettant de séparer les tumeurs à haut risque métastatique et celles à risque plus faible [Onken et al., 2004]. Les tumeurs de classe 1, de meilleur pronostic, avec deux copies du chromosome 3 représentent environ 40% des tumeurs et la classe 2, plus agressive, présente une monosomie du chromosome 3 et représente environ 60% sur des tumeurs issues d'énucléation [Trolet et al., 2009]. La proportion de classe 2 est plus faible dans les collections de tumeurs de plus petite taille [Young et al., 2007; McCannel et al., 2010].

La perte du chromosome 3 entier est un événement fréquent et pronostique dans le mélanome de la choroïde. Cependant, il arrive dans de rares cas (environ 5%) que des tumeurs présentent des délétions partielles [Tschentscher et al., 2001; Cross et al., 2006]. L'analyse de ces tumeurs indique la présence de délétions partielles récurrentes en 3p25-26 [Tschentscher et al., 2001; Cross et al., 2006; Trolet et al., 2009] en 3P11-14 [Cross et al., 2006] et en 3q24-q26 [Tschentscher et al., 2001] et permet ainsi de regarder plus en détail les gènes suppresseurs de tumeurs présents dans ces régions.

Des altérations sur le chromosome 6 sont fréquentes et plutôt précoces dans le mélanome de la choroïde, notamment un gain du 6p et une perte du 6q. Une étude spécifique sur les altérations présentes sur ce chromosome indique la présence de gènes suppresseurs de tumeurs dans la région 6q16.1-6q22 et d'oncogènes dans la région 6pter-6p21.2 qui sembleraient importantes dans le mélanome choroïdien [van Gils et al., 2008].

Le gain du 8q dans les mélanomes choroïdiens serait un événement plus tardif qui apparaîtrait après l'altération des chromosomes 3 ou 6. En effet, dans plusieurs études, cette altération est rarement observée seule. Les tumeurs présentant une altération sur

le 8 sont dans la plupart des cas également altérées sur le 3 ou le 6 [White et al., 1998; Parrella et al., 1999; Ehlers et al., 2008] ce qui permet de proposer différents schémas de progression tumorale (Fig. 4.13).

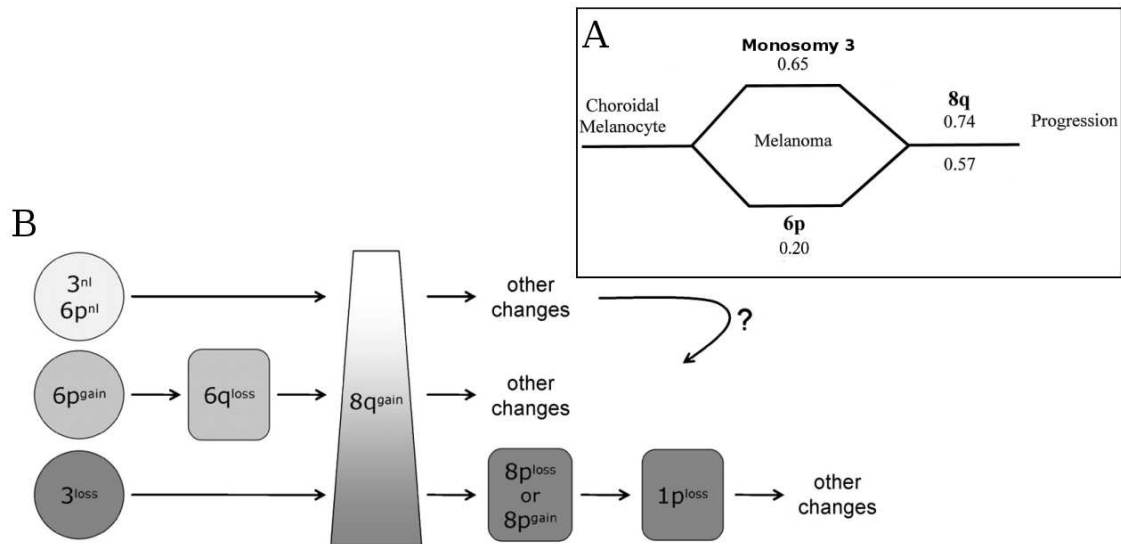


FIG. 4.13: Chronologie des altérations chromosomiques.

A- Dans l'étude de Parrella et al. 65% des tumeurs présentent une monosomie pour le chromosome 3 et 20% un gain du 6p. Environ 60-70% de ces tumeurs accumulent une altération du 8q.[Parrella et al., 1999]. **B-** Trois hypothèses de progression tumorale. Pour les tumeurs normales pour les chromosomes 3 et 6p, le gain du 8q est l'altération la plus constante. Pour les tumeurs avec un gain du chromosome 6p et normales pour le 3, les altérations précoces incluent une perte du 6q et un gain du 8q. Les tumeurs avec une monosomie du chromosome 3 présentent un gain du 8q puis une perte du 8p et du 1p. Bien que plus tardif, le gain du 8q dans les différents sous groupes d'altérations montre son importance dans la progression tumorale.

Figure et légende d'après [Ehlers et al., 2008].

D'autres altérations récurrentes ont également été observées sur les chromosomes 1 et 16 [Mudhar et al., 2004; Kilic et al., 2006; Trolet et al., 2009].

Dans le jeu de données de l'Institut Curie analysé en CGH-array (86 tumeurs provenant d'énucléation), une monosomie complète du chromosome 3 est observée dans 62% des tumeurs, un gain total ou partiel du chromosome 8q dans 89% des cas, un gain du 6p dans 57%, une perte du chromosome 1p dans 45% et une perte du chromosome 16 dans 31%. Ces patients avaient un suivi supérieur à 24 mois. Dans cette étude [Trolet et al., 2009] qui montre l'intérêt pronostique de ces analyses, l'association des gains du 6p et du 8q distal est présente chez les patients à moindre risque alors que l'association monosomie du chromosome 3 et gain du chromosome 8q entier est observée chez les patients avec évolution métastatique. Ces patients présentent également une perte du chromosome 8p et du 16q.

Peu de données sont disponibles pour les métastases issues de mélanome de la choroïde. Dans l'étude de Trolet et al., 63 métastases hépatiques ont été analysées par CGH-array. Ces métastases semblent se regrouper selon les mêmes groupes d'altération mis en évidence dans les tumeurs primaires mais selon des proportions différentes (17% pour les classes 1 et 82% pour les classes 2) [Trolet et al., 2009].

4.5.3 Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des mélanomes de la choroïde

Le mélanome est un cancer hétérogène qui présente différents sous-type. Le mélanome uvéal (MU) présente des différences cliniques, biologiques et génétiques par rapport au mélanome cutané qui est le mélanome le plus étudié.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les cellules présentent différentes caractéristiques pour devenir cancéreuses. Pour former la masse tumorale, les cellules doivent être capables de proliférer de manière autonome et continue. Elles doivent également pouvoir échapper aux différents points de contrôle permettant l'activation de la mort cellulaire et doivent être capables de maintenir cette masse tumorale. Ces cellules acquièrent également des capacités migratoires indispensables au développement de métastases.

Dans le cas du mélanome, et des différents sous-types de mélanomes, ces capacités sont obtenues en activant différemment les mêmes voies de signalisation en fonction des sous-types. Au niveau moléculaire, différents modules sont altérés afin d'acquérir ces capacités : les facteurs de transcription, les récepteurs ou les protéines au cœur des voies métaboliques.

Les altérations génétiques observées dans le mélanome de la choroïde sont effectivement distinctes de celles observées dans le mélanome cutané. Des mutations gain de fonction dans BRAF ou NRAS sont communes parmi les mélanomes cutanés issus du tronc et des extrémités [Gray-Schopfer et al., 2007]. Une sur-expression de KIT est observée chez les mélanomes acraux [Curtin et al., 2006]. Ces trois phénomènes sont extrêmement rares dans le mélanome de la choroïde [Saldanha et al., 2004]. Elles jouent un rôle dans l'activation de la voie de signalisation MAP kinases activée dans la majorité des mélanomes et de bon nombre de cancer en général. Cette voie est impliquée dans la prolifération, la survie cellulaire, la migration et la différenciation. Dans la figure 4.14, les principales voies dérégulées dans le mélanome cutané sont représentées. En plus des voies MAP kinases et PI3K/AKT, on peut noter l'importance du facteur de transcription MITF, élément clé du développement mélanocytaire ou encore le gène CDKN2A codant pour les protéines p14 et p16 impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

Dans la figure 4.15, Patel *et al.* [Patel et al., 2011] résumant de la même manière les voies principalement décrites dans le mélanome de la choroïde. Nous y retrouvons les voies MAP kinases et PI3K/AKT et l'importance des récepteurs membranaires en amont de ces voies.

Dans cette partie, nous allons décrire les altérations mises en évidence dans les mélanomes et principalement le mélanome choroïdien, entraînant des modifications dans ces voies métaboliques conduisant ainsi à la transformation des mélanocytes.

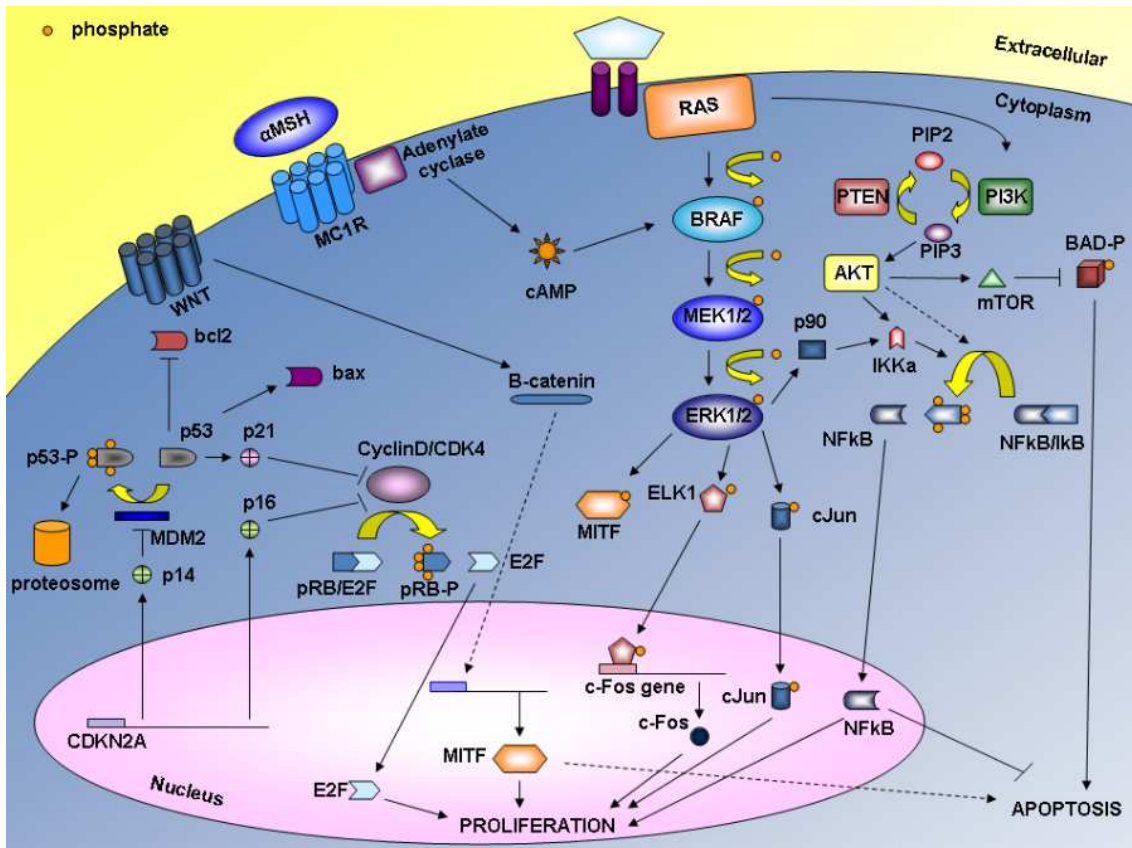


FIG. 4.14: Voies majeures impliquées dans le mélanome cutané. Importance de N-RAS et BRAF dans la voie MAP kinases. Régulation de nombreuses voies par CDKN2A et MITF. Figure et légende d'après [Palmieri et al., 2009]

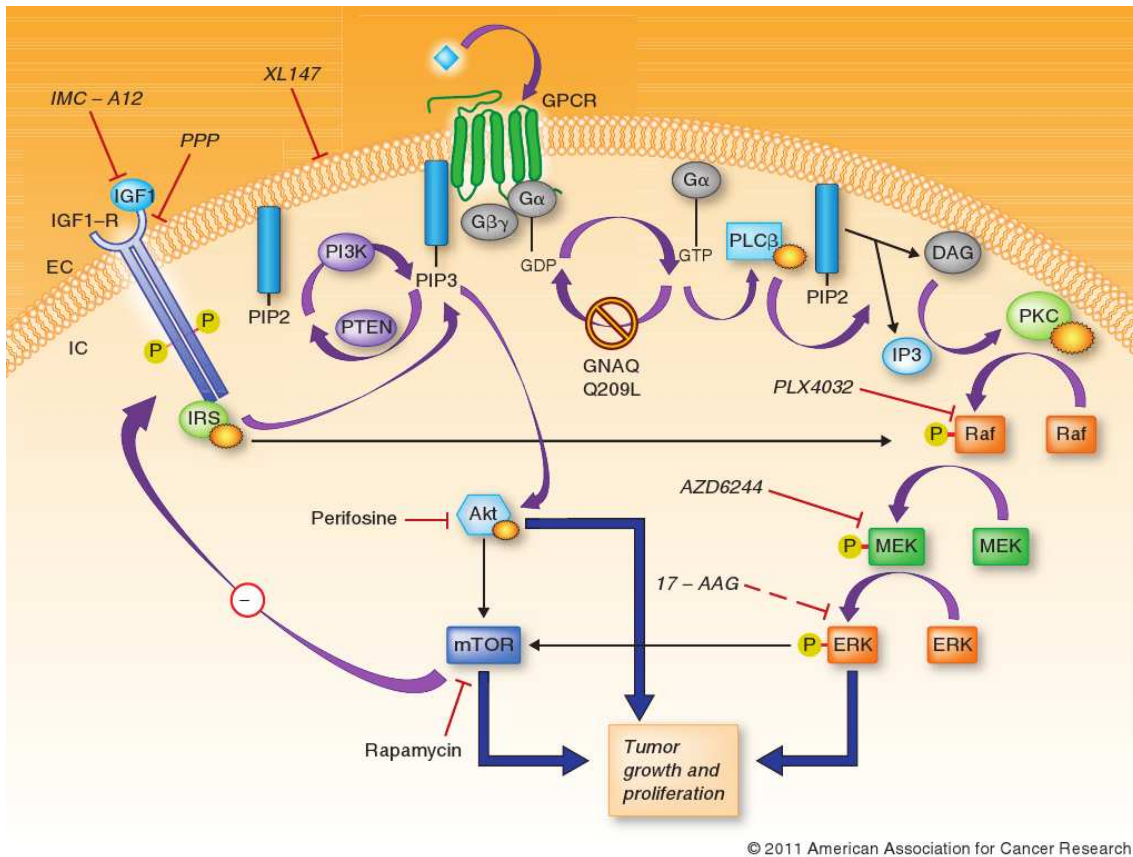


FIG. 4.15: Voies majeures impliquées dans le mélanome de la choroïde.

Les voies de signalisation MAPK, PI3K, mTOR et IGF1R sont principalement impliquées dans le mélanome de la choroïde. La stimulation de récepteurs couplés aux protéines G entraîne le remplacement du GDP en GTP au niveau de la sous-unité α qui devient donc active et active PLC β qui induit le clivage de PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate) en IP3 (inositol triphosphate) et DAG (diacyl glycerol). DAG active PKC qui active la voie des MAP kinases qui entraîne la croissance tumorale et la prolifération. La mutation GNAQ Q209L inactive la sous-unité α du récepteur prévenant ainsi l'hydrolyse du GTP en GDP et permet une activation constitutive de la voie des MAP kinases. PI3K phosphoryle le PIP2 en PIP3 et PTEN déphosphoryle PIP3 en PIP2. PIP3 active AKT qui favorise la croissance tumorale et la prolifération. ERK et AKT active la voie de signalisation mTOR qui favorise également la croissance tumorale et la prolifération. L'activation du récepteur IGF1R entraîne sa dimérisation et son autophosphorylation entraînant le recrutement et l'activation d'IRS qui active les voies PI3K et MAP kinases. mTOR peut inhiber le récepteur IGF1R.

Figure et légende d'après [Patel et al., 2011]

4.5.3.1 Facteurs de transcription et modulation d'expression de gènes clés

MITF

MITF est un facteur de transcription b-HLH-LZ qui possède un domaine basique permettant la liaison à l'ADN et des domaines hélice-boucle-hélice (HLH) et crémaillère à leucine (LZ) permettant de former des homo ou des hétéro-dimères (Fig. 4.16). Chez l'homme, il est localisé en position 3p12.3-p14.1 [Tachibana et al., 1994]. Dans les cel-

lules mélanocytaires, MITF intervient dans la synthèse de la mélanine en activant les gènes tyrosinase, TRP1 et TRP2 [Bertolotto et al., 1998a; Shibahara et al., 2000]. Il est également un gène clé, impliqué dans la maturation des mélanocytes dérivés de la crête neurale, la rétine pigmentaire, les mastocytes dérivés de la moelle osseuse et les ostéoclastes [Steingrímsson et al., 2004]. Ce facteur de transcription est largement exprimé dans les mélanomes cutanés et uvéaux mais son rôle dans la transformation des mélanocytes reste assez flou. Dans les mélanocytes, MITF régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la migration (DAIPH1, MET), la survie (BCL2, MET) ou encore la prolifération (CDK2) [Cheli et al., 2010]. L'extinction de MITF entraîne l'activation d'une voie de réparation à l'ADN entraînant l'activation de p53 nécessaire à l'entrée en sénescence. MITF est donc requis pour prévenir la sénescence et favoriserait la prolifération cellulaire des mélanomes [Giuliano et al., 2010]. L'expression et la fonction de MITF peuvent être régulés par différents facteurs de transcription tels que PAX3, CREB ou encore SOX10 [Goding, 2000].

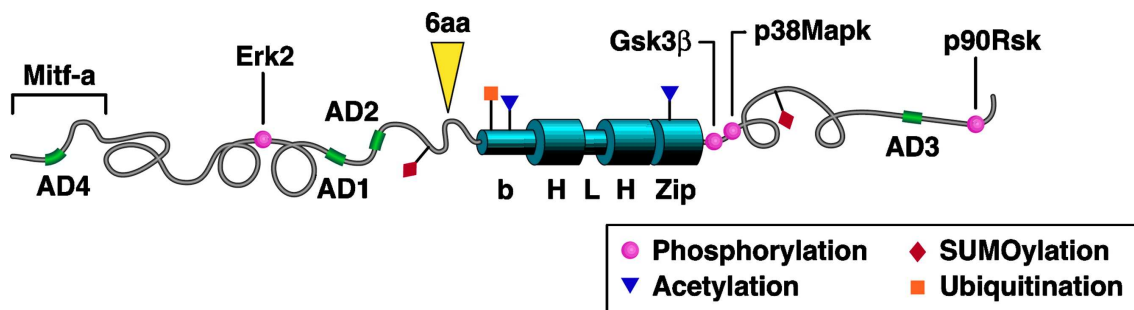


FIG. 4.16: Structure de MITF.

MITF est un facteur de transcription à domaine b-HLH-LZ. Les différents domaines qui ont été caractérisés présentent des sites de modification post-transcriptionnelle.

Figure et légende d'après [Steingrímsson et al., 2004]

MITF peut agir comme un oncogène dans les mélanomes, il est sur-exprimé durant la progression des mélanomes cutanés en association avec la mutation V600E de BRAF [Garraway et al., 2005]. Il a également été montré qu'une diminution de l'expression de MITF pouvait être associée à un comportement métastatique via le contrôle de DIAPH1 [Carreira et al., 2006]. Le niveau de MITF semble critique dans les cellules de mélanomes et doit être maintenu à un niveau intermédiaire. Une sur-expression stimule la différenciation alors qu'avec un niveau faible les cellules meurent par apoptose [Wellbrock et al., 2008].

MITF est localisé dans une région perdue dans les MU agressifs (chromosome 3) mais son rôle dans ce mélanome particulier n'est pas clairement établi même si son implication potentielle a déjà été décrite [Mouriaux et al., 2003].

RB, p16, cycline D et le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire comprend une succession de quatre étapes qui permet à une cellule mère de se diviser en deux cellules filles. La première phase G1 est la phase de croissance ou de biosynthèse cellulaire. Durant cette phase, la cellule a la possibilité de se mettre en G0, phase de quiescence, ou de passer en phase S. La phase S est la phase de réplication de l'ADN pendant laquelle la cellule passe d'un état diploïde (2N) à un état

tétraploïde (4N). La cellule passe ensuite en phase G2 qui est une phase de préparation à la mitose. Finalement, durant la phase mitotique, la cellule se sépare en deux cellules filles qui chacune se retrouvent en phase G1 d'un nouveau cycle.

Les cellules ont besoin de facteurs mitogènes pour rentrer dans le cycle cellulaire. Les mécanismes de la régulation reposent essentiellement sur deux structures protéiques complémentaires qui sont les Cycline-dependent kinases (Cdk) et les cyclines. Les Cdk sont les composantes de base qui s'associent avec les cyclines pour s'activer et ainsi former des complexes hétéro-dimériques.

La protéine RB (Retinoblastoma) bloque la progression du cycle en G1-S, donc une inactivation de RB entraîne une prolifération non régulée. Dans les MU, RB est inactivé par hyper-phosphorylation [Loercher et al., 2005; Delston and Harbour, 2006]. Cette hyper-phosphorylation, montrée dans un tiers des MU [van der Velden et al., 2001], peut être due à l'inactivation de p16^{INK4A} qui est une cible de MITF, ou à une sur-expression de la cycline D, une cible en aval de la voie MAP kinases, dans les deux tiers des cas [Mouriaux et al., 1998; Brantley and Harbour, 2000; Coupland et al., 2000].

p53 et l'apoptose

Afin d'échapper à l'apoptose et favoriser la survie, il semblerait que les cellules de MU exploitent plusieurs voies de signalisation comme les voies p53 ou BCL2.

La voie de signalisation p53, « le gardien du génome », est mutée dans de nombreux cancers, ne permettant plus la reconnaissance des dommages à l'ADN et donc l'activation des voies apoptotiques. Le gène p53 est rarement décrit muté dans les MU [Ehlers and Harbour, 2006]. L'inhibition fonctionnelle de p53 dans MU pourrait être due à la sur-expression de son inhibiteur HDM2 [Brantley and Harbour, 2000]. Un inhibiteur de HDM2 dans des cellules de MU entraîne une apoptose massive, montrant ainsi l'importance de sa sur-expression dans les cellules de MU pour leur survie [Harbour et al., 2002].

La famille de gènes anti-apoptotique BCL2 peut également jouer un rôle dans les MU. BCL2 est une cible directe de MITF qui est fortement exprimé dans les mélanocytes [McGill et al., 2002]. BCL-xL, un autre membre anti-apoptotique, de la famille BCL2, peut être inactivé par déamidation [Deverman et al., 2002], mais les cellules de MU présentent souvent une incapacité à déamider BCL-xL en réponse aux dommages à l'ADN [Sun et al., 2005].

BAP1

Comme nous l'avons énoncé dans la partie 4.5.2, les mélanomes uvéaux peuvent être discriminés en deux classes selon leur profil d'expression [Onken et al., 2004, 2010]. Les tumeurs de classe 1 présentent un risque plus faible de développer des métastases comparées aux tumeurs de classe 2 qui sont plus agressives et présentent un plus haut risque de décès [Onken et al., 2004, 2005, 2010]. Cependant, les bases génétiques expliquant ce phénomène métastastique restent imprécises.

La monosomie du chromosome 3 étant associée aux tumeurs de mauvais pronostic et donc aux tumeurs de classe 2 [Worley et al., 2007], cela suggère que la perte d'une copie de ce chromosome renferme peut-être un ou plusieurs gènes permettant d'expliquer l'apparition de métastases. Harbour *et al.* ont analysé 31 tumeurs de classe 2 par séquençage nouvelle génération et ont mis en évidence 84% de mutation perte de fonction pour le gène BAP1 (BRCA1 associated protein 1) localisé en 3p21.1 [Harbour et al., 2010]. BAP1 code une ubiquitine hydrolase localisé dans le noyau et joue

un rôle clé dans le remodelage de la chromatine en entraînant la déubiquitination de l'histone H2A et HCF1 [Yu et al., 2010]. BAP1 interagit également avec ASXL1 pour former des groupes polycomb et est ainsi impliqué dans la pluripotence des cellules et autres processus de développement [de Ayala Alonso et al., 2007; Scheuermann et al., 2010]. BAP1 est décrit impliqué dans de nombreux cancers comme le poumon, le sein ou encore les carcinomes du reins [Hershko and Ciechanover, 1998; Wilkinson, 2000; Angeloni, 2007]. BAP1 participe à des complexes protéiques contenant de nombreux facteurs de transcription et participe au contrôle de nombreux gènes impliqués dans différents processus cellulaires [Yu et al., 2010].

Des mutations, délétions ou des réarrangements de BAP1 ont été détectés dans les cancers du poumon et du sein [Buchhagen et al., 1994; Jensen et al., 1998; Mallery et al., 2002; Yu et al., 2010]. Une mutation perte de fonction de BAP1 entraîne l'altération de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN, le métabolisme, la survie ou encore l'apoptose [Yu et al., 2010]. Il s'agit d'un gène suppresseur de tumeurs qui nécessite à la fois une localisation nucléaire et sa fonction de déubiquitination active pour jouer ce rôle [Ventii et al., 2008; Machida et al., 2009]. La présence de si-RNA BAP1 dans la lignée 92.1 de mélanome uvéal montre une diminution de l'expression de gènes tels que ROBO1 (gène de différenciation de la crête neurale), CDH1, C-KIT ou encore SOX10 et EDNRB (gènes de la différenciation mélanocytaire) [Harbour et al., 2010]. D'autres études seront nécessaires pour comprendre le rôle de BAP1 dans les mélanomes uvéaux.

4.5.3.2 Altérations de voies métaboliques

La voie de signalisation des MAP Kinases (Mitogen-Activated Protein Kinases)

Les MAP kinases sont des sérine/thréonine kinases qui peuvent être activées par de nombreux et différents stimuli. Il existe trois grandes familles de MAPK : les protéines ERKs 1, 2 et 3 (Extracellular signal-Regulated Kinases) ; les protéines JNKs 1, 2 et 3 (c-Jun NH2-terminal Kinases) ; et les protéines p38 α , β , γ , δ (p38^{MAPKs}). La voie des MAP kinases peut être activée par différents récepteurs comme ceux à activité tyrosine kinase ou les récepteurs couplés aux protéines G. Dans tous les cas, l'activation d'une MAP kinase résulte de l'activation successive d'une MAP kinase kinase puis de l'activation d'une MAP kinase kinase qui elle-même activera la MAP kinase (Fig. 4.17).

La voie des MAP kinases est activée dans 86% des mélanomes uvéaux [Weber et al., 2003]. Cependant, contrairement aux mélanomes cutanés qui présentent une mutation activatrice de BRAF dans 62% des cas (principalement une mutation V600E), les mélanomes uvéaux ne présenteraient pas de mutation dans cette protéine [Edmunds et al., 2003; Rimoldi et al., 2003; Weber et al., 2003]. Certaines études montrent que cette mutation peut tout de même être mise en évidence dans les mélanomes uvéaux par des techniques plus sensibles car cette mutation BRAF pourrait être présente dans un sous-ensemble de la tumeur [Janssen et al., 2008; Maat et al., 2008]. Ceci permettrait d'expliquer la présence de mutation BRAF dans des lignées cellulaires de MU [Calipel et al., 2003; Kiliç et al., 2004; Calipel et al., 2006].

L'activation de la voie des MAP kinases peut également se faire par l'activation de NRAS dans les mélanomes cutanés, cependant cette mutation n'a jamais été montrée dans les mélanomes uvéaux [Zuidervaart et al., 2005].

Des études récentes permettent d'envisager une possibilité permettant l'activation de la voie MAP kinase. Effectivement cette voie peut être activée par l'activation de récep-

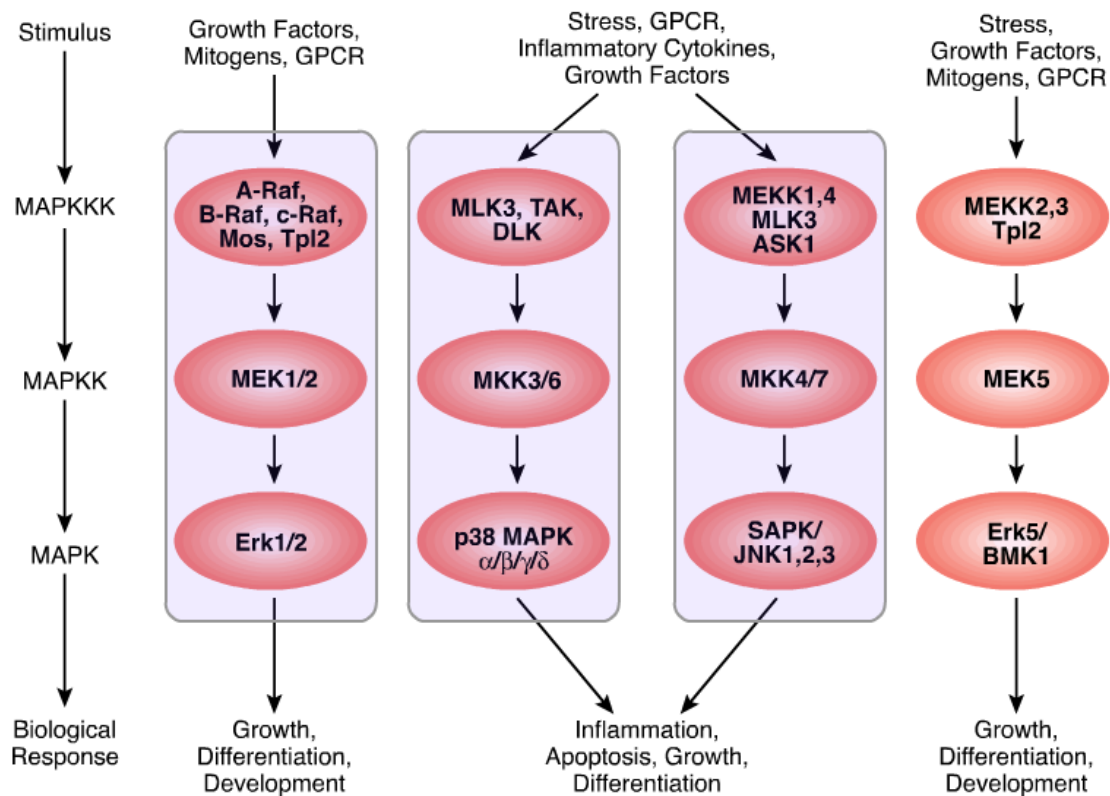


FIG. 4.17: La voie des MAP kinases.

Figure d'après <http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp>

teurs couplés aux protéines G. Il a été montré dernièrement qu'environ 50% des mélanomes uvéaux présentaient des mutations activatrices dans GNAQ [Onken et al., 2008; Bauer et al., 2009; Raamsdonk et al., 2009] ou GNA11 [Raamsdonk et al., 2009, 2010], sous-unité α des protéines G. Ces protéines G sont des hétérodimères qui se couplent à des récepteurs transmembranaires et permettent la transformation du GDP en GTP permettant ainsi le clivage de PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate) en IP3 (inosol triphosphate) et DAG (diacyl glycerol) via PLC β . DAG active ensuite la protéine kinase C (PKC) qui permet d'activer des voies en aval dont celle des MAP kinases.

Les protéines GNAQ et GNA11 présentent dans certains mélanomes uvéaux une mutation Q209L qui entraîne la perte de leur activité GTPase, ne permettant plus l'hydrolyse du GTP en GDP et donc une activation constitutive de PLC β et de la voie MAP kinases. Dans une étude comparant des nævi, des mélanomes uvéaux et des métastases de mélanomes uvéaux, la mutation dans GNAQ est présente dans 55% des nævi, 45% des mélanomes uvéaux et 22% des métastases alors que la mutation GNA11 est présente dans 7% des nævi, 32% des tumeurs et dans 57% des métastases [Patel et al., 2011]. Cela suggère que des mutations GNA11 sont plus associées à un risque accru de métastases dans le mélanome uvéal que des mutations GNAQ. Ces mutations sont fréquentes mais elles seraient précoces dans la tumorigénèse et ne sont pas significativement associées à l'apparition de métastases [Onken et al., 2008; Bauer et al., 2009].

La voie de signalisation PI3K/AKT

La PI3 kinase (PhosphoInositide 3-kinase) joue un rôle crucial dans un large éventail de fonctions cellulaires en réponse à différents signaux extracellulaires (Fig. 4.18). La sérine-thréonine kinase AKT est un effecteur en aval de PI3K, qui en réponse à son activation, va phosphoryler de nombreuses cibles incluant d'autres kinases ou encore des facteurs de transcription et ainsi jouer un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires. PI3K est activée par des récepteurs couplés aux protéines G ou des récepteurs à activité tyrosine kinase et catalyse la conversion du PIP2 (PhosphoInositol-3,4-biPhosphate) en PIP3 (PhosphoInositol-3,4,5-triPhosphate) permettant ainsi l'activation d'AKT (PKB) impliqué dans la prolifération et la survie. Cette voie de signalisation est négativement contrôlée par PTEN qui active la conversion de PIP3 en PIP2 et donc diminue l'activation d'AKT.

L'activation de PI3K a été montrée dans des lignées de mélanomes uvéaux [Naus et al., 2000; Abdel-Rahman et al., 2006; Babchia et al., 2010]. Elle pourrait être due à une perte d'expression de PTEN [Abdel-Rahman et al., 2006]. PTEN est un gène suppresseur de tumeurs localisé en 10q23.3 et impliqué dans différents cancers [Li et al., 1997; Steck et al., 1997]. Des études ont montré une perte dans 30% à 50% des mélanomes cutanés dans cette région [Herbst et al., 1994; Healy et al., 1998] qui serait associée avec un mauvais pronostic [Rodolfo et al., 2004]. Des analyses de cytogénétique ont montré une perte du chromosome 10 dans 27% des mélanomes uvéaux [Höglund et al., 2004]. Abdel-Rahman *et al.* ont identifié une perte de PTEN dans les mélanomes uvéaux agressifs comparés aux tumeurs moins agressives [Abdel-Rahman et al., 2005] et ont identifié une microdélétion en 10q comme étant le mécanisme majeur entraînant la perte d'expression de PTEN Abdel-Rahman et al. [2006]. PTEN pourrait donc jouer un rôle dans la classification des tumeurs de mauvais pronostic et être utilisé dans les thérapies ciblées.

Une des cibles majeure en aval de AKT est mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) qui joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire et donc la prolifération cellulaire et son activation a été montrée dans des lignées de mélanomes de la choroïde [Babchia et al., 2010]. Cependant en testant un inhibiteur de mTOR (la rapamycine) sur ces cellules, les effets sur la prolifération et l'apoptose ont été décevants. Cette étude a permis de montrer que l'inhibition de mTOR dans les cellules de mélanomes uvéaux par la rapamycine entraînait une rétroaction négative de mTOR en augmentant la phosphorylation de AKT et entraîne ainsi l'activation de la voie cycline D1 via GSK3. Dans cette étude effectuée sur des lignées, Babchia *et al.* montrent que les voies de signalisation PI3K et BRAF/ERK sont des voies parallèles qui coopéreraient dans la prolifération cellulaire des mélanomes uvéaux. Cette équipe avait déjà montré que la voie BRAF/ERK contrôlait la prolifération cellulaire dans les mélanomes uvéaux en régulant l'expression de la cycline D1 [Calipel et al., 2006] et dans cette étude [Babchia et al., 2010], ils montrent que l'activation de la cycline D1 nécessiterait l'activation de ces deux voies quel que soit le statut mutationnel de BRAF (qui n'est pas fréquent dans les mélanomes uvéaux comparé aux mélanomes cutanés).

4.5.3.3 Mutations de récepteurs

Plusieurs récepteurs et les facteurs de croissances associés permettent de réguler ces voies et ainsi entraîner leur activation. Parmi ces couples récepteur/ligand nous allons décrire trois récepteurs à activité tyrosine kinase (KIT et MET, IGFR)

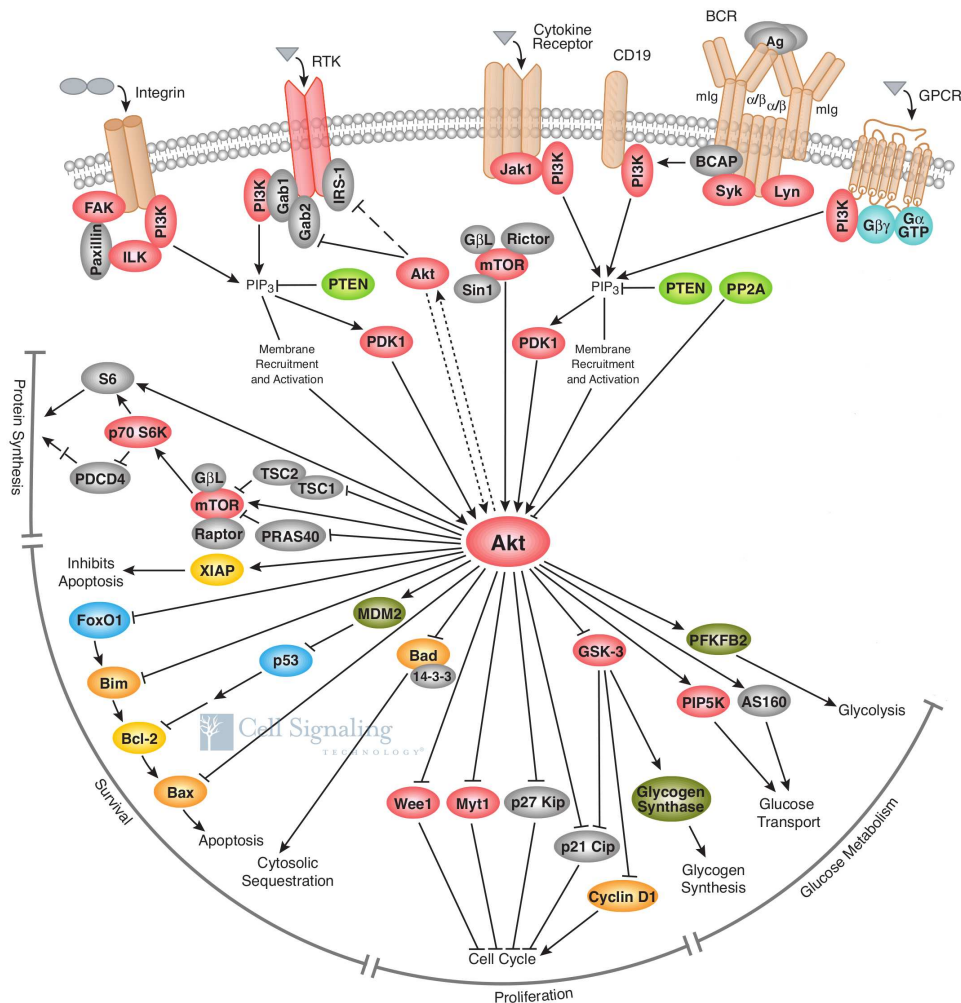


FIG. 4.18: La voie de signalisation PI3K/AKT.

Figure d'après <http://www.cellsignal.com/pathways/akt-signaling.jsp>

KIT et SCF

L'interaction entre le ligand SCF (Stem Cell Factors) et son récepteur KIT est essentiel pour le développement et la survie des mélanocytes dérivés de la crête neurale [Wehrle-Haller, 2003]. KIT est un récepteur transmembranaire de la famille des récepteurs à tyrosine kinase. Son ligand SCF est connu sous diverses appellations comme MGF (Mast cell Growth Factor) ou encore KIT-L (KIT ligand). La fixation de SCF sur le récepteur entraîne la dimérisation de KIT et une autophosphorylation des tyrosines du domaine cytoplasmique qui entraîne la phosphorylation et donc l'activation de protéines cibles comme les PI3K ou les protéines de la voie MAP kinases.

KIT est exprimé dans quasiment tous les mélanomes uvéaux, cependant moins de 40% présentent une sur expression [Pache et al., 2003; All-Ericsson et al., 2004; Pereira et al., 2005]. Le ligand SCF est produit par les cellules de mélanomes uvéaux et par des mélanocytes normaux, cependant seules les cellules de mélanomes uvéaux sécrètent le SCF, ce qui suggère une boucle de régulation autocrine dans ces cellules de mélanomes

[Lefevre et al., 2004]. La stimulation de mélanocytes normaux par du SCF entraîne l'activation des voies AKT et MAPK alors que dans des lignées cellulaires de mélanome uvéal exprimant KIT, la présence de SCF active uniquement la voie MAPK [Pereira et al., 2005]. L'expression de KIT n'est pas associée à la survie dans les mélanomes uvéaux [All-Ericsson et al., 2004; Lüke et al., 2011], en effet il n'existe pas de différence significative entre les mélanomes uvéaux caractérisés par une forte expression de KIT et ceux présentant une faible expression. De plus, pour l'heure aucune mutation activatrice de KIT n'a été décrite dans le mélanome uvéal [Pache et al., 2003; Hofmann et al., 2009]. En revanche, de façon intéressante un haut niveau de SCF dans des tumeurs primaires de mélanomes uvéaux a été significativement associé à une plus faible incidence de développement métastatique indiquant que ce pourrait être un facteur pronostique bénin [Lüke et al., 2011].

IGF1R et IGF1

L'activation du récepteur IGF1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor) est impliqué dans l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT et semble jouer un rôle dans l'adhésion cellule-cellule et dans l'invasion des tumeurs [Leventhal and Feldman, 1997; Zhang et al., 2004]. Ce récepteur est exprimé dans les cellules de mélanomes de la choroïde [Rodeck et al., 1991], mais elles ne produisent pas le ligand IGF1 [Rodeck et al., 1991] qui est produit par les cellules du foie (site principal de développement métastatique). L'inhibition de IGF1R dans des lignées cellulaires de MU entraîne une diminution de la prolifération [All-Ericsson et al., 2002; Kanter-Lewensohn et al., 2000] et une diminution de l'activation des voies MAPK et PI3K [Girnita et al., 2004, 2008]. L'expression du récepteur est associée à la survie des patients et il pourrait jouer un rôle dans la propagation des MU et leur affinité pour le foie [Economou et al., 2005].

MET et HGF

Le proto-oncogène MET est un récepteur à activité tyrosine-kinase. Le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) est une protéine qui agit comme un ligand endogène de ce récepteur. HGF agit comme un facteur mitogène pour les mélanocytes et la sur-expression de MET est corrélée avec l'invasivité des mélanomes [Li et al., 2001]. Les cellules de mélanomes mais pas les mélanocytes expriment HGF ce qui laisse supposer, là encore, une boucle de rétro-contrôle positive dans le développement de mélanomes [Li et al., 2001]. MET est sur-exprimé dans les cellules de MU, mais des mutations activatrices ou des amplifications ne semblent pas être impliquées de manière significative dans cette pathologie [Abdel-Rahman et al., 2010]. Des études contradictoires montrent d'une part qu'une sur-expression de MET serait associée à un plus haut risque de développement métastatique [Mallikarjuna et al., 2007] et d'autre part que pour être significative cette sur-expression doit être accompagnée d'une sur-expression d'IGF1R [Economou et al., 2005].

Deuxième partie

Résultats

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le mélanome de la choroïde est une pathologie rare mais agressive. Les tumeurs primaires peuvent être divisées en deux classes présentant des niveaux d'agressivité différents [Tschentscher et al., 2003; Onken et al., 2004]. Différentes études d'analyse de données haut débit ont déjà été publiées, sur des données de transcriptome [Tschentscher et al., 2003; Onken et al., 2004; Petrausch et al., 2008] ou génome [Ehlers et al., 2005; Onken et al., 2007; Trolet et al., 2009; Abi-Ayad et al., 2011], mettant en évidence des gènes et les régions chromosomiques d'intérêt pouvant être impliqué, soit dans le développement des mélanomes soit dans le développement de métastases.

En France, l'Institut Curie est le centre principal pour le recrutement et le traitement des patients atteints de ce mélanome particulier. La tumorothèque est, par conséquent, assez riche. L'étude du mélanome de la choroïde est un projet institutionnel qui implique des médecins (ophthalmologistes, chirurgiens,...) et des chercheurs (biologistes et bioinformaticiens).

Le but de ce travail était d'analyser les données haut débit disponibles sur cette collection afin de mettre en évidence des marqueurs moléculaires intéressants et de les valider ensuite comme marqueurs pronostiques ou thérapeutiques afin d'améliorer la compréhension des mécanismes sous-jacents au développement métastatique.

Ce travail a principalement été réalisé sur les données de transcriptome disponibles. J'ai bien entendu utilisé et travaillé sur les données de génome dont nous disposons à l'institut. Ces données avaient été analysées par Julien Trolet, Jérôme Couturier *et al.* avant mon arrivée [Trolet et al., 2009].

Le travail réalisé va être présenté selon le type d'échantillons analysés et donc les questions posées.

Dans une première partie je décrirai le travail qui a été fait sur les tumeurs primaires disponibles. Nous disposons d'une collection de tumeurs issues d'énucléation pour lesquelles nous avons un recul d'au moins 36 mois et de nombreuses variables cliniques associées. Le but de l'étude est de mettre en évidence des gènes d'intérêts impliqués dans le développement de métastases. Ce travail a donné lieu à une publication sur l'implication de la phosphatase PTP4A3 dans le développement métastatique dans la revue *Cancer Research* en 2011 [Laurent et al., 2011]. Je décrirai également le travail qui a été réalisé en aval sur des transcriptomes d'une lignée cellulaire connue de mélanome uvéal (OCM-1) en présence de PTP4A3 sauvage ou mutant.

Pour finir, j'aborderai les autres gènes qui sont ressortis de cette analyse.

Dans une deuxième partie je décrirai le travail qui a été effectué sur notre collection de métastases hépatiques.

Dans une troisième partie j'aborderai l'analyse de modèles murins développé au laboratoire d'investigation pré-clinique (LIP) de l'Institut Curie. Pour ce travail, lors de l'établissement de ces modèles, j'ai participé à une première étude des altérations chromosomiques et principalement le comportement du chromosome 3 chez les patients et les modèles de xénogreffes associés. Ce travail a été publié dans *Clinical Cancer Research* en 2010 [Némati et al., 2010].

D'autres données, plus complètes ont ensuite été analysées sur puces transcriptome et génome afin de mettre en évidence les différences entre les modèles de xénogreffes et les patients afin de savoir si ces modèles sont de bons outils pour tester des produits pharmacologiques. Ce travail est en cours de finition et d'écriture en vue d'une publication.

Dans une quatrième partie je présenterai le travail de développement méthodologique auquel j'ai participé afin de mettre à disposition de la communauté scientifique le processus d'analyse que nous appliquons sur bon nombre de nos projets d'analyse. Cet outil a été publié en 2010 dans BMC Research Notes [Servant et al., 2010].

Chapitre 5

Analyse de la collection de Tumeurs Primaires de l'Institut Curie

5.1 Introduction

Nous disposons d'un jeu de 63 tumeurs primaires analysées sur puces Affymetrix HGU133plus2.0, parmi lesquelles 57 ont un recul d'au moins 36 mois.

Ce jeu de données est issu d'une population majoritairement masculine avec une moyenne d'âge de 61 ans. Il est composé de grosses tumeurs (moyenne du diamètre et de l'épaisseur : 13 et 11 mm respectivement) énuclées qui n'ont subi aucune thérapie avant la chirurgie oculaire. Une grande partie de ces tumeurs est localisée sur l'équateur, présente un décollement de la rétine associé et une monosomie du chromosome 3.

Ces tumeurs peuvent être séparés en deux groupes d'agressivité différentes : 28 ont développé des métastases avant 36 mois et 27 n'ont pas (d'après les informations cliniques recensées) ou ont tardivement (après 36 mois) développé des métastases, principalement hépatiques.

En plus des données de transcriptome, les données de génome sur puces CGH sont disponibles pour 45 tumeurs parmi les 57.

La question principale pour l'analyse de ces données est de déterminer les gènes impliqués dans le développement métastatique et ainsi comprendre pourquoi une partie de ces tumeurs développe des métastases très rapidement alors que d'autres ont un pronostic plus favorable. Le but de cette étude en plus d'aider à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans cette pathologie est de trouver des marqueurs pronostiques afin de pouvoir classer les patients à hauts et bas risque et permettre ainsi de tester des solutions thérapeutiques sur des sous-groupes de patients homogènes et ainsi espérer augmenter l'efficacité de ces traitements.

Dans cette partie, je décrirai tout d'abord le travail qui a été fait autour de la phosphatase PTP4A3 identifiée dans nos données et pouvant avoir un rôle dans le développement métastatique. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Cancer Research* en 2011 et un chapitre de livre en 2010. Pour ce travail j'ai effectué l'analyse des données transcriptome (avec la collaboration de Fabien Valet pour la partie survie) et l'écriture du manuscrit. Les validations biologiques ont été effectuées au laboratoire de Simon Saule. Je présenterai suite à ce travail les analyses de transcriptome qui ont été réalisés sur les modèles cellulaires utilisés pour valider le rôle de cette phosphatase.

Je décrirai finalement les autres résultats obtenus sur l'analyse des transcriptomes

des tumeurs primaires.

5.2 Résultats

5.2.1 Implication de la phosphatase PTP4A3 dans les mélanomes uvéaux

5.2.1.1 Une forte expression de PTP4A3 est corrélée avec le risque métastatique chez les patients atteints de mélanome de la choroïde

PUBLICATION

« **High PTP4A3 phosphatase expression correlates with metastatic risk in uveal melanoma patients** »

Laurent C, Valet F, Planque N, Silveri L, Maacha S, Anezo O, Hupé P, Plancher C, Reyes C, Albaud B, Rapinat A, Gentien D, Couturier J, Sastre-Garau X, Desjardins L, Thiery JP, Roman-Roman S, Asselain B, Barillot E, Piperno-Neumann S, Saule S. (2011) ***Cancer Research***. 71(3) :666-674

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Un large pourcentage de patients atteints du mélanome de la choroïde développe des métastases, principalement dans le foie.

Nous avons étudié les profils d'expression et de nombre de copie d'ADN issus de puces à ADN pour identifier les gènes associés au développement métastatique dans ce cancer agressif. Nous avons comparé 28 mélanomes uvéaux issus de patients ayant développés des métastases dans les trois années qui ont suivi l'énucléation à 35 tumeurs issues de patients sans métastases ou ayant développés des métastases après 36 mois.

La protéine PTP4A3 (protein tyrosine phosphatase type IV member 3), a été identifiée comme prédicteur robuste de l'apparition de métastases.

Nous avons démontré que l'expression différentielle de ce gène, qui est localisé en 8q24.3, n'est pas seulement une conséquence de la sur-représentation du chromosome 8q.

La sur-expression de PTP4A3 dans des lignées cellulaires de mélanome uvéal (OCM-1) augmente significativement la migration cellulaire et l'invasion in vivo, suggérant un rôle direct de cette protéine dans le développement métastatique.

Notre travail suggère que PTP4A3 pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante pour traiter les mélanomes uvéaux métastatiques.

High PTP4A3 Phosphatase Expression Correlates with Metastatic Risk in Uveal Melanoma Patients

Cécile Laurent^{1,7,10,11,12,13}, Fabien Valet^{1,2,7,13}, Nathalie Planque^{1,8,10,11,12}, Licia Silveri^{1,3,10,11,12}, Selma Maacha^{1,10,11,12}, Océane Anezo^{1,10,11,12}, Philippe Hupe^{1,7,9,13}, Corine Plancher^{1,2}, Cécile Reyes^{1,3}, Benoit Albaut^{1,3}, Audrey Rapinat^{1,3}, David Gentien^{1,3}, Jérôme Couturier^{1,4}, Xavier Sastre-Garau^{1,4}, Laurence Desjardins^{1,5}, Jean-Paul Thiery¹⁴, Sergio Roman-Roman^{1,3}, Bernard Asselain^{1,2,7,13}, Emmanuel Barillot^{1,7,13}, Sophie Piperno-Neumann^{1,6}, and Simon Saule^{1,10,11,12}

Abstract

A high percentage of uveal melanoma patients develop metastatic tumors predominantly in the liver. We studied the molecular profiles derived from gene expression microarrays and comparative genomic hybridization microarrays, to identify genes associated with metastasis in this aggressive cancer. We compared 28 uveal melanomas from patients who developed liver metastases within three years of enucleation with 35 tumors from patients without metastases or who developed metastases more than 3 years after enucleation. Protein tyrosine phosphatase type IV A member 3 (PTP4A3/PRL3), was identified as a strong predictor of metastasis occurrence. We demonstrated that the differential expression of this gene, which maps to 8q24.3, was not merely a consequence of 8q chromosome overrepresentation. *PTP4A3* overexpression in uveal melanoma cell lines significantly increased cell migration and invasiveness *in vivo*, suggesting a direct role for this protein in metastasis. Our findings suggest that PTP4A3 or its cellular substrates could constitute attractive therapeutic targets to treat metastatic uveal melanomas. *Cancer Res*; 71(3): 666–74. ©2010 AACR.

Introduction

Uveal melanoma is the most common intraocular cancer in adults. Up to 50% of patients develop metastases within a median of 36 months, with a median survival of 6 months after metastasis (1). Several clinical and histopathological features have been correlated with survival, including patient age (>60), anterior location of the tumor, tumor cell histology, largest diameter of the tumor, mitotic activity, and chromosome 3 monosomy. The most frequent chromosomal imbalances in uveal melanoma are loss of chromosome 3 and gains of 8q and 6p (2). Several gene expression profiling studies have identified two molecular classes strongly associated with metastatic risk (3–5). The application of one recently described gene classifier (6) to our data set (Supplementary Fig. 1) separates two classes, but 21% of metastasizing tumors

remain associated with the low-grade group (class 1), justifying further analyses of gene expression to identify genes more specifically associated with metastasis.

We present here an analysis of gene expression in 63 primary tumors. The genes differentially expressed between *meta1* (patients who developed metastasis within 3 years of enucleation) and *meta0* (late- or nonmetastasizing tumors) tumors included a gene encoding protein tyrosine phosphatase type IV A member 3 (PTP4A3), which maps to 8q24.3. High levels of expression of this gene are highly predictive of metastasis. DNA copy number analysis has shown that 8q is overrepresented in high-risk tumors (2). However, the expression profile of *PTP4A3* differed considerably from that of the neighboring genes in the genome, demonstrating that this gene was not simply a passenger gene. We further investigated the role of *PTP4A3* in the development of tumor metastases, by characterizing the migration and invasiveness of uveal melanoma cell lines overexpressing this gene. Our results strongly suggest that the prognosis marker *PTP4A3* may play a causal role in metastasis development in uveal melanoma tumors.

Materials and Methods

Tumor samples and clinical data

A series of 63 tumor samples obtained by enucleation in untreated patients was provided by the Biological Resource Centre of Institut Curie. The study was approved by the ethics committee of Institut Curie and conformed to the Helsinki Declaration. In line with French regulations, informed consent was obtained from the patients concerned. Clinical,

Authors' Affiliations: ¹Institut Curie and Departments of ²Biostatistics, ³Translational Research, ⁴Tumor Biology, ⁵Ocular Oncology, and ⁶Medical Oncology, Institut Curie; ⁷INSERM, U900; ⁸Univ Paris 7; ⁹CNRS, UMR144, Paris, France; ¹⁰Univ Paris-Sud 11; ¹¹CNRS, UMR3347; ¹²INSERM, U1021, Orsay France; ¹³Mines ParisTech, Fontainebleau, France; and ¹⁴Translational Research, IMCB A*STAR, Singapore, Singapore

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Simon Saule, Institut Curie UMR3347 CNRS, U1021 INSERM, Université Paris-Sud 11 Batiment 110, Centre Universitaire F-91405 Orsay, France. Phone: 33-1-69-86-71-53; Fax: 33-1-69-07-45-25; E-mail: simon.saule@curie.u-psud.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0605

©2010 American Association for Cancer Research.

pathological, and molecular features of the tumors are presented in Supplementary Table 1.

We compared tumors displaying early and late or no metastasis (the *meta1* and *meta0* groups, respectively), by investigating patients with a minimum follow-up of 36 months, providing a subset of 57 cases. DNA copy number data were available for 45 of these patients (2). The others were assessed for chromosome 3 monosomy by FISH. Twenty-eight of these 57 patients developed liver metastasis in the first 36 months after diagnosis (*meta1* in our study), seven developed liver metastasis after 36 months and 22 had not developed liver metastasis at the time of analysis (noted *meta0*).

Expression microarray analysis

Labeled cRNA was produced from total RNA, and hybridization, scanning and image analysis were carried out as recommended by the manufacturer of the microarray (Affymetrix), with a two-round amplification protocol. Specimens were analyzed on GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 microarrays (Affymetrix). We used GeneChip Operating Software and the MAS 5.0 algorithm (Affymetrix) to control raw microarray data for the quality of hybridization and synthesis.

Analysis of gene expression data

The data set, corresponding to 63 uveal melanoma primary tumors, is available from the GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), under accession number GSE22138. These data were analyzed with R software (version 2.9.0) and Bioconductor (release 2.4, refs. 7 and 8). Gene expression values for 63 uveal melanoma primary tumors were normalized with the GC-Robust Multi-array Average (GC-RMA) algorithm (9) and filtered, to remove probe sets with expression levels below 3.5 (\log_2 scale) in all samples.

Survival analysis on 63 patients

Univariate Cox models were first applied, to identify clinical variables (from Supplementary Table 1) significantly associated with the endpoint (metastasis-free survival). We then carried out stepwise multivariate Cox model analysis to identify, among these selected variables, a group of clinical variables significantly associated with the endpoint. Univariate and multivariate selections were based on Wald tests, with statistical significance fixed at 5%. The final multivariate model is referred to as the *clinical model*.

For additional filtering, we discarded half the probe sets displaying low levels of variability in expression levels: probe sets with interquartile range values (difference between the third and the first quartile) below the median value were removed. We then used univariate Cox models to detect probes significantly associated with the endpoint. We carried out Wald tests, with correction of the *P* values obtained as described by Benjamini and Hochberg, to account for multiple testing (10).

We investigated whether *PTP4A3* could be used to predict metastasis-free survival, by considering *PTP4A3* as a binary variable and distinguishing between patients with low and high levels of expression of this gene. We used the median level of expression as a threshold. The contribution of this binary variable to endpoint prediction was assessed with Wald tests in (i)

the univariate Cox model and (ii) the multivariate Cox model adjusted for clinical parameters. These models are referred to as the *genomic*, and *clinical and genomic models*, respectively.

The predicted scores (fitted values) from these two models were used to identify groups of patients with significantly different prognoses. For the *clinical and genomic models*, we propose the use of the first and third quartiles to distinguish between patients with good, intermediate, and poor prognoses. For the *genomic model*, we propose the use of the median score threshold to distinguish between patients with good and poor prognoses. The median threshold for the genomic model was also validated on an external data set of 21 primary tumors (3). A log-rank test was used to compare the prognoses of the various groups defined by the models.

Gene expression analysis on the 57 primary tumors

We carried out a principal component analysis (PCA) on the tumor samples, based on the 12 discriminatory genes previously described (6). Because of differences between the platforms used, the mean value of the probe sets for the 12 published genes was used for the PCA.

Genes differentially expressed between the 29 *meta0* and the 28 *meta1* tumors were identified by the significance analysis of microarrays (SAM) method (11). The analysis parameter delta was fixed so as to give a false discovery rate (FDR) $\leq 5\%$. Genome-transcriptome correlation analysis (GTCA) was performed, by Pearson's correlation method, on 45 tumors for which both DNA copy number and RNA transcriptome information were available. We evaluated the correlation between the expression levels of neighboring genes along the genome, with the Transcriptome Correlation Map (TCM) method proposed by Reyal et al. (12). The correlation was calculated with a moving window of 20 genes around each gene.

Generation of OCM-1 cells stably producing EGFP-PTP4A3

Human OCM-1 uveal melanoma cells were obtained in 2003 from Dr. Frederic Mouriaux, (from ref. 13). These cells were analyzed for this study on GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 and Human Exon 1.0 ST Arrays (Affymetrix) and expressed MITF and the pigmentation genes. They were transfected with pEGFPc1 (Clontech) plasmids encoding the wild-type form of PTP4A3, the catalytic mutant C104S (both kindly provided by Prof. Qi Zeng, IMCB Institute, Singapore) or EGFP as a control. Transformants were selected on G418 for 12 days. EGFP-PTP4A3 production was checked by Western blot analysis with the anti-PTP4A3 serum ab26947 (Abcam). The pVNC7 expression vector, encoding the native PTP4A3 and constructed by insertion of the *EcoRI/BamHI* ORF fragment, was also used to transfect OCM-1 cells (Fig. 3A, OCM-1-VNC7-PTP4A3).

Time-lapse video microscopy

We dispensed 50,000 cells into the wells of six-well plates coated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ collagen type I (BD Biosciences). Cell migration was monitored by time-lapse video microscopy under bright white light and UV light, with an inverted phase contrast microscope (Leica DM IRB) equipped with an

incubation chamber (37°C, humidified atmosphere containing 5% CO₂), an x-y-z stage controller and a charge-coupled device (CCD) CoolSnap camera (Photometrics). Images were acquired at 4-minute intervals over a 12 hours time period, with the Metamorph software (Molecular Devices). Movies were reconstructed with a plug-in for ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) developed by F. Cordelière at Institut Curie (Orsay, France). Cells were tracked manually and parameters were calculated with another plug-in also developed by F. Cordelière.

Immunostaining and immunohistochemistry

For the staining of focal adhesions, cells were fixed by incubation for 20 minutes at room temperature in 4% paraformaldehyde and labeled with antibodies against p-FAK (Tyr 397)-R (Santa Cruz Biotechnology) at a dilution 1/500.

Sections (3 µm) were prepared from paraffin-embedded samples and processed for immunohistochemistry by an automated procedure. A polyclonal rabbit antibody, PTP4A3 (P0498 Sigma), was used at a dilution of 1:150. Samples were counterstained with hematoxylin after immunostaining.

Chick embryo metastasis assay

Fertilized chick eggs (EARL Morizeau) were incubated at 38°C, 80% humidity, for 8 days. We then inoculated the chorioallantoic membrane (CAM) with 0.25×10^6 OCM-1-EGFP-PTP4A3, OCM-1-EGFP-PTP4A3(C104S), or OCM-1-EGFP cultured melanoma cells, which were allowed to disseminate during incubation for a further 8 days. The cell lines were introduced in 50 µL of inoculum introduced through a small window in the shell above the CAM generated after the creation of an air pocket between the shell membrane and the CAM.

We assessed the intravasation of melanoma cells from the CAM into the circulation, by the quantitative detection of human *alu* sequences in chick tissue extracts (14). A phenol-chloroform-based protocol was used to extract genomic DNA from dissected femurs treated with SDS, proteinase K and RNaseA. The presence of human *alu* repeats in the chick tissue was assessed by real-time PCR, with primers specific for

human *alu* sequences (sense: 5' CACCTGTAATCCCAGCACTTT 3', antisense: 5' CCCAGGCTGGAGTGCAGT 3', ref. 15), 200 ng of genomic DNA, 3 mM MgCl₂, 0.6 µM of each primer, 200 µM dNTPs, 0.625 units of iTaq DNA polymerase (Biorad) and a 1:200 dilution of SYBR Green I dye (iQ SYBR Green Supermix, Biorad). Each PCR was performed in a final volume of 25 µL, with the iCycler iQ™ (Biorad), under the following conditions: 95°C for 3 minutes, followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 65°C for 30 s and 72°C for 30 s.

Amplifiable chick DNA was quantified by amplifying the *GAPDH* gene with the chGAPDH primers (sense: 5' GAG-GAAAGGTCGCCTGGTGGATCG 3', antisense: 5' GGTGAG-GACAAGCAGTGAGGAACG 3'; ref. 14) under the same PCR conditions described for *alu*.

The number of melanoma cells present in each chick femur was estimated by generating a standard curve from a serial dilution of cells. The number of cells present in the femur was then determined by interpolation from the standard curve, for *alu* signals from experimental samples. Data were processed and statistical analysis was carried out with StatView (SAS Institute Inc.) and Microsoft Excel (Microsoft Corporation).

Results

Survival analysis on the 63 patients

Univariate Cox analysis highlighted significant associations between the endpoint (metastasis-free survival) and monosomy 3 ($P = 0.001$), retinal detachment ($P = 0.014$), and epithelioid versus nonepithelioid tumors ($P = 0.027$). In the multivariate Cox *clinical model*, only monosomy 3 ($P = 0.001$) and retinal detachment ($P = 0.023$) were found to be significantly associated with metastasis-free survival (Table 1).

Filtering based on expression values below 3.5 and the removal of half the probe sets (those with the smallest interquartile range), resulted in 37,389 of the initial 54,675 probe sets being discarded. We identified 514 of the remaining 17,286 probe sets as significantly associated with metastasis-free survival. *PTP4A3* was found to be the probe related to metastasis-free survival with the lowest P value (corrected $P = 0.003$).

Table 1. Summary of survival analysis

Variables	Clinical model		Genomic model		Clinical and genomic model	
	RR [95% CI]	<i>P</i>	RR [95% CI]	<i>P</i>	RR [95% CI]	<i>P</i>
Monosomy 3						
No	1				1	
Yes	5.93 [2.02 – 17.46]	0.001			3.18 [0.96 – 10.53]	0.058
Retinal detachment						
No	1				1	
Yes	2.74 [1.15 – 6.55]	0.023			2.25 [0.94 – 5.42]	0.069
PTP4A3						
< Median (7)			1		1	
≥ Median (7)			4.39 [2.09 – 9.22]	<0.001	3.33 [1.29 – 8.58]	0.013

Abbreviation: RR, relative risk.

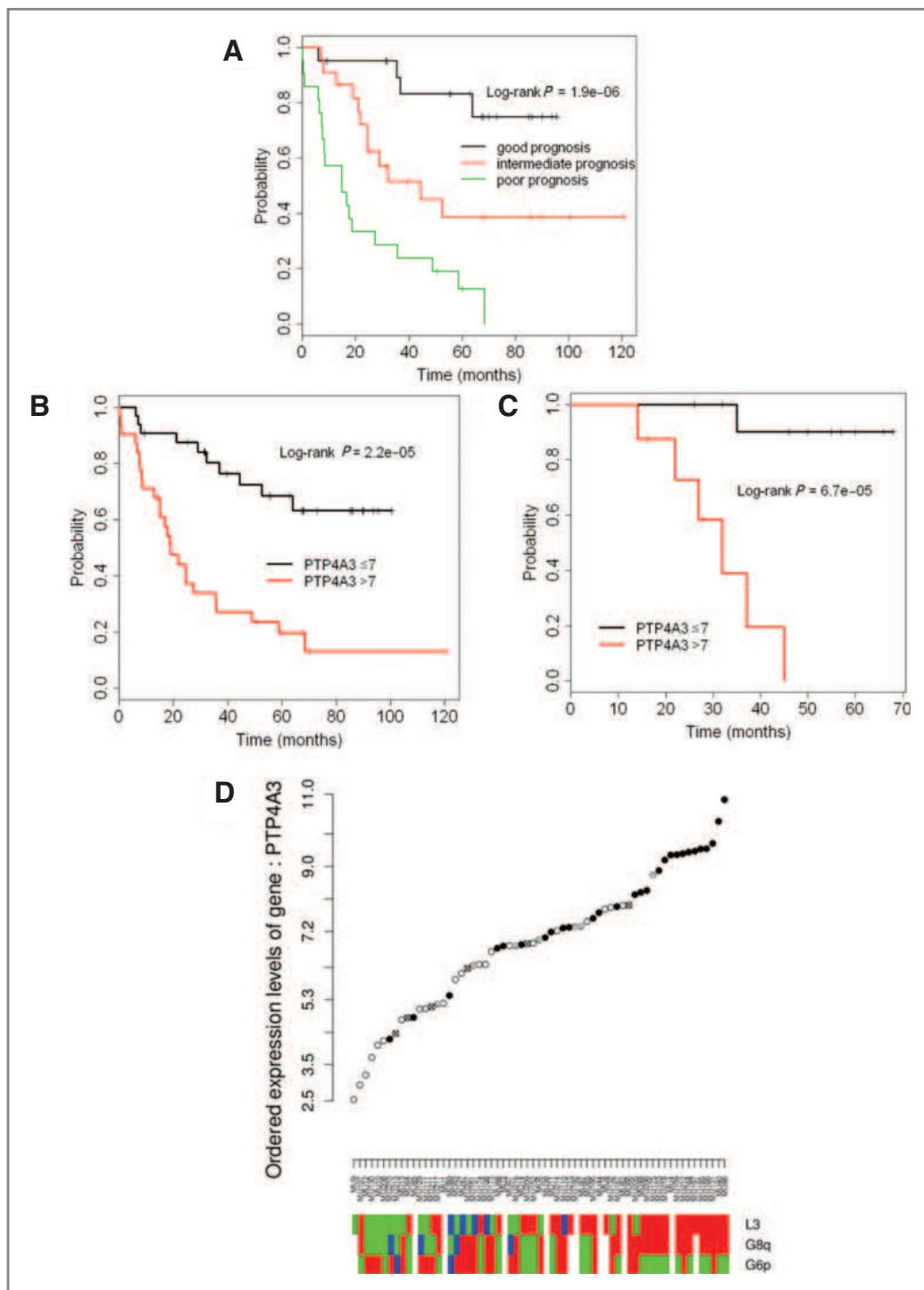


Figure 1. Kaplan–Meier analysis and *PTP4A3* levels. A–C, Kaplan–Meier plots of metastasis-free survival. A, identification of groups of patients with different prognoses based on the score predicted by the *clinical-genomic model* (monosomy 3, retinal detachment, and *PTP4A4* as a binary variable). B, identification of two groups of patients with different prognoses based on the predicted score from the *genomic model* (*PTP4A4* as a binary variable). C, validation of the median as a threshold in the *genomic model* for the identification of two different groups, for an external data set (21 primary tumors) (3). D, *PTP4A3*-ordered expression level (\log_2) on 63 primary tumors. Black points, metastatic tumors. White points, nonmetastatic tumors. Gray points, tumors metastasizing late (after 36 months, considered *meta0* in our analysis). Crossed points, tumors with less than 36 months of follow-up. The heatmap below shows known chromosome alterations. L3, loss of chromosome 3; G8q, gain of the 8q region, and G6p, gain of the 6p region. Green, no alteration. Red, alteration. Blue, partial alteration. White, not available data about chromosomal alterations in these tumors.

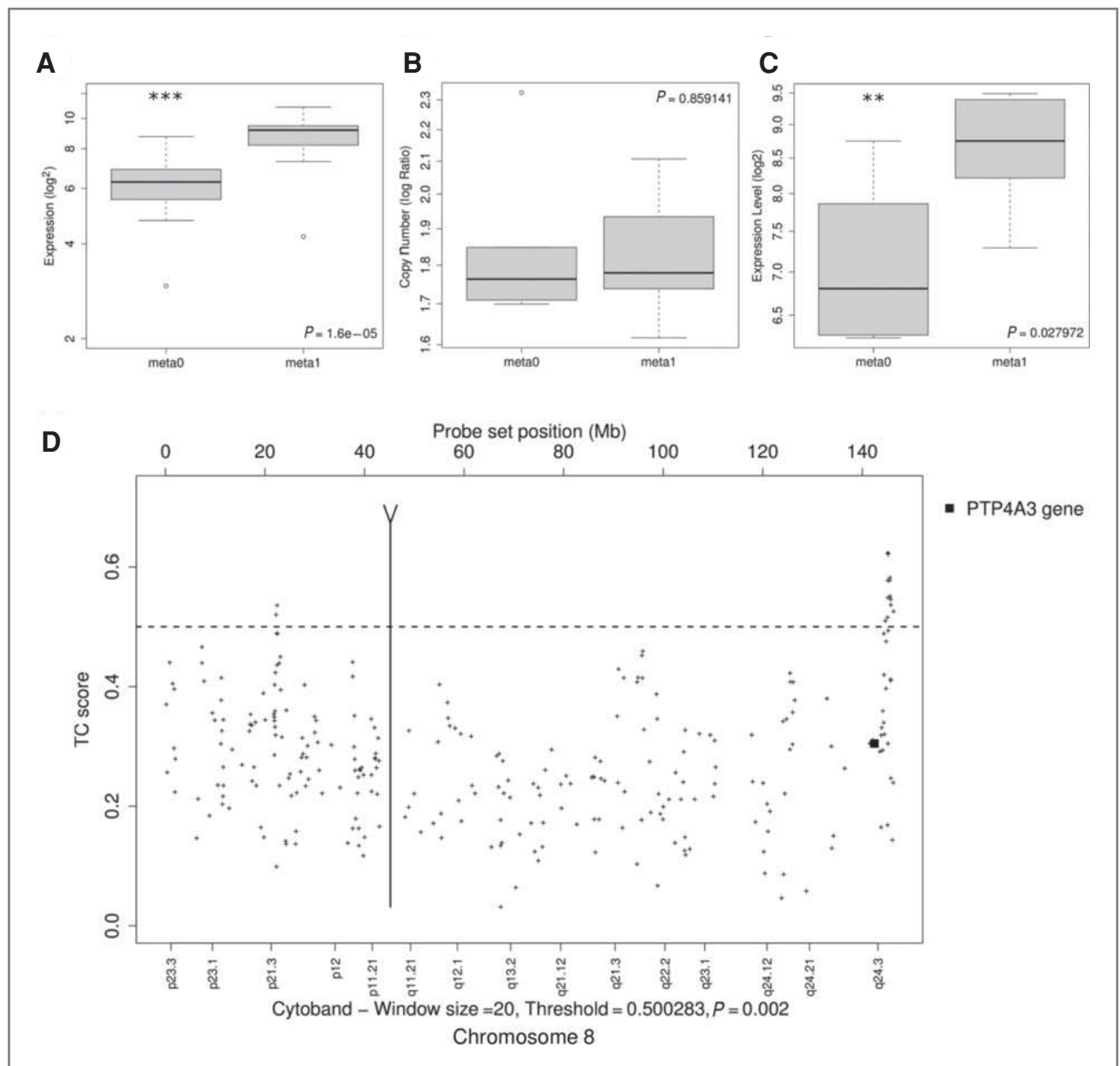


Figure 2. *PTP4A3* is not a chromosome 8 passenger gene. A–C, boxplots representing the distribution of \log_2 expression values (A, C) or log-ratio DNA copy number for *PTP4A3* (B). *P* values were obtained for a Wilcoxon rank-sum test. A, tumors with 8q region overrepresentation ($N = 32$, *meta0* = 15, *meta1* = 17). B and C, tumors displaying homogeneous overrepresentation of 8q ($N = 15$, *meta0* = 5, *meta1* = 10). ***, $P < 10^{-3}$, **, $P < 5 \times 10^{-2}$. D, transcriptome correlation map for tumors with 8q region overrepresentation ($N = 32$). The TC score indicates the significance of the correlation between the expression of a given gene and that of its neighbors (20 neighbors in this case).

PTP4A3 treated as a binary variable (median expression level, equal to 7, used as a threshold) was also strongly associated with metastasis-free survival ($P < 0.001$) and remained significant when the multivariate Cox model was adjusted for the parameters of the *clinical model* ($P = 0.013$, Table 1).

The scores provided by the *clinical and genomic models* made it possible to define three significantly different groups with a "good," "intermediate," and "poor" prognosis (Fig. 1A) of developing metastases (log-rank test, $P = 1.9 \times 10^{-6}$). As shown in Figure 1B, the scores provided by the *genomic model*

(with only *PTP4A3* as a binary variable) identified two groups of patients with significantly different risks of metastasis development (log-rank test, $P = 2.2 \times 10^{-5}$). Similar significant results were obtained with an external data set (ref. 3; Fig. 1C; log-rank test, $P = 6.7 \times 10^{-5}$).

Differential expression of *PTP4A3* is not linked to the overrepresentation of chromosome 8

An analysis of differential expression between 29 *meta0* and 28 *meta1* tumors identified 983 probe sets as differentially

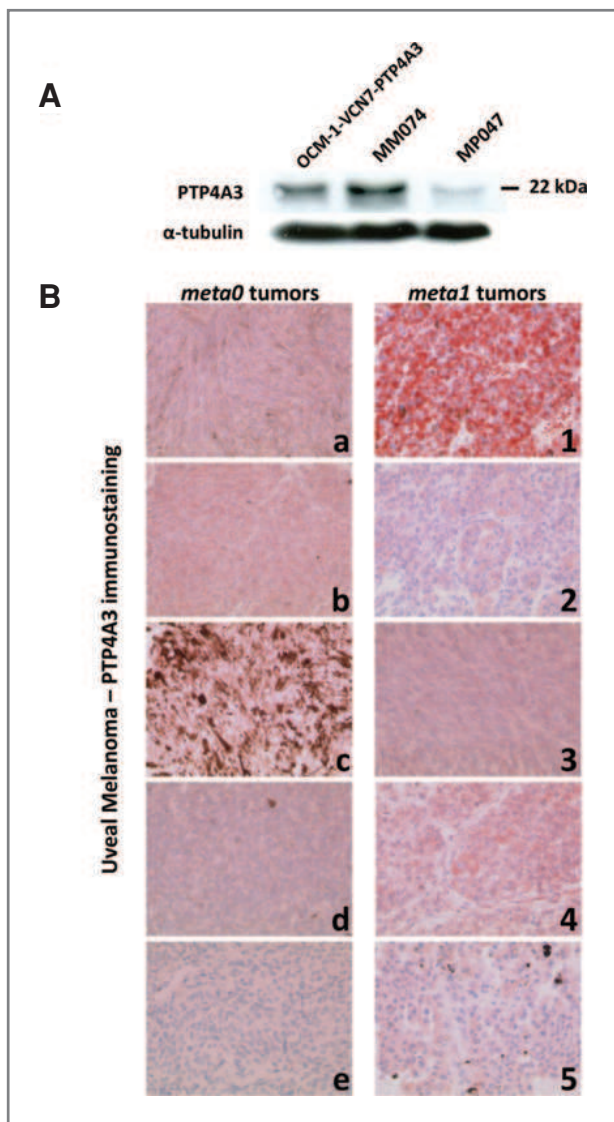


Figure 3. Immunodetection of PTP4A3. A, Western blot analysis of the specificity of the anti-PTP4A3 antibody. A specific band of about 22 kDa was detected in OCM-1 cell lines overproducing PTP4A3. An identical specific band, the intensity of which was correlated with the RNA level obtained by RT-qPCR (data not shown), was observed in tumor extracts of mouse xenografts (MM074, MP047). B, immunohistochemistry: examples of *meta0* and *meta1* primary tumors with weak (*meta0* tumors, a–e) and strong PTP4A3 immunostaining (*meta1* tumors, 1–5), respectively (original magnification $\times 200$). Positive staining appears in red and nuclei were counterstained with hematoxylin.

expressed, with an FDR of 5%. *PTP4A3* was one of the most strongly differentially expressed genes ($P < 10^{-5}$).

PTP4A3 is located in 8q24.3, a region significantly overrepresented in metastatic tumors (2). High levels of *PTP4A3* mRNA may therefore simply be a consequence of chromosome overrepresentation. However, not all uveal melanomas with 8q overrepresentation overexpress this gene (Fig. 1D). We therefore investigated a subgroup of 32 tumors with 8q

overrepresentation and looked for significant differences in *PTP4A3* RNA levels between *meta0* and *meta1* tumors in this subgroup (Fig. 2A). *PTP4A3* was significantly more strongly expressed in the *meta1* group ($P < 0.01$), but *PTP4A3* gene copy number level varied in these tumors. We performed the same analysis on a subgroup of 15 tumors (5 *meta0*, 10 *meta1*) with identical DNA copy numbers for this gene ($P = 0.86$, Fig. 2B). *PTP4A3* was again found to be significantly more strongly expressed in *meta1* than in *meta0* tumors in this subgroup ($P = 0.028$, Fig. 2C). Thus, *PTP4A3* overexpression is not simply a consequence of chromosome overrepresentation.

We investigated whether *PTP4A3* was coexpressed with other genes from the 8q region by studying the correlation between the expression of *PTP4A3* expression and that of its nearest neighbors in the same orientation (similar results were obtained without this selection of DNA orientation). TCM analysis (12) showed that the expression of *PTP4A3* was not correlated with that of its neighbors (Fig. 2D). Indeed, *PTP4A3* was the only gene in this region differentially expressed between *meta0* and *meta1* tumors at the chosen level of significance (data not shown). Thus, the overexpression of *PTP4A3* in *meta1* tumors cannot be accounted for by *PTP4A3* acting as an 8q passenger gene.

As chromosome 6p overrepresentation is associated with a lower risk of metastasis development (in our 45 tumors, $P = 0.0078$) and of cutaneous melanoma (16), we separated tumors displaying chromosome 8q overrepresentation ($N = 32$) from those with a normal chromosome 6 ($N = 14$) and those with an overrepresented 6p ($N = 18$). In the subgroup of tumors with 6p overrepresentation, *PTP4A3* expression levels were significantly lower ($P = 0.01$) than in tumors bearing normal amounts of 6p. In tumors in which both 6p and 8q were overrepresented, *PTP4A3* expression level was not a significant marker of *meta1* tumors ($N = 18$, with *meta0* = 12 and *meta1* = 6; $P = 0.1$). This suggests that the protective effect of chromosome 6p overrepresentation against melanoma metastasis may be in part linked to a reduced *PTP4A3* RNA level.

PTP4A3 is overexpressed in *meta1* tumors

We investigated whether protein levels were correlated with mRNA levels for *PTP4A3* in uveal melanoma tumors, we performed immunodetection of this protein in sections from *meta0* and *meta1* tumors. A Western blot analysis of OCM-1 cells displaying *PTP4A3* upregulation was carried out, to validate the antibody against *PTP4A3* used for immunohistochemistry. OCM-1 cells were transiently transfected to overexpress *PTP4A3*. We then subjected 20 μ g of cell lysate/lane to SDS-PAGE and Western blotting with the *PTP4A3* antibody. A specific band of about 22 kDa was detected in OCM-1 cells overexpressing *PTP4A3* (Fig. 3A). Under the experimental conditions used, endogenous *PTP4A3* protein levels in OCM-1 cells were below the detection limit. We then used tumor cell lysates obtained from mouse xenografts (17) with high (MM074) or low (MP047) *PTP4A3* RNA levels, as determined by RT-qPCR (data not shown and Fig. 3A). Sections of these tumors were used to set up the immunodetection conditions. The results obtained with human tumor sections

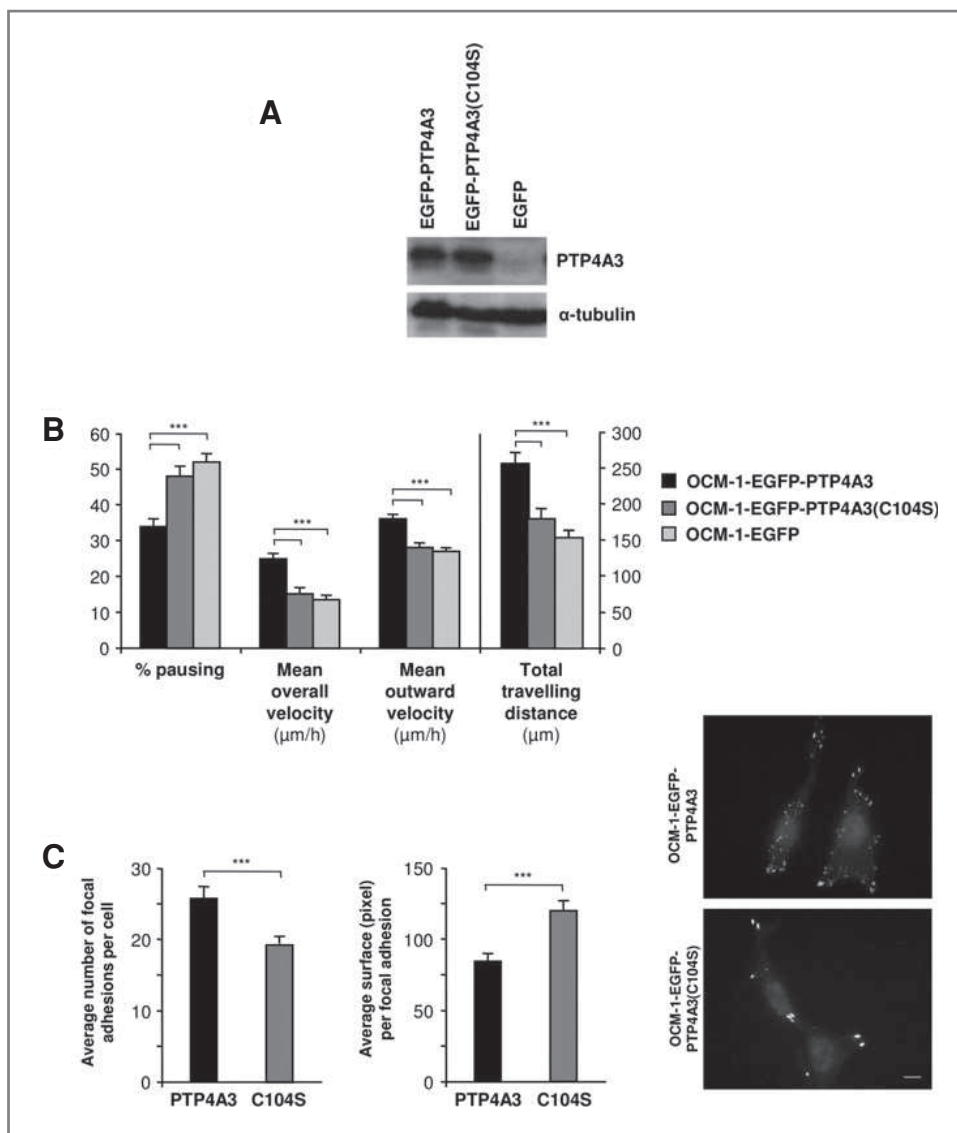


Figure 4. Involvement of PTP4A3 in uveal melanoma cell migration. **A**, establishment of OCM-1 cell lines producing EGFP-PTP4A3, EGFP-PTP4A3(C104S), or EGFP. Western blot analysis of cell lysates. **B**, the overproduction of PTP4A3 promotes the migration of human uveal melanoma cells on collagen I matrix. Migratory characteristics were assessed by determining four parameters. Histograms indicate the mean values of two independent experiments, performed in duplicate. Number of tracked cells: OCM-1-EGFP-PTP4A3 = 51, OCM-1-PTP4A3(C104S) = 39, and OCM-1-EGFP = 46. Error bars show the coefficient of variation; ***, $P < 1.2 \times 10^{-5}$. Similar results were obtained with two other independent clones for each construct (not shown). **C**, histograms showed the number (left) and the surface area (right) of phospho-PTK2-labeled focal adhesions in the cells described in Figure 4A. Images of representative phospho-PTK2 staining for focal adhesions are presented for the cells indicated. Protein distribution was determined by three-dimensional fluorescence microscopy on fixed cells. Two cells were included. Bar, 10 μm .

are shown in Figure 3B, positive staining appears in red and nuclei were counterstained with hematoxylin. Left column, PTP4A3 negative *meta0* tumors (e.g., in panel a *PTP4A3* \log_2 expression: 4.67) and right column PTP4A3 positive *meta1* tumors (e.g., in panel 1, *PTP4A3* \log_2 expression: 10.41).

PTP4A3 overexpression increases migration in uveal melanoma cells

PTP4A3 is known to promote cell migration and invasion in several types of cancer cell *in vitro* and *in vivo* (18–22). OCM-1 uveal melanoma cell lines stably producing wild-type PTP4A3 or the catalytic mutant C104S (ref. 19, Fig. 4A) were established. As PTP4A3 has been reported to interact with integrin $\alpha 1$ and to regulate integrin $\beta 1$ phosphorylation (23), we performed random migration assays, in which migration on collagen I matrix was compared with that on uncoated tissue culture dishes. Time-lapse video microscopy experi-

ments revealed that OCM-1 cells producing the wild-type PTP4A3 migrated faster, paused for shorter periods and traveled further on collagen I matrix than did cells producing the mutant protein or EGFP alone (Fig. 4B and videos 1–3 in Supplementary data). OCM-1 cells producing the wild-type PTP4A3 had a significantly larger number of focal adhesions covering a significantly smaller surface area than cells producing the mutant form of the phosphatase (Fig. 4C).

PTP4A3 overproduction increases the invasiveness of uveal melanoma cell lines

The chick embryo can be used as a naturally immunodeficient host capable of sustaining graft tissues and cells without species-specific restrictions. The use of these embryos makes it possible to carry out a comprehensive analysis of the dissemination of cancer cells, including tumor cell

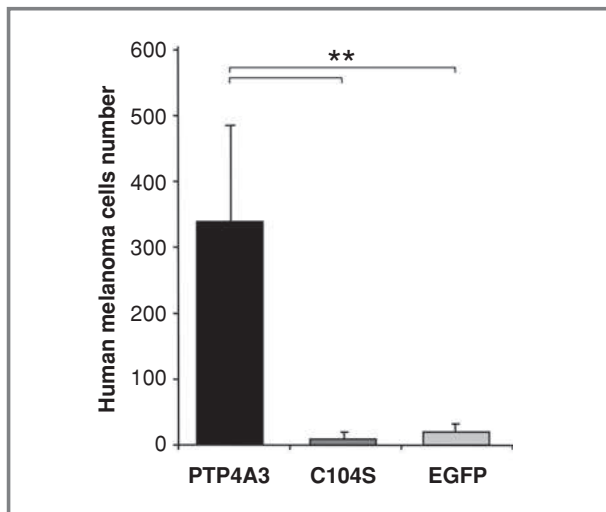


Figure 5. Involvement of PTP4A3 in uveal melanoma cell invasiveness. Quantitative analysis of invasiveness in the chick embryo, using OCM-1 clones producing EGFP-PTP4A3, EGFP-PTP4A3(C104S), or EGFP. Eight days after 0.25×10^6 cells were used to inoculate the CAM of 8-day-old embryos, femurs were isolated. The DNA extracted (200 ng) was subjected to quantitative real-time PCR with human *alu* and chicken *GAPDH* primers. The number of cells present was calculated from the standard curve. Similar data were obtained in two independent experiments. Number of inoculated embryos: OCM-1-EGFP-PTP4A3 = 5, OCM-1-EGFP-PTP4A3 (C104S) = 8, and OCM-1-EGFP = 3. Errors bars indicate the coefficient of variation; ** $P = 0.01$.

intravasation in a model of spontaneous metastasis (24). Uveal melanoma OCM-1 cell lines producing EGFP-PTP4A3, EGFP-PTP4A3(C104S), or EGFP were grafted *in ovo*. One week after inoculation, femurs were dissected and DNA extracted for qPCR experiments with human *alu*-specific oligonucleotides. High levels of colonization occurred only in OCM-1 cells expressing PTP4A3 (Fig. 5).

Discussion

Our study showed that a new predictive gene, PTP4A3, is differentially expressed between *meta0* and *meta1* primary tumors and strongly associated with the occurrence of metastasis in uveal melanoma. PTP4A3 is located on 8q, but its overexpression in *meta1* tumors was not due to 8q overrepresentation. Moreover, PTP4A3 was no longer linked to metastasis risk in the presence of chromosome 6p gain, potentially accounting for the protective effect of 6p overrepresentation. Our analysis was carried out on large tumors only, as only such tumors are obtained by enucleation. Our findings may not, therefore, be applicable to all uveal melanomas and tumors with chromosome 3 monosomy were probably overrepresented in our sample. The role of PTP4A3 in smaller tumors remains to be studied. The immunodetection of PTP4A3 in tumor sections demonstrated a positive correlation between RNA and protein levels. Recently, PCBP1 a RNA-binding protein has been demonstrated as able to suppress the translation of PTP4A3 (25). Because few *meta0* tumors expressed high levels of PTP4A3 mRNA (Fig. 1D), a correlation between PTP4A3 and PCBP1 immu-

nostaining and metastasis occurrence remains to be performed with a large sample of tumors.

Uveal melanoma cell lines overexpressing PTP4A3 migrate faster, spend less time pausing and travel further than cells producing the C104S phosphatase mutant. They also have a larger number of focal adhesions covering a smaller surface area, as shown by phospho-PTK2 staining. The formation and remodeling of focal contacts is a dynamic process regulated by protein tyrosine kinases and small GTPases of the Rho family (26) and modulated by PTP4A3. In our transcriptome analysis, PTK2 expression was found to be correlated with PTP4A3 RNA level ($R = 0.71$, $P < 0.001$). Invasion assays with other cancer cells indicated that PTP4A3 was involved in the invasion of these cells *in vivo* (18, 22, 27). In the CAM assay, uveal melanoma cell lines producing PTP4A3 were invasive and found in the femur of injected embryos, whereas those producing the mutant phosphatase were not. Thus, in addition to increasing cell migration, PTP4A3 may be involved in the regulation of protease-encoding genes. PTP4A3 expression was correlated with the expression of proteases (*ADAM10*, *ADAM23*, *CAPN2*, *IDE*, *HTRA1*) in our sample tumors, and inversely correlated with TIMP3 protease inhibitor levels ($R = -0.57$, $P < 0.001$). MMPs and TIMPs are positive and negative regulators, respectively, of tissue remodeling and tumor progression (28). A direct role for PTP4A3 in the regulation of protease-encoding genes is suggested by the observation that *ADAM23* is significantly more strongly expressed in OCM-1 cells expressing EGFP-PTP4A3 than in OCM-1-EGFP-PTP4A3(C104S), or OCM-1-EGFP cells (unpublished data).

Our results indicate that PTP4A3 may be more than a simple marker of prognosis in terms of metastasis. Instead, it may play a causal role in the development of metastases in uveal melanoma. PTP4A3 is therefore a good candidate target for treatment strategies.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We would like to thank Laetitia Marisa, Pascale Trouillet, André Nicolas, Anna Almeida, Fariba Nemati, Pierre Gestraud, and Pierre Neuvial for their contributions to this work.

Grant Support

This work was supported by grants from the Department of Translational Research, Institut Curie, CNRS, INSERM, Cancéropole Ile-de-France, Association pour la Recherche sur le Cancer, Retina France, and Ligue Nationale Contre le Cancer.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received February 18, 2010; Revised November 4, 2010; accepted November 5, 2010; published OnlineFirst December 6, 2010.

References

- Gargoudas ES, Egan KM, Seddon JM, Glynn RJ, Walsh SM, Finn SM, et al. Survival of patients with metastases from uveal melanoma. *Ophthalmology* 1991;98:383–9.
- Trolet J, Hupé P, Huon I, Lebigot I, Decraene C, Delattre O, et al. Genomic profiling and identification of high risk uveal melanoma by array-CGH analysis of primary tumors and liver metastases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2572–80.
- Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, Harbour JW. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res* 2004;64:7205–9.
- Onken MD, Ehlers JP, Worley LA, Makita J, Yokota Y, Harbour JW. Functional gene expression analysis uncovers phenotypic switch in aggressive uveal melanomas. *Cancer Res* 2006;66:4602–9.
- Petrausch U, Martus P, Tönnies H, Bechrakis NE, Lenze D, Wansel S, et al. Significance of gene expression analysis in uveal melanoma in comparison to standard risk factors for risk assessment of subsequent metastases. *Eye* 2008; 22:997–1007.
- Onken MD, Worley LA, Tuscan MD, Harbour JW. An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma. *J Mol Diag* 2010;12:461–8.
- R Development Core Team (2009). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria:R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0. Available from: <http://www.R-project.org>.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004;5:R80–R80.16.
- Wu Z, Irizarry RA, Gentleman R, Martinez-Murillo F, Spencer F. A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *J Am Stat Assoc* 2004;99:909–18.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc Ser* 1995;B57:289–300.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5116–21.
- Reyal F, Stransky N, Bernard-Pierrot I, Vincent-Salomon A, de Rycke Y, Elvin P, et al. Visualizing chromosomes as transcriptome correlation maps: evidence of chromosomal domains containing co-expressed genes—a study of 130 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Res* 2005;65:1376–83.
- Kan-Mitchell J, Mitchell MS, Rao N, Liggett PE. Characterization of uveal melanoma cell lines that grow as xenografts in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:829–34.
- Zijlstra A, Mellor R, Panzarella G, Aimes RT, Hooper JD, Marchenko ND, et al. A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res* 2002;62:7083–92.
- Schneider T, Osl F, Friess T, Stockinger H, Scheuer VW. Quantification of human Alu sequences by real-time PCR—an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenografts. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:571–82.
- Goldberg SF, Miele ME, Hatta N, Takata M, Paquette-Straub C, Freedman LP, et al. Melanoma metastasis suppression by chromosome 6: evidence for a pathway regulated by CRSP3 and TXNIP. *Cancer Res* 2003;63:432–40.
- Nemati F, Sastre-Garau X, Laurent C, Couturier J, Mariani P, Desjardins L, et al. Establishment and characterization of a panel of human uveal melanoma xenografts derived from primary and/or metastatic tumors. *Clin Cancer Res* 2010;16:2352–62.
- Wu X, Zeng H, Zhang X, Zhao Y, Sha H, Ge X, et al. Phosphatase of regenerating liver-3 promotes motility and metastasis of mouse melanoma cells. *Am J Pathol* 2004;164:2039–54.
- Wang H, Quah YS, Dong JM, Manser E, Tang JP, Zeng Q. PRL-3 down-regulates PTEN expression and signals through PI3K to promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2007;67:2922–26.
- Liang F, Liang J, Wang WQ, Sun JP, Udho E, Zhang ZY. PRL3 promotes cell invasion and proliferation by down-regulation of Csk leading to Src activation. *J Biol Chem* 2007;282:5413–9.
- Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St Croix B, et al. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* 2001;294:1343–6.
- Miskad UA, Semba S, Kato H, Yokozaki H. Expression of PRL-3 phosphatase in human gastric carcinomas: close correlation with invasion and metastasis. *Pathobiology* 2004;71:176–84.
- Peng L, Jin G, Wang L, Guo J, Meng L, Shou C. Identification of integrin alpha1 as an interacting protein of protein tyrosine phosphatase PTP4A3. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:179–83.
- Deryugina EI, Quigley JP. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol* 2008;130:1119–30.
- Wang H, Vardy LA, Tan CP, Loo JM, Guo K, Li J, et al. PCBP1 suppresses the translation of metastasis-associated PRL-3 phosphatase. *Cancer Cell* 2010 ;18:52–62.
- Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 2000;19:5606–13.
- Li Z, Zhan W, Wang Z, Zhu B, He Y, Peng J, et al. Inhibition of PRL-3 gene expression in gastric cancer cell line SGC7901 via microRNA suppressed reduces peritoneal metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348:229–37.
- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 2010;20:161–8.

Supplementary Table 1. Description of primary tumors (N=63)		
Variables	Description	Count
Gender	Male	39 (62%)
	Female	24 (38%)
Age at diagnosis (years)	<= 60	28 (44%)
	> 60	35 (56%)
Mean (range)		61 (28 - 85)
Eye	Right	30 (48%)
	Left	33 (52%)
Tumor Location	Anterior to equator	3 (5%)
	On equator	42 (67%)
	Posterior to equator	9 (14%)
	Posterior and on equator	3 (5%)
	All over the eye	1 (1%)
	NA	5 (8%)
Primary tumor thickness (mm)	>= 8	60 (95%)
	< 8	3 (5%)
mean (range)		11.7 (6 - 17)
Tumor largest diameter (mm)	>= 15	26 (41%)
	< 15	26 (41%)
	NA	11 (18%)
mean (range)		13.8 (1-22)
Retinal Detachment	Yes	36 (57%)
	No	22 (35%)
	NA	5 (8%)
Histopathologic cell type	Epithelioid	21 (33%)
	Spindle	23 (37%)
	Mixte	17 (27%)
	NA	2 (3%)
Monosomy 3	Yes	32 (51%)
	No	18 (29%)
	Partial alteration	5 (8%)
	NA	8 (12%)
Extrascleral extension	Yes	5 (8%)
	No	48 (76%)
	NA	10 (16%)
Metastasis	Yes	35 (56%)
	No	28 (44%)
Months from diagnosis to metastasis, mean (range)		48.8 (8 - 121)
Primary tumors with at least 36 months follow-up		57 (90%)
Metastases	<= 36 months	28 (49%)
	> 36 months	7 (12%)
	no metastases	22 (39%)

5.2.1.2 PTP4A3, une molécule dérégulée dans les mélanomes uvéaux métastatiques

PUBLICATION

« **PTP4A3, a signal molecule deregulated in uveal melanoma metastasis** »

Laurent C, Couturier J, Sastre-Garau X, Desjardins L, Barillot E, Piperno-Neumann S, Saule S. (2010) Wen-Sheng Wu and Chi-Tan Hu (Eds) ***Signal Transduction in Cancer Metastasis*** Chapter 13 pp :255-265. ISBN 978-90-481-9521-3

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Malgré les améliorations dans les protocoles thérapeutiques, plus de 50% des patients présentant un mélanome de la choroïde décèdent de métastases localisées dans le foie. Après le diagnostic de métastases, le temps médian de survie est de six mois et aucun traitement adjuvant efficace est disponible à ce stade de la maladie.

L'analyse de données transcriptome associée à des données de génome a été réalisée sur ce mélanome particulier dans le but d'identifier un ensemble de gènes associés au développement métastatique pouvant être utilisé comme cible dans des traitements spécifiques.

01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

Chapter 13

PTP4A3, a Signal Molecule Deregulated in Uveal Melanoma Metastasis

Cécile Laurent, Jérôme Couturier, Xavier Sastre-Garau, Laurence Desjardins, Emmanuel Barillot, Sophie Piperno-Neumann, and Simon Saule

Abstract Despite improvements in primary treatment protocols, more than 50% of the patients with uveal melanoma die of late-occurring metastases located in the liver. After diagnosis of metastases the average life expectancy is 6 months and no effective treatment is available at this stage of the disease. Transcriptome analysis linked to comparative genomic hybridization have been used for this particular melanoma to identify a set of genes linked to metastasis that may represent valuable future targets for specific treatments.

Keywords Uveal melanoma · Comparative genomic hybridization · PTP4A3 · Metastasis

Contents

13.1 Introduction

13.2 How to Identify Metastasis Inducing Genes?

13.3 Overexpression of PTP4A3 in Class 2 Uveal Melanoma Cells

13.4 The Role of PTP4A3 in Signal Transduction Mediating Tumor Metastasis

13.5 Conclusion

References

13.1 Introduction

The choroid is a layer of highly vascularised tissue surrounding the inner side of the ocular globe. Choroidal blood nourishes the retinal pigment epithelium and the photoreceptors on the outer layer of the retina. The choroid develops from two

S. Saule (✉)
 Université Paris-Sud 11, Orsay F-91405, France
 e-mail: simon.saule@curie.u-psud.fr

46 embryonic tissues, the mesoderm and cranial neural crest cells. The endothelial cells
47 of choroidal blood vessels are derived from the mesoderm, whereas cells including
48 stromal cells, melanocytes and pericytes are derived from neural crest [1]. Uveal
49 melanoma is supposed to occur from uveal melanocytes (located in the iris, ciliary
50 body and choroid) and is the most common intraocular malignancy in adults. Uveal
51 melanoma represent about 4–5% of all melanomas. The incidence of the uveal
52 melanoma increases with age reaching a maximum between the 6th and 7th decade
53 of life.

54 Despite the common embryonic origin of their precursor neural-crest cells, clear
55 differences were found between the clinical outcome and molecular biology of
56 uveal and cutaneous melanomas. Neural crest originating from the trunk neural tube
57 providing melanocytes of the skin behaves differently from neural crest providing
58 choroidal melanocytes and originating from the most anterior part of the neural tube
59 [2]. Delamination, transcription factor repertoire and cellular environment are dif-
60 ferent between anterior and trunk melanocytes. For example, choroidal melanocytes
61 are not expected to transfer their melanosomes to surrounding keratinocytes, a well
62 described function for skin melanocytes [3]. The etiological factors involved in the
63 process of malignant transformation of uveal melanocytes are poorly understood.
64 This is partly because of a lack of significant association with systemic syndromes,
65 the absence of familial involvement in most cases, and the doubtful role of environ-
66 mental factors such as exposure to sunlight in the emergence of uveal melanoma [4].
67 A number of clinical and histopathological features have been correlated with sur-
68 vival. These include patient age (>60), tumour anterior margin location, tumour cell
69 type, tumour greatest diameter, mitotic activity, vascular loops or extraocular exten-
70 sion, and monosomy of chromosome 3. To date, comparative global gene analysis
71 of melanoma have revealed that aggressive tumor cells express genes associated
72 with multiple cellular phenotypes [5, 6]. These findings support the hypothesis that
73 aggressive melanoma cells adopt a multipotent plastic phenotype. One example of
74 melanoma cell plasticity is vasculogenic mimicry, with aggressive melanoma cells
75 expressing endothelial associated genes and forming extracellular matrix (ECM)
76 rich vasculogenic-like network [7, 8].

77 The management of uveal melanomas (Fig. 13.1) has greatly evolved, moving
78 towards more focused and conservative treatments (such as observation, photo-
79 coagulation, thermotherapy, radiotherapy). However, unlike the improved survival
80 rates for the numerous cancers in which early detection and management have
81 made advances, the survival rate for uveal melanoma has not increased signifi-
82 cantly in the last 20 years [9]. According to recent literature, there is no significant
83 difference in survival between patients treated with enucleation and those treated
84 with conservative methods [10]. To date, no adjuvant therapy has proven effi-
85 cacy in terms of disease-free and overall survival, following the local treatment
86 of ocular melanoma. A randomized study of adjuvant chemotherapy versus sim-
87 ple follow-up showed no difference in terms of 5 year overall survival rate in 348
88 patients [11].

89 The metastatic pattern for uveal melanoma differs from that of skin melanoma.
90 Although at diagnosis over 95% of patients have disease limited to the eye, about

13 PTP4A3, a Signal Molecule Deregulated in Uveal Melanoma Metastasis

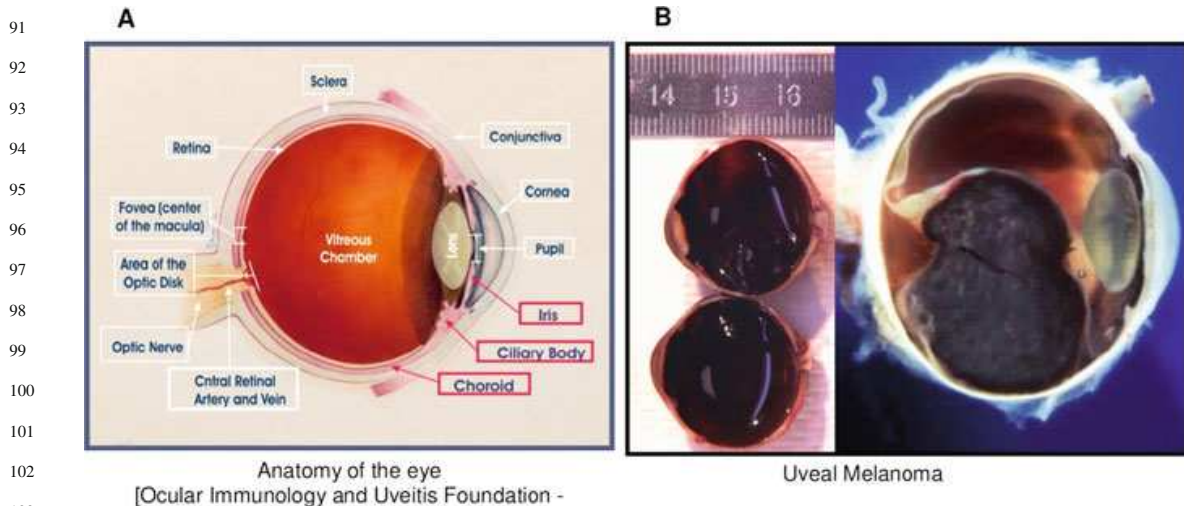


Fig. 13.1 Representation of the eye. (a) Anatomy of the eye, with tissues containing melanocytes underlined. (b) Uveal melanoma resulting in retinal detachment

108 50% will develop metastases after a median time of 3 years, and will ultimately

109 die of their disease [11]. Once the disease becomes metastatic, median survival

110 ranges from 2 to 6 months [12], and only 15% of the patients survive more than

111 1 year. Surgical resection of metastases is feasible only if occurring in limited

112 areas. In retrospective studies, conventional chemotherapy, including dacarbazine

113 (Deticen[®]), cisplatin or nitroso-urea derivatives, gave response rates of less than

114 10% [12].

115 Genetic differences may explain the various types of melanomas and their differ-

116 ent features. Multivariate analyses of genomic imbalances, showed that cutaneous

117 and uveal melanomas harboured different copy number changes [13]. The most fre-

118 quently detected imbalances in cutaneous melanomas are loss of 9p (63%) and loss

119 of 10 (41%) whereas in uveal melanoma they are loss of 3 (50%) and gain of 8q

120 (50%). With the advent of high resolution genome-wide techniques of genomic and

121 expression profiling, it is now possible to study tumors on a systematic basis, that

122 may improve the characterization of high risk tumors. Recently, using gene expres-

123 sion profiling, two distinct molecular classes strongly associated with metastatic risk

124 could be identified [14, 15]. We compared the frequencies of imbalances between

125 38 metastatic monosomic 3 primary tumors and 17 non-metastatic ones. Metastatic

126 tumors predominantly show a gain of the entire 8q, most of them having proximal 8q

127 breakpoints (84%) and a loss of 8p (47%). In non-metastatic tumors, the frequency

128 of 8q gain decreases from 80% at the telomere region to 50% near the centromere,

129 and loss of 8p is rare (12%). A second change concerns chromosome 16, metastatic

130 tumors showing frequent losses of 16q (58%), which are not significantly observed

131 in the non-metastatic ones (18%). Loss of 1p, frequent in the tumours (50%) was

132 not retained in the classifier. Finally, gain of 6p is more frequently noticed in non-

133 metastatic tumours (41%) than in metastatic ones (21%). Except gain of 6p,

134 all others chromosomal alterations were significantly accumulated by metastatic

135 tumors over non metastatic ones [16].

13.2 How to Identify Metastasis Inducing Genes?

Identifying a metastasis inducing gene requires an integrative approach to obtain a global analysis of genomic, transcriptomic, miRNA alterations and of proteins phosphorylations, and to find convergent differences between tumors from patients who did not metastasize (called meta0 in our analysis) and those having lead to metastases (called meta1 in our analysis). One of the advantages of uveal melanoma is the great homogeneity of the tumors, in which only two classes have yet been recognized [14, 15, 17], and therefore we may expect clear-cut differences between samples. Genes that discriminate class 1 (low-risk) from class 2 (high-risk) include highly significant clusters of down-regulated genes on chromosome 3 and up-regulated genes on chromosome 8q, which is consistent with previous cytogenetic studies [14, 16]. A study of Chang et al. [6] reported that Class 2 gene expression signature was the most accurate predictor of metastasis and the biomarkers most strongly associated with the class 2 signature included epithelioid cell type, beta-catenin, E-cadherin, and hypoxia-inducible factor 1a. Gene Set Enrichment Analysis showed a significant association between genes expressed in class 2 tumors and those expressed in primitive ectodermal and neural stem cells. Class 2 tumors exhibited epithelial features, such as polygonal cell morphology, up-regulation of the epithelial adhesion molecule E-cadherin, colocalization of E-cadherin and beta-catenin to the plasma membrane, and formation of cell-cell adhesions and acinar structures. One of the top class-discriminating genes was the helix-loop-helix inhibitor Id2, which was strongly down-regulated in class 2 tumors. The class 2 phenotype could be recapitulated by eliminating Id2 in cultured class 1 human uveal melanoma cells and in a mouse ocular melanoma model. Id2 seemed to suppress the epithelial-like class 2 phenotype by inhibiting an activator of the E-cadherin promoter. Consequently, Id2 loss triggered up-regulation of E-cadherin, which in turn promoted anchorage-independent cell growth [8]. This suggests the presence of cancer cells with a primitive neural/ectodermal stem cell-like phenotype that may be responsible for metastasis in these highly aggressive tumors.

Mutations in the map-kinase pathway (Ras, Raf) have been described as an early event occurring in skin melanomas [18]. Mutations in these genes have not been reported in uveal melanomas, excepted for few cell lines grown in vitro [19]. However, mutations in *GNAQ* (Guanine nucleotide-binding protein alpha subunit, Q polypeptide) have recently been reported in 49% of uveal melanomas [20], but without link with a metastatic behaviour of the primary tumours, and was the only coding sequence analysed found mutated. This suggested that mutations in the coding sequence are not the preferred way to contribute to uveal melanoma metastasis.

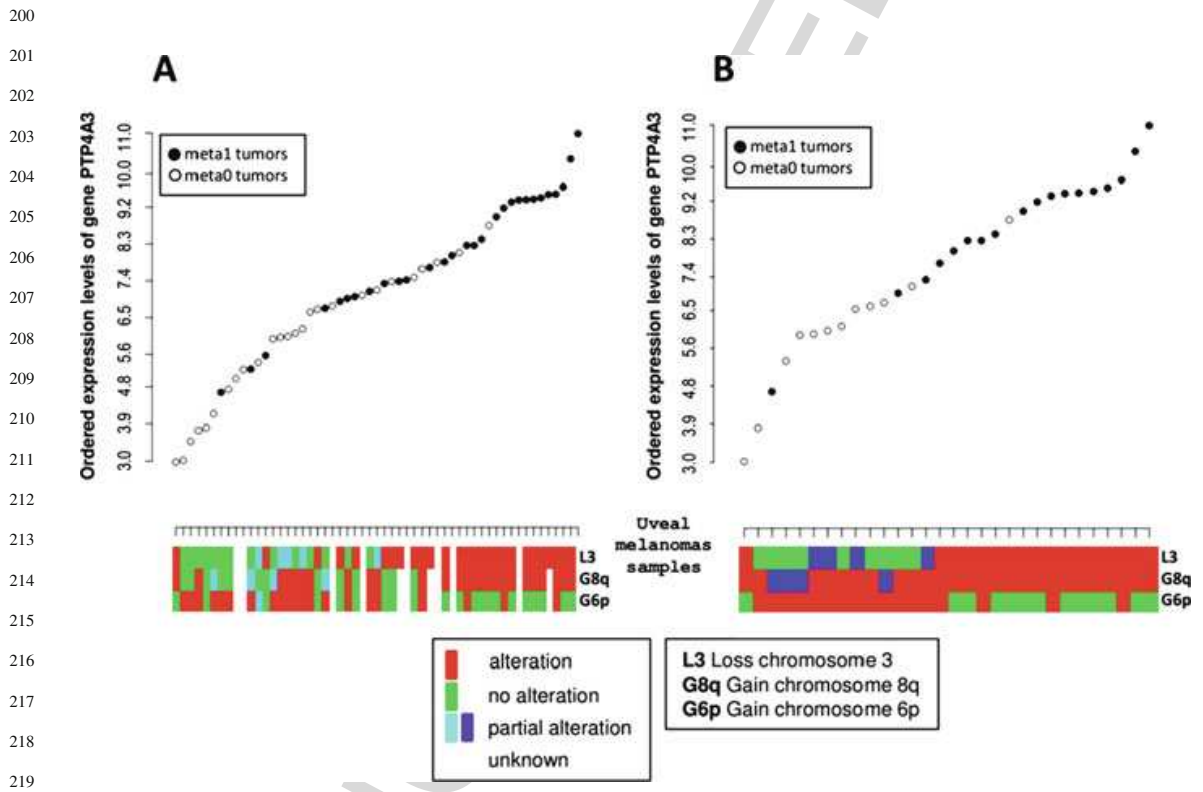
13.3 Overexpression of PTP4A3 in Class 2 Uveal Melanoma Cells

Another approach to identify genes involved in the metastatic process is to use a bio-statistical approach (using a multivariate Cox model) to define the genetic prognosis parameters. The result is compared to the clinical patient data and the transcriptome

13 PTP4A3, a Signal Molecule Deregulated in Uveal Melanoma Metastasis

181 and CGH data, in order to estimate the adding value of genetic prognosis factors to
 182 clinical and genomic variables. From preliminary results we have already obtained
 183 a set of genes involved in cell migration differentially expressed between primary
 184 uveal tumors that have, or not, metastasized. These genes included the PTP4A3
 185 phosphatase (Fig. 13.2a). *PTP4A3* is located on 8q24.3, but over-expression of this
 186 gene is not merely the consequence of chromosome amplification (Fig. 13.2b). If we
 187 compare the expression level of *PTP4A3* in tumors also bearing chromosome 6p in
 188 addition to the 8q24 amplification, *PTP4A3* is no longer differentially expressed
 189 between meta0 and meta1 and its level of expression is rather low (Fig. 13.2b)
 190 suggesting that amplification of 6p act negatively on *PTP4A3* expression.

191 Clinical correlation, ectopic expression and transient suppression studies in gen-
 192 eral, all support a functional role for PTP4A3 in cancer cell invasion and metastasis.
 193 Gene expression profiles compared in colon cancers that had metastasized to the
 194 liver with those in primary tumors and normal colon cells [21] showed that *PTP4A3*
 195 was over expressed and this over-expression is also observed within other types
 196 of cancer [22]. Furthermore, down modulation of *PTP4A3* in an in vivo mouse
 197 cutaneous model of melanoma was able to reduce metastases development [23].
 198 Therefore, this gene seems to be a good new target in human solid tumors to prevent
 199 metastatic development [24].



220 **Fig. 13.2** Intensity mRNA expression level (log2 values) of PTP4A3 gene (Affymetrix U133plus2
 221 arrays). (a) PTP4A3 ordered mRNA expression intensity of 55 samples. PTP4A3 is over-expressed
 222 on metastasizing tumors (black points). These tumors are principally altered on chromosome 3
 223 (loss) and chromosome 8q (gain) (red alterations). (b) PTP4A3 ordered mRNA expression inten-
 224 sity of 30 samples. On the subgroup of uveal melanomas tumors altered on chromosome 8q,
 225 PTP4A3 is still over-expressed on metastasizing tumors. Thus, this over-expressed is not only a
 consequence of an amplification of 8q region. Less aggressive tumors seems to be protected by 6p
 region amplification

13.4 The Role of PTP4A3 in Signal Transduction Mediating Tumor Metastasis

Previously, PTP4A3 have been reported to promote motility and invasion in colon cancer cells by stimulating Rho signaling pathways, using transfection approaches [25]. PTP4A3 promote the activation of the Rho GTPases RhoA and RhoC, and signaling through the Rho effector Rho kinase (ROCK) is necessary for PTP4A3-induced invasion and motility. In contrast, Rac activity is reduced but no effect on Cdc42 have been observed [25]. Members of the Rho family of small GTPases are key regulators of cell movement through their actions on actin assembly, actomyosin contractility, and microtubules [26]. Expression of Rho family proteins is deregulated in some tumors and correlates with progression of the disease [27]. The three prototypical members of the family, Rho, Rac and CDC42, have all been linked to cell movement. Rac1 drives motility by promoting lamellipodia formation, whereas RhoA signals to the kinases ROCK1 and 2, promoting the formation of actin stress fibers and generation of the actomyosin contractile force required for cell movement.

The highly homologous GTPase RhoC has distinct as well as overlapping functions with RhoA, and its overexpression has recently been closely linked with highly invasive and metastatic forms of melanoma [28]. Moreover, cells derived from RhoC-deficient mice are less motile and invasive than their wild-type counterparts containing RhoC [29], further supporting an important role for RhoC in tumor invasion and metastasis. Amoeboid and mesenchymal modes of movement are distinguished by their different usage of signaling pathways. The amoeboid mode involves signaling through ROCK whereas the mesenchymal mode requires extracellular proteolysis for Rac-dependant actin protrusion to be pushed through channels in the extracellular matrix [30]. Rac signals through WAVE2 to direct mesenchymal movement and suppress amoeboid movement through decreasing actomyosin contractility. Conversely, in amoeboid movement, Rho-kinase signaling activates a Rac GAP (ARH-GAP22), that suppresses mesenchymal movement by inactivating Rac. Rho and Rac interplay determinate different modes of tumor movement [31].

Up-regulation of *PTP4A3* also activate the Src kinase, which initiates a number of signal pathways resulting in the phosphorylation of ERK1/2, STAT3, and p130 Cas through negative translational control of Csk, a negative regulator of Src [32]. Interestingly, inhibition of Src family kinase with dasatinib blocks migration and invasion of human melanoma cells [33] further suggesting that tyrosine kinase activity is involved in metastasis development and that the control of this activity is involved in the biological effect of PTP4A3. The MAPK cascade is an important signal transduction pathway triggered by integrin beta1 and PTP4A3 increased the phosphorylation level of Erk1/2. In addition, it was shown that PTP4A3 interacted with integrin beta1 in a yeast two-hybrid system [34].

It has also recently been reported that PTP4A3 is a direct target of p53 [35] upregulated in primary cells subjected to DNA damage. PTP4A3 over expression

13 PTP4A3, a Signal Molecule Deregulated in Uveal Melanoma Metastasis

271 mediate a growth-arrest signal in response to p53 activation. PTP4A3 can act as
272 a stimulator of PI3K-AKT signaling [35, 36], but this action appears to require
273 basal levels of PTP4A3, as increased levels of PTP4A3 led to inhibition of Akt
274 activation and concomitant accumulation of the Cdk2 inhibitors p21 and p27. Thus,
275 as has been suggested with oncogene-induced senescence [37], too much stimula-
276 tion can lead to shutdown of the pathway stimulated by the offending component.
277 Surprisingly, reduction of PTP4A3 level was also found to be cytostatic, via a
278 p38-dependent stimulation of p19ARF, a well known p53 inducer. Therefore, the
279 transition into S- phase may be limited by either induction or loss of a single stim-
280 ulator of the PI3K-Akt pathway. Through the use of mouse embryos fibroblasts
281 (MEFs) variously lacking Akt1 and Akt2, Cdk2, Cdk4 or all three retinoblastoma
282 proteins family members, Basak et al. [35] demonstrated that PTP4A3 could arrest
283 cells without any pRb activity, but could not arrest in the absence of Akt or Cdk2.
284 Thus, post-restriction point inhibition of cell cycle with PTP4A3 (as evidenced by
285 insensitivity to pRb loss) depends on the target kinases shut down by highly induced
286 PTP4A3. In the absence of these pro-proliferative kinases, cells may have adapted
287 by expressing/activating PTP4A3 insensitive targets that drive proliferation in a
288 less regulatable manner. Indeed, such a result is consistent with Basak's observa-
289 tion that several tumor cell lines are insensitive to PTP4A3 over-expression, and
290 this may explain the favorite retention of PTP4A3 expression in metastatic cells.
291 Little is known about PTP4A3 inhibitors, but curcumin, the component of the spice
292 turmeric, shows antitumor effect by selectively down-regulating the expression of
293 PTP4A3/PRL-3 but not its family member (PRL1 and 2), in a p53-independent way.
294 Curcumin inhibited the phosphorylation of Src and stat3 partly through PTP4A3
295 down-regulation [38].

296 In regard with tumor metastasis, loss of p53 have been reported to activate cell
297 migration through actin remodeling and p53 has been shown to suppress src-induced
298 podosome and cellular invasiveness [39, 40].

299

300

301 **13.5 Conclusion**

302

303 When compared with other tumors, uveal melanomas appear rather homogeneous
304 and only two classes could be evidenced in the primary tumors that exhibited dis-
305 tinct metastatic behavior. Among the genes differentially expressed *PTP4A3* which
306 encodes a tyrosine phosphatase, may coordinately function with protein tyrosine
307 kinases in signaling pathways involved in a broad spectrum of fundamental phys-
308 iological processes. Importantly deregulation of this gene may lead to metastasis
309 in uveal melanomas. Pharmaceutical targeting of PTP4A3 or targets of this pro-
310 tein (although not yet clearly defined) may have critical effects on uveal melanoma
311 metastasis development.

312

313 **Acknowledgments** This work was supported by a grant from the Département de Transfert,
314 Institut Curie, from the CNRS, the Association pour la Recherche Contre le Cancer and the INCa,
Cancéropole Ile-de-France.

315

References

- 316 1. Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM, Couly GF. The cephalic neural crest provides
317 pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development*
318 2001; 128; 1059–1068.
- 319 2. Théveneau E, Duband JL, Altabef M. Ets-1 confers cranial features on neural crest delamina-
320 tion. *PLoS ONE* 2007; 2(11), e1142.
- 321 3. Scott G, Leopardi S, Printup S, Madden BC. Filopodia are conduits for melanosome transfer
322 to keratinocytes. *J. Cell Sci.* 2002; 115: 1441–1451.
- 323 4. Moy CS. Evidence for the role of sunlight exposure in the etiology of choroidal melanoma.
324 *Arch. Ophthalmol.* 2001; 119(3): 430–431.
- 325 5. Seftor EA, Brown KM, Chin L, Kirschmann DA, Wheaton WW, Protopopov A, et al.
326 Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microen-
327 vironment. *Cancer Res.* 2005; 65(22): 10164–10169.
- 328 6. Chang SH, Worley LA, Onken MD, Harbour JW. Prognostic biomarkers in uveal melanoma:
329 evidence for a stem cell-like phenotype associated with metastasis. *Melanoma Res.* 2008;
330 18(3): 191–200.
- 331 7. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Peer J, et al. Vascular channel
332 formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am. J. Pathol.*
333 1999; 155(3): 739–752.
- 334 8. Onken MD, Ehlers JP, Worley LA, Makita J, Yokota Y, Harbour JW. Functional gene expres-
335 sion analysis uncovers phenotypic switch in aggressive uveal melanomas. *Cancer Res.* 2006;
336 66: 4602–4609.
- 337 9. Diener-West M, Hawkins BS, Markowitch JA, Schatschat AP. A review of mortality from
338 choroidal melanoma. *Arch. Ophthalmol.* 1992; 110: 245–250.
- 339 10. De Potter P, Shields CL, Shields JA, Cater JR, Tardío DJ. Impact of enucleation versus plaque
340 radiotherapy in the management of juxtapapillary choroidal melanoma on patient survival.
341 *Br. J. Ophthalmol.* 1994; 78: 109–114.
- 342 11. Desjardins L, et al. Etude randomisée de chimiothérapie adjuvante par le deticène dans le
343 mélanome choroïdien. *Ophthalmologie* 1998; 12: 168–173.
- 344 12. Zografos L. In: Masson (Ed.) *Tumeurs Intraoculaires*, 2002: pp. 212–229.
- 345 13. Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, White VA, Säll T, Mitelman F, Horsman D. Dissecting
346 karyotypic patterns in malignant melanomas: temporal clustering of losses and gains in
347 melanoma karyotypic evolution. *Int. J. Cancer* 2004; 108: 57–65.
- 348 14. Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, Harbour JW. Gene expression profiling in uveal
349 melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res.* 2004; 64:
350 7205–7209.
- 351 15. Petrusch U, Martus P, Tönnies H, Bechrakis NE, Lenze D, et al. Significance of gene expres-
352 sion analysis in uveal melanoma in comparison to standard risk factors for risk assessment of
353 subsequent metastases. *Eye* 2008; 22(8): 997–1007.
- 354 16. Trolet J, Hupé P, Huon I, Lebigot I, Decraene C, Delattre O, et al. Genomic profiling and
355 identification of high risk uveal melanoma by array-CGH analysis of primary tumors and
356 liver metastases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009; 50(6): 2572–2580.
- 357 17. Tschentscher F, Lich C, Brandt B, Horsthemke B, et al. Tumour classification based on gene
358 expression profiling shows that uveal melanomas with and without monosomy 3 represent
359 two distinct entities. *Cancer Res.* 2003; 63: 2578–2584.
- 360 18. Saldanha G, Purnell D, Fletcher A, Potter L, Gillies A, Pringle JH. High BRAF muta-
tion frequency does not characterize all melanocytic tumor types. *Int. J. Cancer* 2004; 111:
705–710.
19. Calipel A, Lefevre, G, Pouponnot, C, Mouriaux F, Eychene A, Mascarelli F. Mutation of
B-Raf in human choroidal melanoma cells mediates cell proliferation and transformation
through the MEK/ERK pathway. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 42409–42418.

13 PTP4A3, a Signal Molecule Deregulated in Uveal Melanoma Metastasis

- 361 20. Onken MD, et al. Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma. *Invest.*
362 *Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008; 49(12): 5230–5234.
- 363 21. Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, Croix BS, et al. A phosphatase
364 associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* 2001; 294: 1343–1346.
- 365 22. Ren T, Jiang B, Xing X, Dong B, Peng L, Meng L, Xu H, Shou C. Prognostic Significance
366 of Phosphatase of Regenerating Liver-3 Expression in Ovarian Cancer. *Pathol. Oncol. Res.*
367 2009; 15: 555–560.
- 368 23. Wu X, Zeng H, Zhang X, Zhao Y, Sha H, Ge X, Zhang M, Gao X, Xu Q. Phosphatase of
369 regenerating liver-3 promotes motility and metastasis of mouse melanoma cells. *Am. J. Pathol.*
370 2004; 164: 2039–2054.
- 371 24. Zhao WB, Wang X. Phosphatases of regenerating liver: a novel target in human solid tumors.
372 *Chin. Med. J.* 2008; 121: 1469–1474.
- 373 25. Fiordalisi JJ, Keller PJ, Cox AD. PRL tyrosine phosphatases regulate rho family GTPases to
374 promote invasion and motility. *Cancer Res.* 2006; 66: 3153–3161.
- 375 26. Rydley AJ. Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* 2001; 114: 2713–2722.
- 376 27. Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 133–142.
- 377 28. Boone B, Van Gele M, Lambert J, Haspelslagh M, Brochez L. The role of RhoC in growth and
378 metastatic capacity of melanoma. *J. Cutan. Pathol.* 2009; 36(6): 629–636.
- 379 29. Hakem A, Sanchez-Sweatman O, You-Ten A, Duncan G, Wakeham A, Khokha R, Mak,
380 TW. RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis.
381 *Genes Dev.* 2005; 19(17): 1974–1979.
- 382 30. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, et al. Compensation
383 mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of
384 pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.* 2003; 160: 267–277.
- 385 31. Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, et al. Rac activation and
386 inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 2008; 135: 510–523.
- 387 32. Liang F, Luo Y, Dong Y, Walls CD, Liang J, Jiang HY, Sanford JR, Wek RC, Zhang ZY.
388 Translational control of C-terminal Src kinase (Csk) expression by PRL3 phosphatase. *J. Biol.*
389 *Chem.* 2008; 283: 10339–10346.
- 390 33. Buettner R, Mesa T, Vultur A, Lee F, Jove R. Inhibition of Src family kinases with dasa-
391 tinib blocks migration and invasion of human melanoma cells. *Mol. Cancer Res.* 2008; 6:
392 1766–1774.
- 393 34. Peng L, Jin G, Wang L, Guo J, Meng L, Shou C. Identification of integrin alpha1 as an inter-
394 acting protein of protein tyrosine phosphatase PRL-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;
395 342: 179–183.
- 396 35. Basak S, Jacobs SB, Krieg AJ, Pathak N, Zeng Q, Kaldis P, et al. The metastasis-associated
397 gene Prl-3 is a p53 target involved in cell-cycle regulation. *Mol. Cell* 2008; 9: 303–314.
- 398 36. Wang H, Quah SY, Dong JM, Manser E, Tang JP, Zeng Q. PRL-3 down-regulates PTEN
399 expression and signals through PI3K to promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer*
400 *Res.* 2007; 67(7): 2922–2926.
- 401 37. Courtois-Cox S, Genther Williams SM, Reczek EE, Johnson BW, McGillicuddy LT,
402 Johannessen CM, et al. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced
403 senescence. *Cancer Cell* 2006; 10(6): 459–472.
- 404 38. Wang L, Shen Y, Song R, Sun Y, Xu J, Xu Q. An anticancer effect of curcumin medi-
405 ated by down-regulating phosphatase of regenerating liver-3 expression on highly metastatic
melanoma cells. *Mol. Pharmacol.* 2009; 76(6): 1238–1245.
39. Gadea G, De Toledo M, Anguille C, Roux P. Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent
cell migration and invasion in 3D matrices. *J. Cell Biol.* 2007; 178: 23–30.
40. Mukhopadhyay UK, Eves R, Jia L, Mooney P, Mak AS. p53 suppresses Src-induced
podosome and rosette formation and cellular invasiveness through the upregulation of
caldesmon. *Mol. Cell. Biol.* 2009; 29: 3088–3098.

5.2.1.3 Analyse des lignées OCM-1 transfectées avec PTP4A3

Nous venons de montrer l'importance de la sur-expression de PTP4A3 dans les mélanomes uvéaux métastatiques. Les validations expérimentales *in vitro* et *in vivo* montrent un rôle de cette phosphatase dans la migration et l'invasion cellulaire. Ces validations ont été réalisées sur la lignée cellulaire de mélanome uvéal OCM-1. Dans leur profil d'expression, ces cellules n'expriment pas ou très peu PTP4A3 et des transfections transitoires entraînent leur mort. Des constructions au laboratoire [Laurent et al., 2011] ont alors permis d'établir des clones stables de ces cellules exprimant soit la protéine sauvage (OCM-1-EGFP-PTP4A3) soit la protéine mutée dans son site catalytique (OCM-1-EGFP-PTP4A3(C104S)) soit la GFP (OCM-1-EGFP) comme contrôle.

En plus d'avoir permis les validations biologiques sur l'implication de la phosphatase, ces clones ont été analysés sur puces transcriptomes exons pour comparer leurs profils d'expression. J'ai analysé ces données afin de comparer les cellules OCM-1-EGFP-PTP4A3 et les cellules OCM-1-EGFP-PTP4A3(C104S), et ainsi mettre en évidence des variations dans des voies métaboliques pour aider à la compréhension du rôle de PTP4A3 dans le mélanome de la choroïde.

Matériel et Méthodes

Pour chacune des trois conditions expérimentales (OCM-1-EGFP-PTP4A3, OCM-1-EGFP-PTP4A3(C104S), OCM-1-EGFP), trois réplicats par condition ont été analysés sur puces Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array.

Ces puces ont été analysées au niveau gène en utilisant les fichiers de géométrie de la puce réannotés ¹ [Dai et al., 2005] selon les identifiants EntrezGene ² (fichiers CDF EntrezGene version 13) et par la méthode de normalisation RMA [Gautier et al., 2004]. Cette méthode nous permet d'obtenir et de comparer le niveau d'expression de 22517 gènes uniques.

La classification des données est effectuée grâce à la méthode de classification disponible dans la librairie R *EMA* [Servant et al., 2010], en utilisant la corrélation de Pearson comme métrique et la méthode de Ward comme critère de lien. La recherche de différence entre les trois groupes a été réalisée en utilisant la librairie R *LIMMA* [Smyth, 2004, 2005], en considérant les gènes ayant une p-value ajustée (par la méthode Benjamini-Hochberg ou BH95 Benjamini and Hochberg [1995]) inférieure à 0,01. *LIMMA* est présentée comme une méthode adaptée et robuste dans l'analyse de données de transcriptome [Jeanmougin et al., 2010].

Résultats

La classification des réplicats sur l'ensemble des échantillons et des gènes nous montrent que nous n'avons pas un regroupement parfait des réplicats de chaque groupe (*Fig. 5.1*). On observe dans chaque groupe, deux échantillons qui se positionnent ensemble et le troisième qui se retrouve à part. Cette classification nous montre ainsi que nous n'avons pas des profils d'expression distincts dans les trois conditions observées. Ce mélange dans les échantillons suggère qu'ils sont assez similaires.

L'analyse pour rechercher les gènes dont l'expression varie entre les trois conditions étudiées a mis en évidence 261 gènes différentiellement exprimés entre les OCM-1-

¹http://brainarray.mbni.med.umich.edu/Brainarray/Database/CustomCDF/CDF_download.asp

²<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

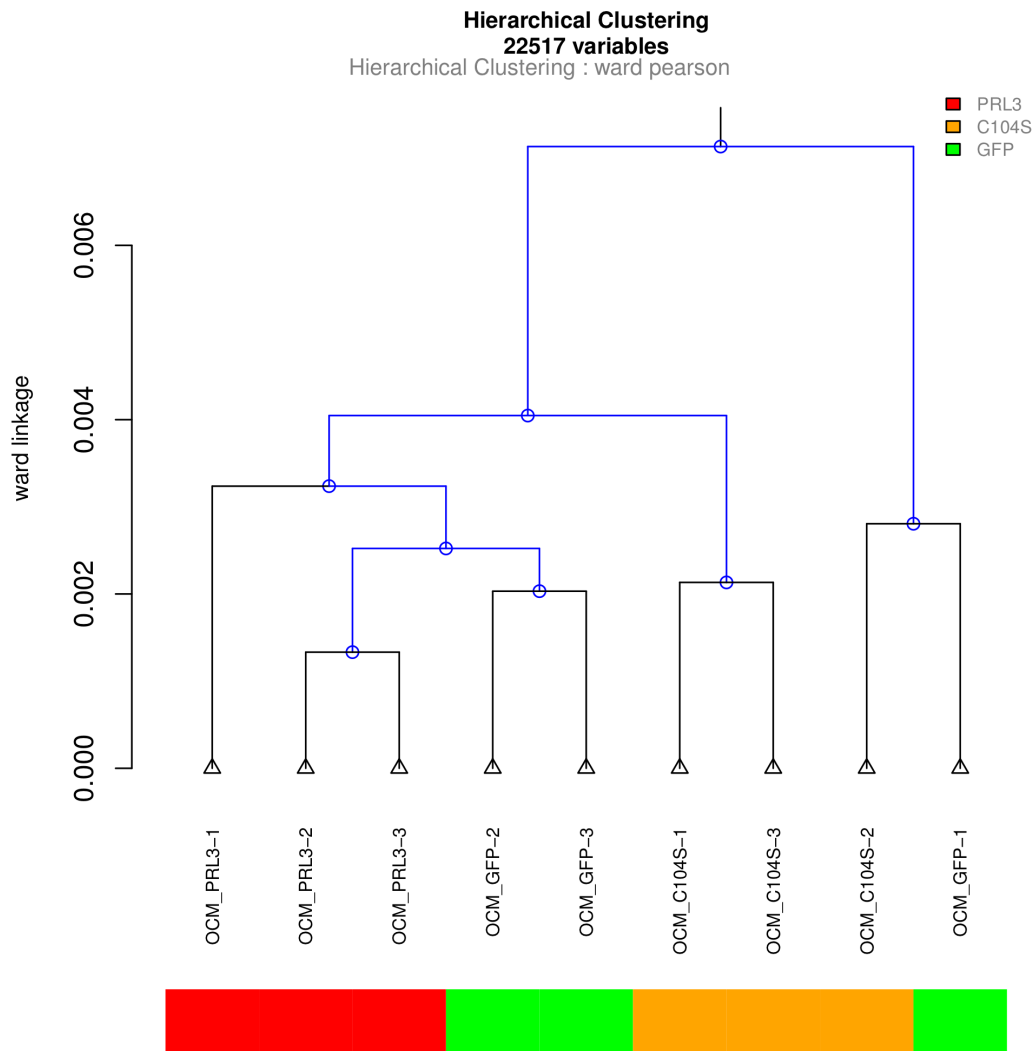


FIG. 5.1: Clustering hiérarchique des constructions OCM-1.
Métrique : corrélation de Pearson. Critère de lien : Ward

EGFP-PTP4A3 et les OCM-1-EGFP-C104S (140 sur-exprimés dans les sauvages et 121 sur-exprimés dans les mutants C104S), alors que les comparaisons avec le contrôle GFP identifient 38 gènes différemment exprimés entre les sauvages PTP4A3 et les GFP et 74 entre les mutants C104S et les contrôles (Fig. 5.2).

Les analyses d'enrichissement sur les gènes différemment exprimés entre les cellules PTP4A3 sauvage ou mutée montrent une sur-représentation de gènes impliqués dans l'adhésion focale (d'après la base de données KEGG). Les intégrines ITGA3, ITGA5, ITGB3 et SHC1 (homologue de Src) sont sur-exprimés dans les cellules PTP4A3 sauvage alors que les gènes tel que la tenascine (TNC), CRKL (homologue de src), la thrombospondine THBS1 ou encore le facteur de croissance PDGFD sont sur-exprimés dans les cellules PT4A3-C104S.

Ces mêmes analyses sur la base de données GO montre, parmi les gènes différentiellement exprimés, un enrichissement de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose (sur-expression dans les C104S par rapport au PTP4A3 sauvage) ou de l'adhésion cellulaire (sur-expression dans les PTP4A3 sauvage).

Parmi les gènes différentiellement exprimés entre les cellules PTP4A3 sauvage et mutant, nous pouvons noter la présence de protéases tel que ADAM23, ADAM10, HTRA1 ou encore d'inhibiteurs de métalloprotéinases tels que TIMP3. Dans notre collection de tumeurs primaires, l'expression de PTP4A3 est corrélée avec l'expression de différentes protéases telles que ADAM10 et ADAM12 et anti-corrélée à TIMP3. ADAM10 est impliqué dans la perte de l'ectodomaine de différentes molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire et a été montré comme étant plus activé dans les métastases de mélanome que dans les tumeurs primaires [Lee et al., 2010]. ADAM12 a été décrit dans la digestion de la matrice extracellulaire [Roy et al., 2004].

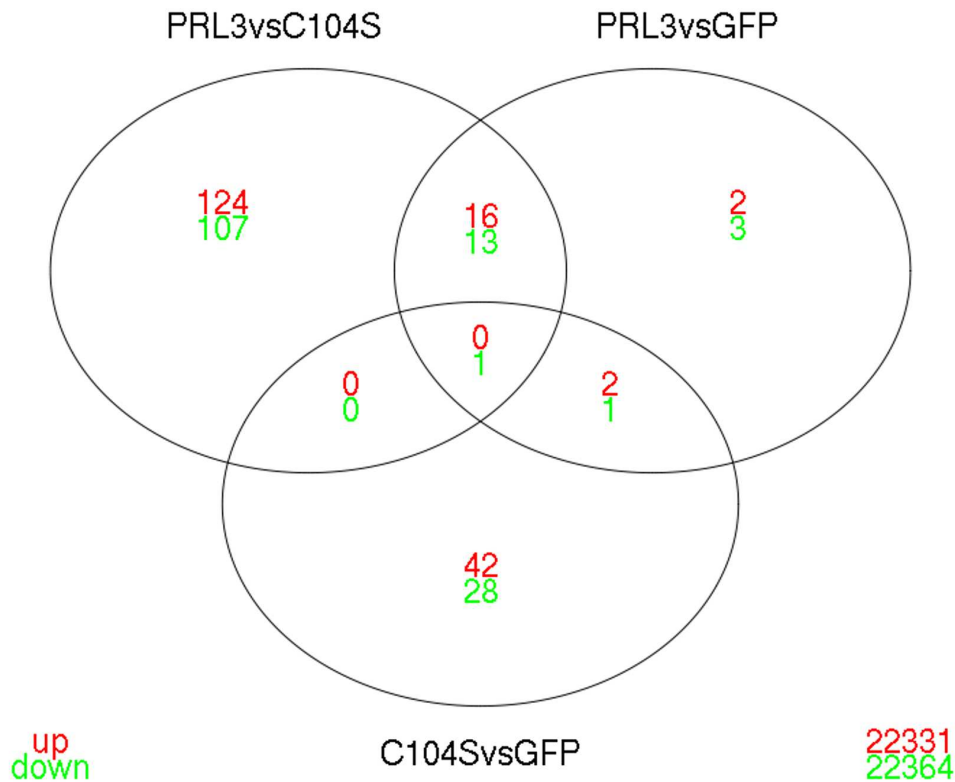


FIG. 5.2: Analyse Différentielle sur les OCM-1.

PRL3vsC104S- Comparaison entre OCM-1-EGFP-PTP4A3 et OCM-1-EGFP-PTP4A3(C104S). Rouge : nombre de gènes sur-exprimés dans les cellules transfectées avec PTP4A3 sauvage. Vert : nombre de gènes sur-exprimés dans les cellules transfectées avec PTP4A3 muté.

PRL3vsGFP- Comparaison entre OCM-1-EGFP-PTP4A3 et OCM-1-EGFP. Rouge : nombre de gènes sur-exprimés dans les cellules transfectées avec PTP4A3 sauvage. Vert : nombre de gènes sur-exprimés dans les cellules transfectées avec la GFP. **C104SvsGFP-** Comparaison entre OCM-1-EGFP-PTP4A3(C104S) et OCM-1-EGFP. Rouge : nombre de gènes sur-exprimés dans les cellules transfectées avec PTP4A3 muté. Vert : nombre de gènes sur-exprimés dans les cellules transfectées avec la GFP.

Conclusion

Cette analyse des profils d'expression des modèles cellulaires utilisés pour la validation du rôle de PTP4A3 dans la migration et l'invasion ne nous a pas permis de replacer cette phosphatase dans une voie de signalisation précise et ainsi comprendre son rôle au niveau moléculaire. Cependant, parmi les gènes différentiellement exprimés, on peut cependant noter la présence de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire ou encore des protéases impliquées dans les interactions cellules - cellules ou cellules - matrice extracellulaire. Les protéases semblent jouer un rôle dans le comportement invasif de nos cellules et vont faire l'objet d'investigation plus poussé au laboratoire.

Il est à noter que parmi ces gènes différentiels, les variations d'expression observées sont assez faibles pour la grande majorité d'entre eux et ne sont pas forcément visibles avec des techniques de biologie moléculaire traditionnelles dans les cellules. Le nombre d'échantillons par conditions (3) est assez faible ce qui limite la puissance des tests statistiques utilisés et la variance intra-groupe est extrêmement faible ce qui biaise les valeurs des p-values des tests. En effet, cette variance est prise en compte dans la comparaison, et plus les variances intra-groupes sont faibles, plus les statistiques de tests sont grandes et les p-values associées petites et donc significatives.

D'autres tests basés sur les rapports d'expression des moyennes des gènes par conditions ont été testés afin de s'affranchir de ce problème de variance. Les résultats obtenus sont similaires, peu de gènes bougent et les ratios inter-groupes sont faibles.

Bien que le nombre d'échantillons disponibles limite la puissance des tests, il n'est pas forcément étonnant de retrouver des profils d'expression assez similaires entre les trois groupes observés. En effet, PTP4A3 est une phosphatase et son activité ne régule pas directement l'expression des gènes comme le ferait un facteur de transcription. Afin de mettre en évidence, des cibles de cette phosphatase, d'autres expériences ont été réalisées au laboratoire telles que la comparaison de phospho-protéines sur des gels 2D.

Les phospho-protéines extraites des lignées cellulaires OCM1-PTP4A3 et OCM1-PTP4A3-C104S ont été comparées grâce à cette technique. Bien que ces expériences soient toujours en cours d'analyse, elles ont déjà permis de mettre en évidence une protéine, DPYSL2 (CRMP2) présentant un statut de phosphorylation différent en présence de PTP4A3 sauvage ou du mutant C104S. Au niveau ARN messager, il n'y a pas de variation significative du niveau d'expression de CRMP2. Cette protéine a été décrite dans le remodelage du cytosquelette, la croissance neuronale et la migration cellulaire [Varrin-Doyer et al., 2009]. Les protéines Cdk5 et GSK3 ont été décrite dans la phosphorylation de CRMP2 [Yoshimura et al., 2005; Cole et al., 2006] conduisant à son inactivation. D'après les résultats obtenus par gels 2D, CRMP2 pourrait être une cible direct ou indirect de PTP4A3. Les expériences sont toujours en cours au laboratoire, et il semblerait que CRMP2 pourrait également jouer un rôle dans la migration de ces cellules.

5.2.2 Autres gènes d'intérêts dans l'analyse des tumeurs primaires

Parmi les gènes d'intérêt, nous avons donc identifié PTP4A3 qui semble avoir un rôle important dans la migration et l'invasion des cellules de mélanome choroïdien. Nous avons effectué un travail important autour de cette phosphatase, cependant d'autres gènes sont également ressortis de l'analyse des tumeurs primaires.

Nous allons dans cette partie présenter globalement les autres résultats obtenus.

Le but principal de cette analyse était de comparer les patients à haut risque de développement métastatique (TP meta1) avec les patients présentant une tumeur de plus

faible agressivité (TP meta0) afin de mettre en évidence des gènes d'intérêts dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans cette différence de comportement métastatique.

Matériel et Méthodes

La collection des 57 tumeurs primaires de l'Institut Curie ayant un recul d'au moins 36 mois, présentée au début de ce chapitre a été analysée sur puce Affymetrix Human HGU133plus2.0. Les données sont décrites dans la Supplementary Table 1 dans la partie 5.2.1.1. Les données ont été normalisées par la méthode gcRMA [Wu et al., 2004b] en utilisant les fichiers CDF réannotés [Dai et al., 2005] selon les identifiants EntrezGene (fichiers CDF EntrezGene version 13) permettant la comparaison de l'expression de 18123 gènes uniques. La distribution bimodale des intensités (Fig. 5.3) permet de filtrer les données. Les gènes qui présentent une intensité inférieure à 3,5 dans l'ensemble des échantillons sont retirés de l'analyse car ils sont considérés comme étant dans les limites de détection du signal. Le jeu de données en sortie de ce filtrage est composé de 12478 gènes uniques.

Le délai médian d'apparition des métastases dans le mélanome de la choroïde est de 36 mois, nous avons donc comparé les profils d'expression des tumeurs métastatiques avant 36 mois (noté meta1) avec les tumeurs non métastatiques à 36 mois de recul (noté meta0) afin de mettre en évidence des gènes liés à l'apparition de métastases dans ce jeu de données. La comparaison a été effectuée en utilisant la méthode *LIMMA* [Smyth, 2004, 2005] sous R.

Résultats

L'analyse différentielle a permis de mettre en évidence 118 gènes dont environ 74% sont sur-exprimés dans les tumeurs métastatiques (TP meta1). Comme le montre le clustering hiérarchique sur ces gènes (Fig. 5.4), ils permettent de séparer les tumeurs en deux branches bien distinctes.

De plus, comme indiqué dans l'introduction de ces tumeurs, nous disposons de leurs profils génomiques par puces CGH pour 45 d'entre elles. Les informations relatives aux chromosomes 3, 6 et 8 (chromosomes d'intérêts identifiés [Trolet et al., 2009]) sont également représentées sur le clustering. Les tumeurs meta1 sont principalement normales pour le chromosome 6p, amplifiées pour le chromosome 8q et délétées pour le chromosome 3, en adéquation avec les données de la littérature.

Parmi les gènes qui varient entre nos deux groupes de tumeurs, plusieurs d'entre eux présentent un intérêt comme cible d'étude potentielle afin de poursuivre les investigations.

Le complexe des élongines (SIII) est un hétérodimère composé de trois sous-unités A, B et C. L'élongine A est le composé transcriptionnellement actif du complexe alors que les élongines B et C (TCEB1) sous des sous-unités régulatrices. Le gène TCEB1, localisé en 8q21.11 correspond à une des trois sous-unités de ce complexe qui activent la transcription et induit l'invasion dans les cellules de cancer de la prostate [Jalava et al., 2009]. Cette capacité à induire l'invasion peut être due à l'augmentation de l'expression de gènes associés à ce phénomène. TCEB1 fait également partie du complexe de Von Hippel-Lindau (VHL) qui cible sélectivement la dégradation du facteur HIF1a en présence

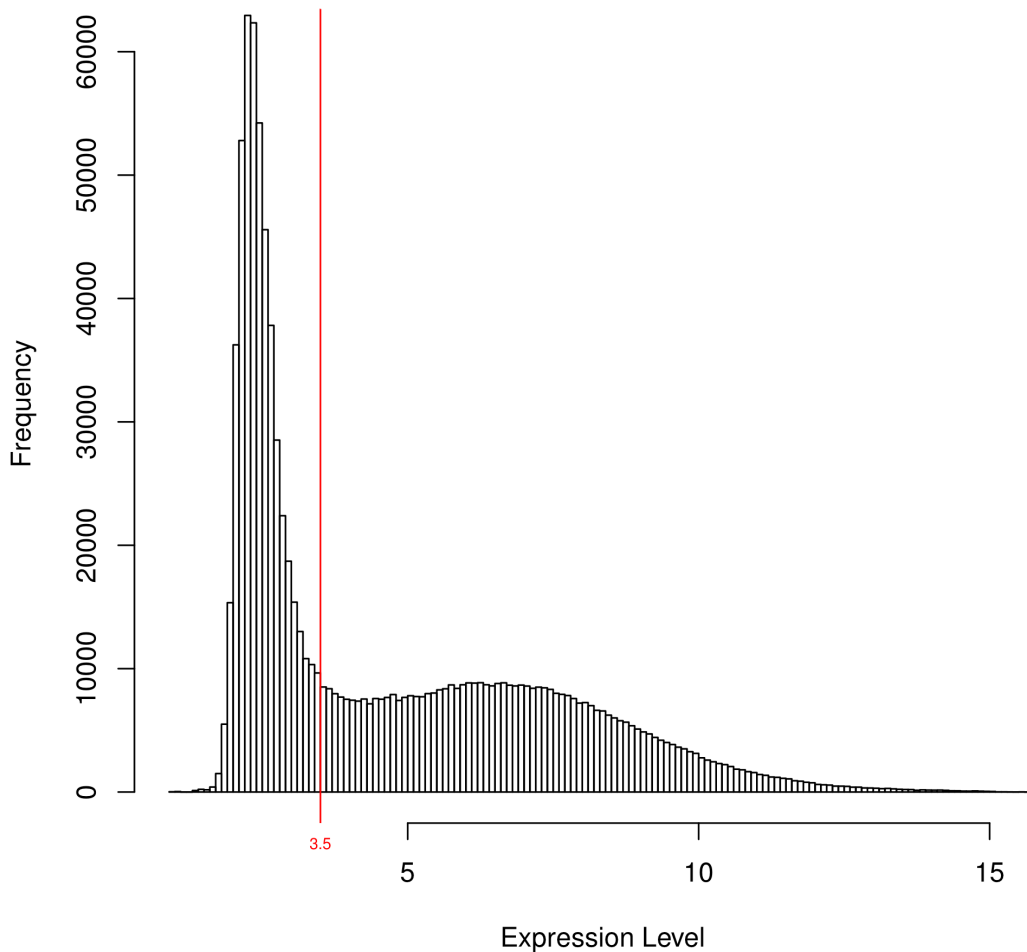


FIG. 5.3: Distribution des intensités d'expression observées sur les 18123 gènes étudiés dans le jeu de 57 tumeurs primaires.

d'oxygène [Cockman et al., 2000] et jouant un rôle bien décrit dans le mélanome cutané [Buscà et al., 2005]. PTP4A3 et TCEB1 sont significativement corrélés et TCEB1 est également sur-exprimé dans les tumeurs métastatiques. VHL n'est pas la seule protéine qui interagit avec TCEB1 et il faudra tester si PTP4A3 est capable d'interagir avec cet activateur de transcription.

La sur-expression de DDEF1 (ASAP1) dans les tumeurs primaires meta1 est également intéressante. Ce facteur de développement et de différenciation, localisé en 8q24.21, est une protéine impliquée dans la croissance tel que SRC, FAK, PIP2 ou encore CRK et régule le remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire à la mobilité cellulaire. La sur-expression de ASAP1 perturbe le renouvellement des plaques d'adhésion focales, bloquant l'étalement des cellules et favorisant la mobilité cellulaire [Ehlers et al., 2005]. Ce gène fortement corrélé à PTP4A3 et localisé dans la même région chromosomique peut également jouer un rôle d'oncogène dans cette pathologie et pourrait ainsi constituer un marqueur intéressant. Une fois encore il serait intéressant d'évaluer d'éventuelles interactions biochimiques entre cette protéine et PTP4A3.

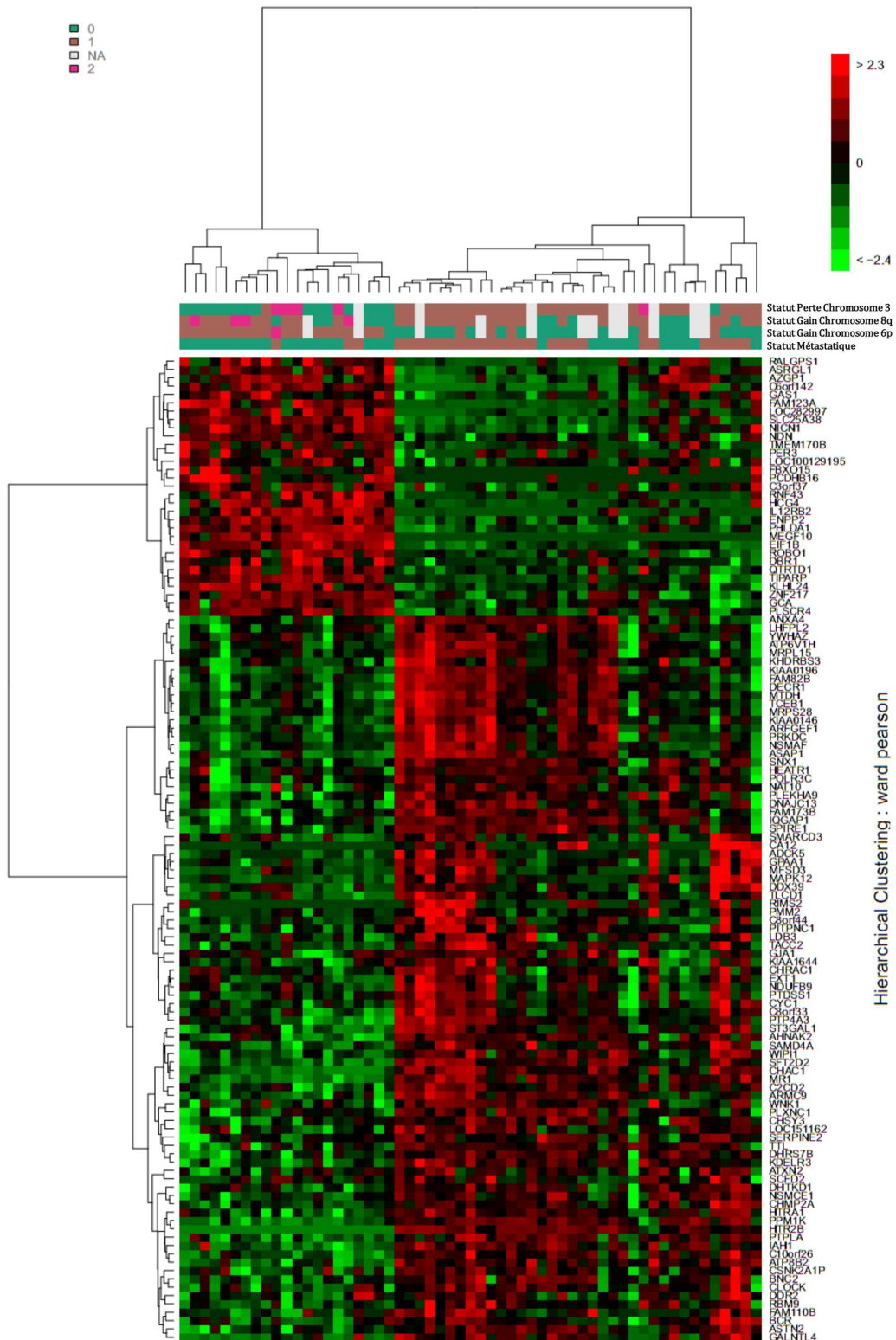


FIG. 5.4: Clustering hiérarchique sur les 118 gènes différentiellement exprimés entre meta0 et meta1. Métrique : corrélation de Pearson. Critère de lien : Ward. Les échantillons sont caractérisés selon leur statut métastatique (vert=meta0, marron=meta1), leur statut du chromosome 6p et du chromosome 8q (vert=normal, marron=amplification, rose=amplification partielle), et leur statut pour le chromosome 3 (vert=normal, marron=délétion, rose=délétion partielle)

Il est à noter également la présence de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN parmi les gènes différentiellement exprimés. Nous nous sommes particulièrement intéressé à la protéine DNA-PK (PRKDC). Le gène PRKDC code pour la sous-unité catalytique d'une protéine sérine/thréonine kinase dépendante de l'ADN. Le second composant est l'antigène Ku codé par le gène G22P1. Pour être active DNA-PK doit être fixée à l'ADN grâce à l'aide de G22P1. PRKDC est impliqué dans le système de réparation de l'ADN par relication non homologue (NHEJ, Non Homologous End Joining), nécessaire à la réparation des cassures double-brin. De façon intéressante, PRKDC et PTP4A3 sont très fortement corrélé ($r=0.77$, $p\text{-value}<0.01$) dans nos données et nous retrouvons cette forte corrélation dans un autre jeu de données publiques de tumeur primaires de MU [Onken et al., 2004]. PRKDC est fortement sur-exprimé dans les tumeurs métastatiques dans le mélanome de la choroïde. Cependant, de façon intéressante, cette corrélation n'est pas retrouvée dans d'autres jeux de données publiques (mélanome cutané, adénomes colorectaux, cancer ovarien, cancer de la vessie...), suggérant une spécificité de ce phénomène dans le mélanome de la choroïde (Fig. 5.5). Il a été décrit dans des mélanomes cutané que contrairement à la progression des mélanocytes en mélanome, la stabilité génétique était indispensable aux cellules de mélanome pour développer des métastases [Kauffmann et al., 2008], et que cette sur-expression des gènes de réparation à l'ADN pouvait expliquer la résistance aux chimio et radio-thérapies dans le mélanome.

Les deux voies prépondérantes dans la réparation des cassures double brins de l'ADN sont la voie NHEJ et la recombinaison homologue (RH). Le NHEJ est opérationnel dans toutes les phases du cycle cellulaire alors que la RH est un mécanisme plutôt utilisé pour la réparation des cassures formées en S/G2. La RH nécessite l'appariement d'un fragment d'ADN avec une séquence homologue servant de matrice à la synthèse réparatrice et est sous le contrôle de BRCA1 entre autre.

Dans les mélanomes choroïdiens métastatiques, il a été montré une forte proportion de mutation perte de fonction BAP1 [Harbour et al., 2010], protéine associée à BRCA1 [Jensen et al., 1998]. Cette observation, en association avec la sur-expression de PRKDC pourrait suggérer une activation préférentielle de la voie du NHEJ (via un contrôle passant par PTP4A3 ?) afin de stabiliser l'intégrité génétique des cellules de mélanomes choroïdiens de forte agressivité. La dérégulation de la voie du NHEJ dans ces cellules par des molécules mimant les cassures doubles brins [Quanz et al., 2009] pourrait ainsi permettre éventuellement un meilleur effet des traitements par chimiothérapie.

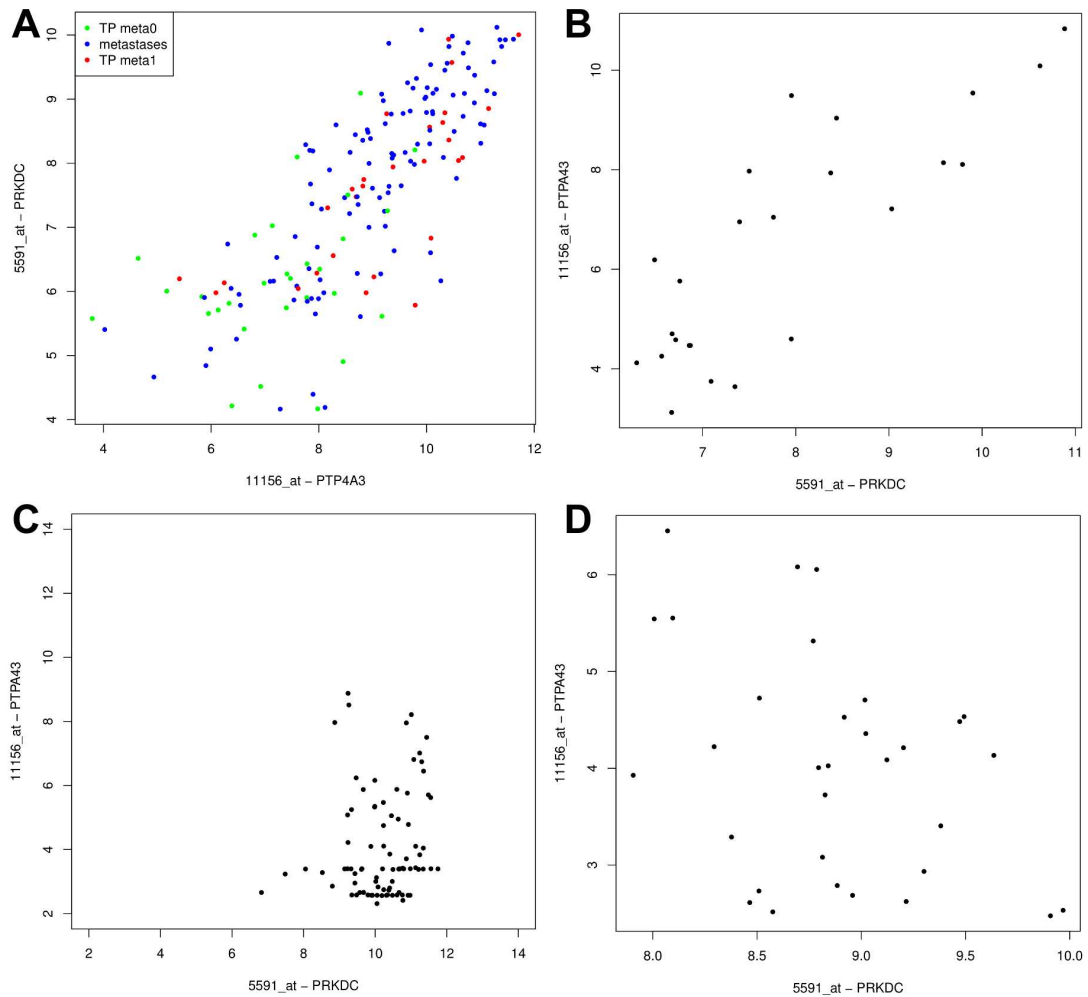


FIG. 5.5: Corrélations observées entre *PTP4A3* et *DNAPK*. **A-** Sur la collection de 57 tumeurs primaires et 115 métastases de l'Institut Curie (vert : tumeurs primaires meta0, rouge : tumeurs primaires meta1, bleu : métastases) $r=0.77$, $p\text{-value}<0.01$; **B-** Sur une autre collection de 24 mélanomes uvéaux [Onken et al., 2004] $r=0.83$, $p\text{-value}<0.01$; **C-** Sur une collection publique de 87 mélanomes cutanés (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE7553>) $r=0.14$, $p\text{-value}=0.2$; **D-** Sur une collection de 32 adénomes colorectaux (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE8671>) $r=-0.38$, $p\text{-value}=0.03$

Chapitre 6

Analyse de la collection de métastases de l'Institut Curie

6.1 Introduction

En plus de la collection de tumeurs primaires, 115 métastases hépatiques ont également été analysées en transcriptome sur puces Affymetrix HGU133plus2.0. Il s'agit de la plus grosse collection de métastases hépatiques disponibles pour cette pathologie.

L'étude sur les données génomiques (parmi les 115 échantillons disponibles en transcriptome, 65 ont été également analysés sur puce CGH [Trolet et al., 2009]) a montré que les métastases hépatiques présentent des groupes d'altérations similaires aux tumeurs primaires ; cependant peu de travail a été réalisé au niveau des transcriptomes de ces tumeurs. Une étude réalisée sur 7 tumeurs primaires et 7 métastases hépatiques [Meir et al., 2007] a montré que les profils d'expression sont différents et que les métastases hépatiques présentent des similitudes dans leur profils d'expression avec du foie sain. Parmi les différences observées entre les tumeurs primaires et les métastases hépatiques, *Meir et al.* relèvent l'importance de gènes impliqués dans la voie NFKB.

La collection de métastases hépatiques de l'Institut Curie a été analysée dans le but de caractériser le profil transcriptomique de ces métastases et de les comparer aux tumeurs primaires. Les informations cliniques des tumeurs primaires montrent que les patients peuvent développer des métastases plusieurs années après avoir été énucléés. Cette observation laisse à supposer que les patients peuvent développer des micrométastases avant même le diagnostic de leur tumeur primaire et cette hypothèse a été soulevée dans diverses études [Eskelin et al., 1999, 2000].

Il s'avère donc intéressant dans l'étude des métastases, en parallèle de la recherche de traitement empêchant le développement de la tumeur primaire ou leur apparition, d'approfondir les connaissances sur leurs profils moléculaires afin de cibler des voies métaboliques impliquées pouvant présenter un intérêt dans d'éventuels traitements.

Nous allons donc dans cette partie présenter le travail effectué sur ces échantillons. Les résultats obtenus sont préliminaires et les analyses devront être poursuivies pour permettre d'avancer dans la compréhension des mécanismes impliqués.

Afin de pouvoir comparer les métastases aux tumeurs primaires, des méthodes de correction (PLS, modèle linéaire) ont été utilisées pour essayer de s'affranchir de la contamination organe foie inhérente à ces données mais n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Des études exploratoires sembleraient indiquer que ces tumeurs se dé-

composent en deux groupes, le premier groupe serait plus proche des tumeurs primaires moins agressives et le second plus des tumeurs à haut risque métastatique.

En parallèle de ces études comparatives, des études de survie sur les 115 métastases ont été réalisées pour mettre en évidence des gènes liés à la survie des patients après apparition de leur métastases. Quelques gènes sembleraient permettre la séparation des patients en 2 groupes de patients avec des survies différentes.

Parmi l'ensemble de nos données transcriptome, 9 couples tumeurs primaires - métastases sont disponibles, et ce sous jeu de données a été analysé séparément pour permettre de comparer plus en profondeur les profils d'expression des tumeurs primaires et de leur métastases hépatiques associées. Malheureusement, les résultats obtenus ne permettent pas réellement de mettre en évidence de différences entre les tumeurs primaires et les métastases.

6.2 Matériel et Méthodes

Le jeu de données des 115 métastases est présenté dans la table 6.1.

Ces données sont issues d'une population mixte, majoritairement âgée de plus de 60 ans à l'âge du diagnostic de la tumeur primaire. Les tumeurs oculaires primaires à l'origine des ces métastases sont de grosses tailles et principalement localisées sur l'équateur. La moitié des métastases sont apparues dans les 24 mois qui ont suivi le diagnostic de la tumeur primaire. Pour une grande partie des métastases, le foie présentait moins de 3 lésions et une large proportion d'entre elles a subi une résection R1 ou R2. La classification des résections est définie par : R0, la section chirurgicale passe à distance de la tumeur en laissant une marge plus ou moins épaisse de tissu sain ; R1, la section chirurgicale passe au ras de la tumeur ; R2, la résection macroscopique est incomplète, l'idéal est de confirmer par une biopsie positive sur le tissu supposé tumoral laissé en place. Enfin, plus de la moitié de ces métastases ne présentent pas de miliaries.

Comme pour les transcriptomes des tumeurs primaires, les données ont été normalisées par la méthode gcRMA [Wu et al., 2004b]. La normalisation a été réalisée en utilisant soit les CDF originels d'Affymetrix (54613 probesets sans les probesets contrôles présents sur la puce) soit en utilisant les fichiers CDF réannotés [Dai et al., 2005] selon les identifiants EntrezGene (fichiers CDF EntrezGene version 13) permettant la comparaison de l'expression de 18123 gènes uniques. Les analyses ont été réalisées sous R. Différentes méthodes ont été utilisées tel que la PLS (Partial Least Square) [Tenenhaus, 1998] afin d'éliminer des effets organes (contamination foie). Les comparaisons entre les différents groupes ont été effectuées en utilisant le package *LIMMA*. Les tests d'enrichissement sur les listes de gènes identifiés ont été réalisées grâce aux packages *hyperGO* ou *hyperKEGG*.

Les métastases hépatiques sont de mauvais pronostic et la survie des patients est limitée. Des analyses de survie ont donc également été réalisées afin d'étudier les avantages que pouvait apporter les informations de transcriptome dans le pronostic et la survie des patients. Afin de mettre en évidence des gènes d'intérêt, les 115 métastases hépatiques ont été divisées en deux jeux de données (76 tumeurs pour le jeu de test et 39 pour le jeu de validation) et l'opération a été répétée 100 fois. Un test du log-rank a été réalisé sur les 100 jeux d'apprentissage et les gènes considérés significativement associés à la survie globale sont ceux dont la moyenne des p-values ajustées (par la méthode BH95 [Benjamini and Hochberg, 1995]) est inférieure à 5% et qui ressortent

également dans le jeu de test. À partir de cette liste de probesets stables, les moyennes (des 100 répétitions) des C-index tous les modèles de Cox pronostiques (avec 1 probeset, 2 ou plus) sont estimés afin d'identifier ceux qui présentent de bonnes performances de prédiction.

Variabes	Description	Nombre	(%)
Description des Tumeurs Primaires			
Genre	Homme	59	51
	Femme	56	49
Age au diagnostique (années)	<=60	72	63
	>60	43	37
Localisation de la tumeur primaire	antérieur à l'équateur	9	8
	sur l'équateur	64	56
	postérieur à l'équateur	28	24
	antérieur et sur l'équateur	1	1
	NA	13	11
Epaisseur de la tumeur primaire (mm)	>=8	55	48
	<8	48	42
	NA	12	10
Taille de la tumeur primaire (mm)	>=15	57	50
	<15	39	34
	NA	19	16
Détachement de la rétine	oui	50	43
	non	46	40
	NA	19	17
Description des Métastases			
Délai d'apparition des métastases (mois)	<=24	56	49
	> 24	59	51
Type de résection	R0	35	30
	R1 ou R2	80	70
Nombre de métastases résectées	>3	35	30
	<=3	80	70
Présence de miliaires	oui	41	36
	non	73	63
	NA	1	1

TAB. 6.1: Description clinique des métastases hépatiques. Les caractéristiques des tumeurs primaires ayant développées ces métastases sont également décrites.

6.3 Résultats

6.3.1 Les profils d'expression des métastases

Afin de rechercher si notre collection de métastases hépatiques présente des profils d'expression différents par sous-groupes, des analyses non supervisées comme l'ACP ou le clustering ont été effectués sur l'ensemble des 18123 gènes présents sur la puce et sur les 500 gènes les plus variés sélectionnés par IQR (l'Inter-Quartile Range est une mesure de dispersion qui s'obtient en faisant la différence entre le premier et le troisième quartiles). La dispersion des données est semblable selon le nombre de variables utilisées (l'ensemble des gènes ou les 500 plus variés). Les données analysées par ACP sur les 500 gènes les plus variés ont été étiquetées selon différents critères présentés dans la table 6.1 et sont représentées sur la figure 6.1. La dispersion des métastases dans l'espace de ces 500 gènes semble indiquer deux groupes différents de métastases (côté négatif et côté positif de l'axe 1 de l'ACP). Cependant ces deux groupes ne sont pas assimilables aux caractéristiques cliniques disponibles. En effet, cette dispersion de ces deux groupes n'est pas superposable à l'âge au diagnostic (fig. 6.1.A), le délai d'apparition des métastases (fig. 6.1.B), le type de résection chirurgicale subie (fig. 6.1.C), le nombre de lésions présentes (fig. 6.1.D) ou encore la présence de miliaire (fig. 6.1.E).

Un des buts dans l'étude de ces données étant de comparer ces métastases aux tumeurs primaires disponibles, ces dernières ont été ajoutées sur l'ACP des métastases (fig. 6.1.E). Les tumeurs primaires ne participent donc pas à la construction des axes. Cette représentation indique qu'une seule partie des métastases hépatiques semblent proches des tumeurs primaires selon leurs profils d'expression. L'autre partie des données est à part.

Ces analyses exploratoires montrent donc que les métastases ne se regroupent pas selon les caractéristiques cliniques disponibles, cependant il semblerait qu'une partie d'entre elles présente un profil d'expression proche des tumeurs primaires.

La comparaison des profils d'expression par la méthode *LIMMA* met en évidence 6841 différentiellement exprimés entre les tumeurs primaires et les métastases avec un ajustement des p-values à 5% par la méthode de Benjamini-Hochberg [Benjamini and Hochberg, 1995] dont une bonne partie sont des gènes spécifiques du foie. La contamination foie est un problème inhérent aux métastases hépatiques. Pour s'affranchir de cette contamination, la meilleure méthode aurait consisté à comparer ces métastases avec du foie sain, mais nous ne disposons pas de telles données dans la tumorotheque de l'Institut Curie. Nous avons essayé d'en récupérer sur les banques de données publiques, mais cet effet organe se confond alors avec un effet lot puisque les données ne sont pas préparées dans les mêmes laboratoires et donc les mêmes conditions. Nous avons tenté d'utiliser la méthode PLS, une méthode supervisée qui permet d'estimer un poids à chacun des gènes selon son implication dans les groupes données aux échantillons (ici œil ou foie) et de le soustraire à la matrice de données d'origine. Cette correction n'est pas plus satisfaisante car elle se superpose à notre analyse comparative et écrase ainsi l'ensemble des données entraînant une perte d'information plus importante qu'une simple correction d'un effet organe.

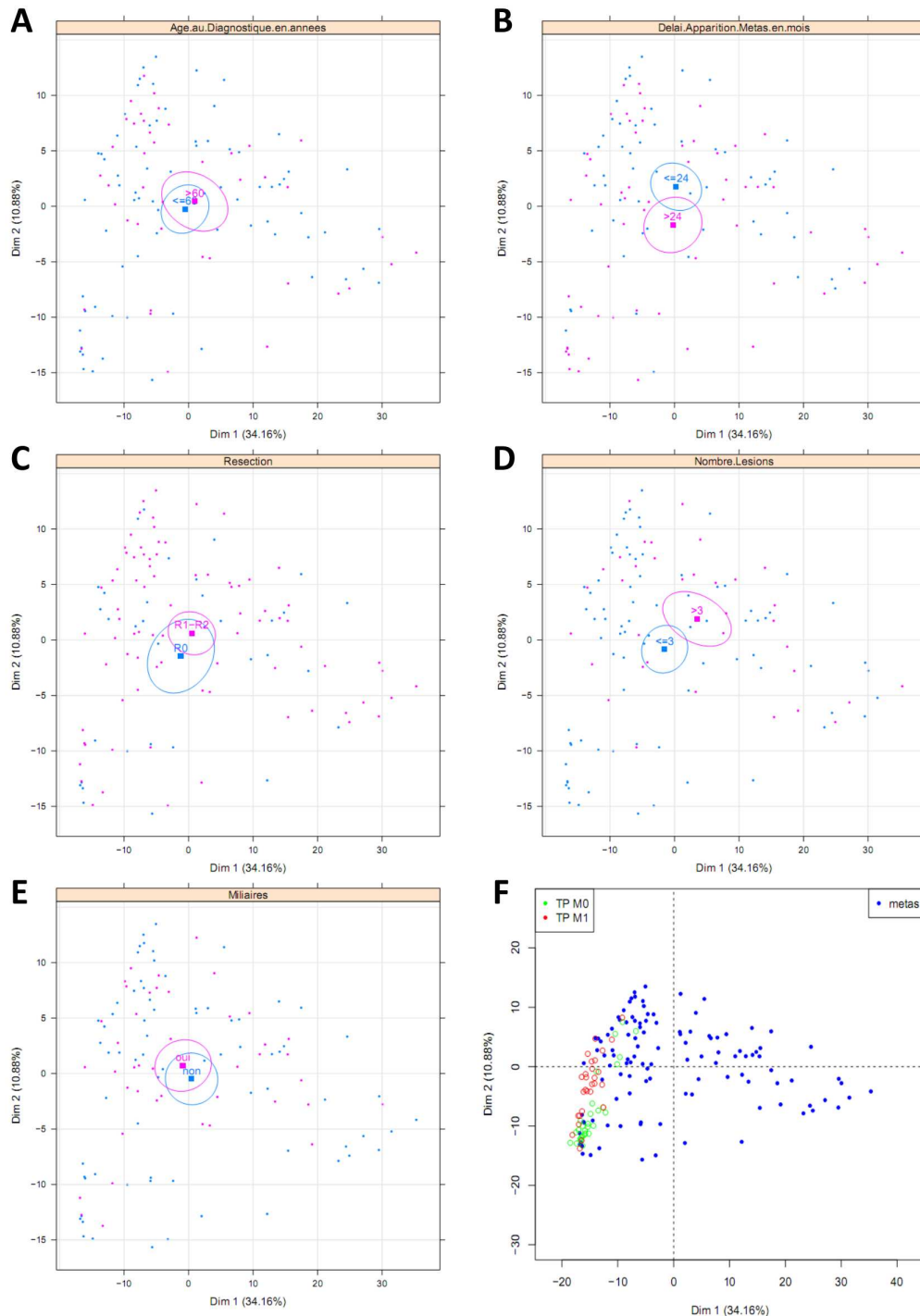


FIG. 6.1: Analyse en Composante Principale sur les 115 métastases (M). Les ACP ont été réalisées sur les 500 gènes les plus variants parmi les 18123 gènes (sélection par Inter Quartile Range). Les 115 M sont étiquetées selon : **A-** leur âge au diagnostic, bleu : ≤ 60 ans ; rose : > 60 ans ; **B-** le délai d'apparition des métastases après le diagnostic de la tumeur primaire, bleu : ≤ 24 mois ; rose : > 24 mois ; **C-** le type de résection, bleu : R0 ; rose : R1 ou R2 ; **D-** le nombre de lésions, bleu : ≤ 3 ; rose : > 3 ; **E-** la présence de miliaires, bleu : non ; rose : oui. **F-** Sur l'ACP des 115 M, les 57 tumeurs primaires sont positionnées dans l'espace des 500 gènes mais ne participent pas à la construction des axes, bleu : métastases hépatiques ; vert : tumeurs primaires non métastatiques à 36 mois ; rouge : tumeurs primaires métastatiques à 36 mois.

Une autre approche dans la caractérisation des tumeurs primaires et des métastases consiste à comparer ces métastases aux données déjà existantes dans les tumeurs primaires. Plus précisément, étant donné que les tumeurs primaires se séparent en deux groupes d'agressivité différentes, peut-on retrouver cette séparation dans les métastases hépatiques ?

Nous avons pour cela représenté par ACP les tumeurs primaires dans l'espace des 118 gènes différentiellement exprimés entre les tumeurs primaires meta0 et meta1 (voir 5.2.2) et nous avons ensuite placé les métastases hépatiques dans cet espace (fig. 6.2).

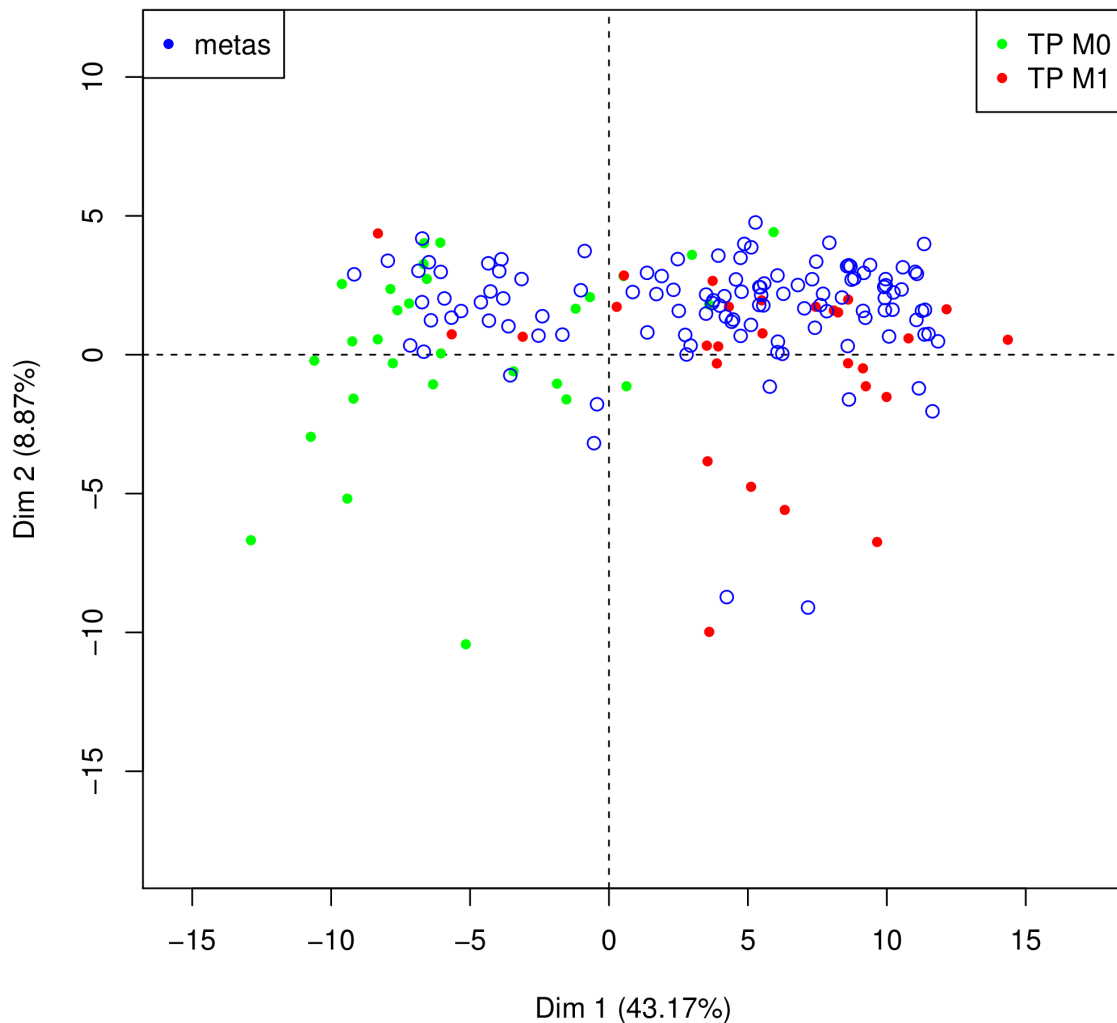


FIG. 6.2: Analyse en Composante Principale des tumeurs primaires sur les 118 gènes différentiels entre les tumeurs primaires meta0 (vert) et meta1 (rouge). Les métastases (bleu) ne participent pas à la construction des axes mais sont positionnées dans l'espace de ces gènes.

Il a été décrit que les tumeurs primaires de faible et de forte agressivité correspondaient en fait à deux classes de tumeurs différentes, l'une présentant plutôt des caractéristiques non différenciées (type crête neurale) et l'autre à des cellules plus différenciées de type épithéliale [Onken et al., 2006]. Cette dispersion des métastases nous laisse penser que comme pour les tumeurs primaires, les métastases pourraient elles aussi se

diviser en deux classes. En effet, les gènes utilisés dans la représentation des données sont censés être des gènes liés à l'apparition de métastases dans les tumeurs primaires et on aurait pu s'attendre à un regroupement des métastases autour des tumeurs primaires meta1.

Nous avons donc choisi de séparer selon cette représentation les 115 métastases en deux groupes (un associé aux tumeurs primaires meta0 et l'autre aux tumeurs primaires meta1) et ensuite d'effectuer les différentes comparaisons possibles. Les métastases associées aux TP meta0 sont comparées à ces tumeurs primaires et les métastases associées aux TP meta1 sont comparées à ces dernières (l'intersection de ces deux résultats étant principalement composée de gènes hépatiques). Nous espérons ainsi en comparant des groupes de tumeurs plus homogènes mettre en évidence des gènes associés au développement métastatique.

L'interprétation des résultats de ces analyses est encore en cours, mais il semblerait que cette méthode d'analyse permette de mettre en évidence des informations biologiquement intéressantes permettant ainsi l'étude de ces métastases.

6.3.2 Analyse de survie

Sur l'ensemble du jeu de données, le type de résection et le délai d'apparition des métastases sont significativement associés à la survie globale des patients avec un Hazard-Ratio (HR) de 2.47 [1.61 – 3.77] pour les résections R1-R2 (contre R0) et 0.45 [0.30 -0.66] pour une apparition de métastases après 24 mois respectivement. La proportion de patients avec une résection R1-R2 et développant des métastases après 24 mois sont égales dans le jeu de données original (n=115), de test (n=76) et de validation (n=39).

A partir des 54613 probesets présents sur les puces, 35582 sont conservés après filtrage des données à 3.5 et la moitié de ces probesets (17791) présentant le plus grand IQR, sont utilisés dans les analyses suivantes.

Dans le jeu d'apprentissage, 196 probesets ont été trouvés significativement associés à la survie globale, parmi lesquels 114 ont été validés dans le jeu de test. Parmi ces 114 probesets, les 50 plus significatifs ont été inclus dans des modèles de Cox de 1 à 5 paramètres. Pour obtenir un C-index supérieur à 0.70, les modèles de Cox à 2 variables sont les plus efficaces. Parmi les différents modèles à deux variables testés, les gènes HJURP et AKIRIN2 sont ceux qui présentent les meilleures performances. Ces deux gènes, tête de liste dans les analyses, ont des comportements indépendants et antagonistes.

AKIRIN2, localisé sur le chromosome 6q15, a un rôle plutôt protecteur avec un HR de 0.46 [0.36-0.59] (l'augmentation d'une unité de AKIRIN2 diminue de moitié le risque de décès). AKIRIN2 pourrait se lier à une protéine appartenant à la famille des protéines 14-3-3 qui participent à la transduction de nombreux signaux cellulaires en se liant à des protéines contenant des phosphosérine. Ce complexe pourrait jouer le rôle de contrôle négatif sur DUSP1 lui-même régulateur négatif de la prolifération cellulaire [Komiya et al., 2008].

HJURP, localisé en 2q37.1, a un rôle plutôt agressif avec un HR 2.22 [1.66-2.97] (l'augmentation d'une unité de HJURP multiplie par 2 le risque de décès). HJURP agit comme une protéine chaperone de CENPA, protéine nécessaire pour le recrutement et l'assemblage de protéines du kinétochore qui permettent le placement des chromosomes sur la plaque équatoriale pendant la mitose.

D'un point de vue biologique, cette analyse a mis en évidence deux gènes qu'il pourrait être intéressant d'analyser biologiquement dans nos modèles cellulaires afin d'éclaircir leurs rôles dans la prolifération cellulaire et montrer s'ils pourraient avoir un rôle dans le mélanome choroïdien métastatique. Des premières expériences avec des sh-RNA contre AKIRIN2 dans nos modèles OCM-1 sont en cours au laboratoire. D'un point de vue bio-informatique, ces analyses doivent être confirmées en parallèle, notamment en modifiant le filtrage (probesets présentant une annotation biologique validée) et en utilisant les données issues de la normalisation avec les CDF EntrezGene.

6.3.3 Analyse des couples

Parmi l'ensemble des données de transcriptome, 9 couples pour lesquels et la tumeur primaire et la métastase hépatique pour le même patient sont disponibles. Ce sous-groupe de données a été analysé, toujours dans le but de comparer les profils d'expression des tumeurs primaires et des métastases.

Les données, après filtrage au seuil de 3.5, sont visualisées par clustering hiérarchique sur les 11037 gènes conservés. Sur l'ensemble de ces gènes, il n'y a pas d'effet organe prédominant (pas de classe tumeur primaire versus métastases observée) ni d'effet patient prédominant (2 couples sur 9 se retrouvent groupés) (fig. 6.3).

L'analyse de comparaison des profils a été effectuée en utilisant la méthode *LIMMA* sur les données appariées par patients. Cette analyse ne révèle aucun gène différentiellement exprimés entre les tumeurs primaires et les métastases associées (7 gènes ressortent différentiels à un FDR 5%).

En parallèle la même analyse a été effectuée sur les données normalisées avec les CDF d'Affymetrix (36616 probesets après filtrage à 3.5 sur les 54613 présents). Dans ce cas là, 759 probesets sont ressortis différentiels de la comparaison. Cette liste de probesets présente une sur-représentation de gènes impliqués dans l'adhésion focale et l'interaction matrice extracellulaire-cellule (p -value <0.01) ou encore impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine ou la voie de signalisation des MAPkinases (p -value <0.05).

Parmi les gènes, nous pouvons par exemple citer les gènes codant pour le collagène, la laminine, la tenascine ou la thrombospondine, plus exprimés dans les métastases que dans les tumeurs primaires et qui sont impliqués dans la migration cellulaire.

En comparant les résultats obtenus avec les deux CDF utilisés, deux gènes ASPN et C7 ressortent différentiels et plus exprimés dans les métastases. C7 est une glycoprotéine du système du complément. Ce système joue un rôle dans les défenses spécifiques et non spécifiques en augmentant la lyse des cellules étrangères, en facilitant la phagocytose ou encore en augmentation la réaction inflammatoire. ASPN code pour une protéine extracellulaire qui appartient à la famille des petites protéoglycanes leucine-riche. Il s'agit d'un inhibiteur de la voie TGF β / SMAD.

Cette analyse sur ce sous-groupe de données doit être poursuivie et approfondie. Il est difficile de conclure sur ce genre de résultats. En effet, plusieurs études ont montré que les annotations des données par Affymetrix n'étaient pas toujours exactes. La qualité des sondes est remise en question et c'est pour cela que différents groupes ont travaillé à leur réannotation [Dai et al., 2005; Liu et al., 2007]. Cependant la réannotation par identifiants EntrezGene, bien que plus fiable car la spécificité des sondes gardées pour

estimer le signal par gène est vérifiée, peut également écraser le signal (puisqu'on n'a plus qu'une estimation du niveau d'ARN par gène). Cette si grande différence de résultat dans cette comparaison nous oblige donc à prendre avec précaution la liste de gènes ressortis. Les gènes ressortis impliqués dans la migration cellulaire peuvent cependant faire du sens biologiquement, puisque cette voie de signalisation est indispensable au processus métastatique.

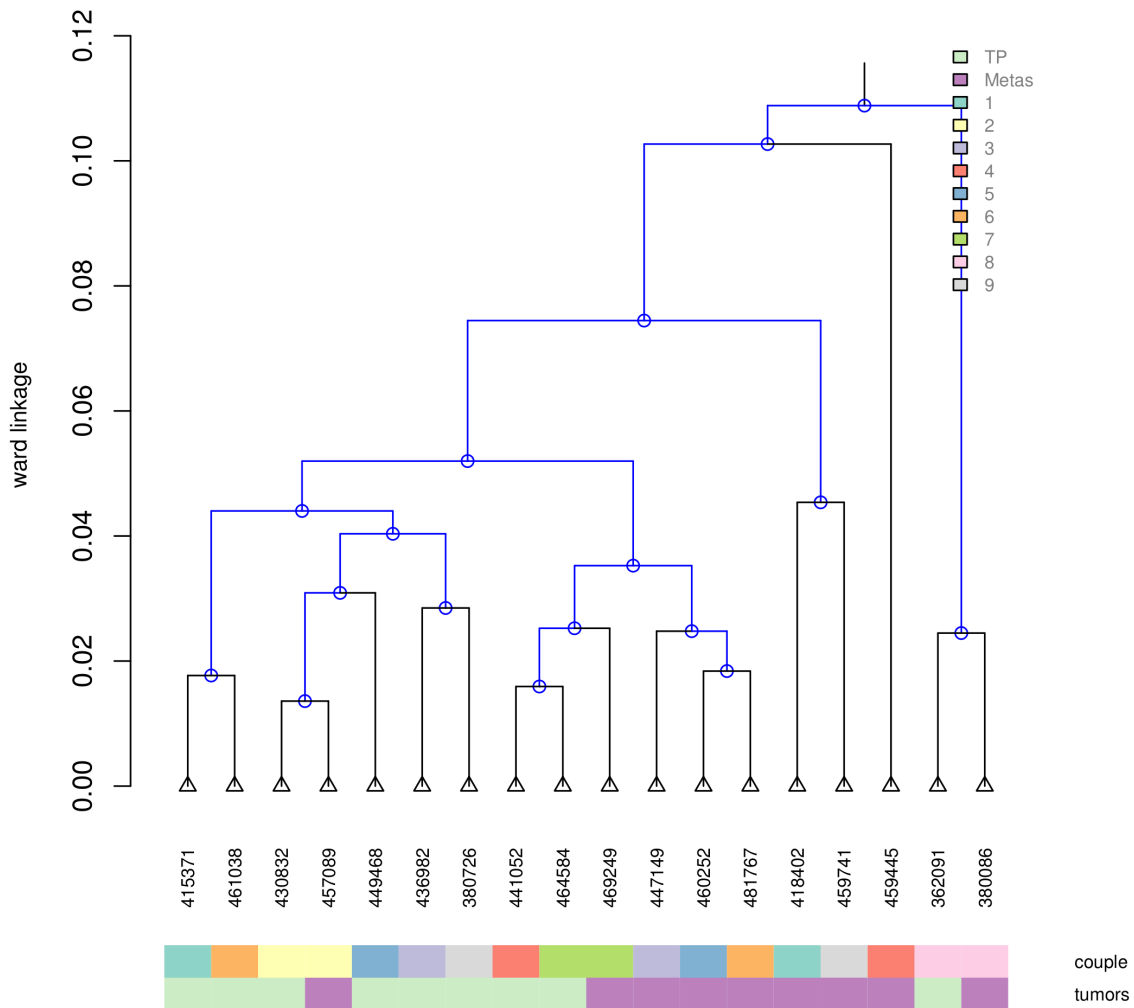


FIG. 6.3: Clustering Hiérarchique sur les couples. Métrique : corrélation de Pearson. Critère de lien : Ward.

Sur la première ligne les deux échantillons de chaque couple sont représentés de la même couleur. Sur le deuxième ligne, les tumeurs primaires sont en cyan et les métastases en violet.

6.4 Conclusion

Cette importante cohorte de profils d'expression de métastases hépatiques est rare. Il n'existe pas à ce jour de jeu de données semblable dans la littérature. L'étude de ces profils a pour but de comparer les profils d'expression des tumeurs primaires et des

métastases dans un premier temps et d'analyser les profils d'expression des métastases en tant que tel dans un second temps.

L'analyse des puces CGH associées a montré une bonne conservation des altérations observées dans les tumeurs primaires [Trolet et al., 2009]. Malheureusement, la comparaison des profils d'expression est plus difficile à mettre en œuvre. Beaucoup de gènes varient entre les tumeurs primaires et les métastases quand on compare l'ensemble de nos deux jeux de données et inversement peu de gènes présentent des variations d'expression dans l'analyse des couples et ce peu de gènes n'est pas stable en fonction des méthodes utilisées. Parmi l'ensemble des gènes dont le niveau d'expression change, il est difficile de différencier les gènes provenant d'une contamination organe des gènes d'intérêts. Par ailleurs, les méthodes de correction n'ont pas donné de résultats satisfaisants.

Nous avons donc choisi de comparer l'ensemble des données en se basant sur les gènes différentiels entre les deux groupes de tumeurs primaires. Cette comparaison semble indiquer qu'il y aurait deux groupes de métastases, un premier plus proche des tumeurs primaires agressives et un second plus proches des tumeurs de plus faible agressivité. Ce résultat serait donc en adéquation avec l'analyse des profils CGH qui démontre également la présence de deux groupes présentant les mêmes altérations que les tumeurs primaires. Les résultats préliminaires de ces comparaisons s'avèrent intéressants mais doivent être finalisés.

En parallèle, les analyses de survie des profils d'expression ont permis de mettre en évidence deux gènes d'intérêt HJURP et AKIRIN2. Leur rôle potentiel dans nos données n'est pas encore bien compris mais des travaux sur AKIRIN2 sont en cours au laboratoire.

Chapitre 7

Analyse des modèles de xénogreffes de l'Institut Curie

7.1 Introduction

Le travail sur le mélanome de la choroïde fait partie des axes de recherche de l'Institut Curie. Différents acteurs entrent en jeu tels que des ophtalmologistes, des oncologues, des cytogénéticiens ou encore des chercheurs. La moitié des patients atteints de la maladie en France sont suivis et traités à l'Institut Curie ce qui en fait un centre de référence pour cette pathologie.

Malgré différents essais cliniques, pour le moment, il n'existe pas de thérapie efficace contre ce mélanome particulier.

Afin d'optimiser l'évaluation de traitements anticancéreux, le laboratoire d'investigation préclinique (LIP) de l'Institut Curie développe des modèles animaux (murins) pour différents cancers. En effet les essais cliniques sont coûteux et long, et avec la constante évolution des traitements proposés par les industries pharmaceutiques, une étape préclinique préalable permet d'évaluer l'efficacité anti-tumorale de différents composés.

Ce laboratoire a établie une collection importante de modèles de xénogreffes à partir de tumeurs oculaires ou métastases hépatiques humaines en les transplantant en sous-cutané dans des souris immunodéficientes. Afin d'évaluer la pertinence de ces modèles, un travail de caractérisation a été réalisé dans le but de comparer la concordance entre d'une part les modèles murins et les tumeurs humaines d'origine et d'autre part la stabilité des tumeurs une fois implantées dans les souris. La caractérisation est très fine et se fait au niveau histologique, moléculaire, ainsi qu'au niveau des profils géniques, transcriptomiques et protéomiques.

7.2 Résultats

7.2.1 Établissement des modèles murins

PUBLICATION

« **Establishment and Characterization of a Panel of Human Uveal Melanoma Xenografts Derived from Primary and/or Metastatic Tumors** »

Némati F, Sastre-Garau X, **Laurent C**, Couturier J, Mariani P, Desjardins L, Piperno-Neumann S, Lantz O, Asselain B, Plancher C, Robert D, Péguillet I, Donnadiou MH, Dahmani A, Bessard MA, Gentien D, Reyes R, Saule S, Barillot E, Roman-Roman S, Decaudin D (2010) *Clinical Cancer Research*. 16(8) :2352-2362

RESUME EN FRANÇAIS

Le mélanome de la choroïde est la tumeur oculaire la plus fréquente chez l'adulte et elle présente un faible taux de survie, en effet 50% des patients décèdent de leur métastases. Le but de cette étude était de développer et caractériser un jeu de xénogreffes de mélanomes uvéaux humains transplantés chez des souris.

Quatre-vingt dix tumeurs ont été greffées dans des souris sévèrement immunodéficientes et vingt-cinq xénogreffes transplantables ont été établies (28%). Les relations entre les greffons tumoraux et les caractéristiques cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients ont été analysées. La caractérisation de 16 xénogreffes inclut des analyses histologiques, des analyses moléculaires par immuno-histochimie, des analyses d'altération génomiques et l'expression d'antigènes tumoraux spécifiques par RT-PCR. Une caractérisation pharmacologique a également été effectuée sur quatre modèles en utilisant deux molécules, le temozolomide et la fotemustine, qui sont couramment utilisées dans le mélanome uvéal

Le pourcentage de mélanomes uvéaux humains qui ont poussé dans la souris est de 28% (25 sur 90). Cette prise des tumeurs est indépendante de la taille, des paramètres histologiques, de la monosomie du chromosome 3 mais est significativement supérieur chez les tumeurs métastatiques. De façon intéressante, la croissance tumorale in vivo est pronostique d'une survie sans métastases plus faible chez patients atteints de tumeurs primaires. Une très bonne concordance entre les tumeurs des patients et les xénogreffes correspondantes a été mis en évidence pour l'ensemble des paramètres testés (histologie, profil génomique, expression d'antigènes tumoraux). Pour finir, les quatre xénogreffes étudiées présentent des profils différents en réponse aux agents thérapeutiques.

Sur la base de ces résultats, cet ensemble de 16 xénogreffes de mélanome uvéal représente un outil préclinique utile pour des évaluations à la fois pharmacologiques et biologiques.

Establishment and Characterization of a Panel of Human Uveal Melanoma Xenografts Derived from Primary and/or Metastatic Tumors

Fariba Némati¹, Xavier Sastre-Garau², Cécile Laurent^{3,4,14}, Jérôme Couturier⁶, Pascale Mariani⁷, Laurence Desjardins⁸, Sophie Piperno-Neumann⁹, Olivier Lantz², Bernard Asselain^{3,4,10,14}, Corine Plancher¹⁰, Delphine Robert², Isabelle Péguillet², Marie-Hélène Donnadiou², Ahmed Dahmani¹, Marie-Andrée Bessard¹, David Gentien¹¹, Cécile Reyes¹², Simon Saule⁵, Emmanuel Barillot^{3,4,14}, Sergio Roman-Roman¹², and Didier Decaudin^{1,13}

Abstract

Purpose: Uveal melanoma is the most common primary intraocular malignant tumor in adults and is defined by a poor natural outcome, as 50% of patients die from metastases. The aim of this study was to develop and characterize a panel of human uveal melanoma xenografts transplanted into immunodeficient mice.

Experimental Design: Ninety tumor specimens were grafted into severe combined immunodeficient mice, and 25 transplantable xenografts were then established (28%). Relationship between tumor graft and clinical, biological, and therapeutic features of the patients included were investigated. Characterization of 16 xenografts included histology, molecular analyses by immunohistochemistry, genetic alteration analysis (single-nucleotide polymorphism), and specific tumor antigen expression by quantitative reverse transcription-PCR. Pharmacologic characterization (chemosensitivity) was also done in four models using two drugs, temozolomide and fotemustine, currently used in the clinical management of uveal melanoma.

Results: Take rate of human uveal melanoma was 28% (25 of 90). Tumor take was independent of size, histologic parameters, or chromosome 3 monosomy but was significantly higher in metastatic tumors. Interestingly, *in vivo* tumor growth was prognostic for a lower metastasis-free survival in patients with primary tumors. A high concordance between the patients' tumors and their corresponding xenografts was found for all parameters tested (histology, genetic profile, and tumor antigen expression). Finally, the four xenografts studied displayed different response profiles to chemotherapeutic agents.

Conclusions: Based on these results, this panel of 16 uveal melanoma xenografts represents a useful preclinical tool for both pharmacologic and biological assessments. *Clin Cancer Res*; 16(8); 2352-62. ©2010 AACR.

Uveal melanoma is the most common primary intraocular malignant tumor in adults. Despite the increased diagnostic accuracy and the development of conservative and effective treatments on primary tumor sites, such as

plaque radiotherapy and photon beam therapy, the mortality remains stable and 50% of patients die from metastases that frequently involve the liver. Chemotherapy, such as oral temozolomide and intra-arterial fotemustine used at the metastatic stage, induces very low response rates, 14.3% and 36%, respectively, and a median survival time of 6.7 and 15 months (1-3). No postoperative adjuvant therapies are currently available to decrease the risk of metastases. Several prognostic factors of disseminated relapse after initial ophthalmologic treatment have been determined, including location with respect to the equator, monosomy 3, and retinal detachment (4). However, no effect of these prognostic markers on patient care can be envisaged in the absence of effective systemic therapies.

The growing body of knowledge about molecular and genetics events involved in oncogenesis and tumor progression has led to the identification of new therapeutic targets and therapeutic agents. Preclinical investigation in relevant models is therefore mandatory to select therapeutic agents before their assessment in clinical trials. To obtain preclinical results with high predictive value for

Authors' Affiliations: ¹Laboratory of Preclinical Investigation, Translational Research Department, Institut Curie; ²Department of Tumor Biology, Institut Curie; ³Institut Curie; ⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U900; ⁵Centre National de la Recherche Scientifique UMR146, Institut Curie; ⁶Department of Genetics, Institut Curie; ⁷Department of Visceral Surgery, Institut Curie; ⁸Department of Ophthalmological Oncology, Institut Curie; ⁹Department of Medical Oncology, Institut Curie; ¹⁰Department of Statistics, Institut Curie; ¹¹Affymetrix Platform, Translational Research Department, Institut Curie; ¹²Translational Research Department, Institut Curie; ¹³Department of Clinical Hematology, Institut Curie, Paris, France and ¹⁴Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau, France

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Didier Decaudin, Laboratoire d'Investigation Pré-clinique/Service d'Hématologie Clinique, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75.248 Paris cedex 05, France. Phone: 33-1-44-32-46-90; Fax: 33-1-53-10-40-11; E-mail: didier.decaudin@curie.net.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3066

©2010 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

The prognosis of uveal melanoma patients remains generally poor, with a risk of metastatic relapse and relative inefficacy of conventional chemotherapies. New therapies, differing from classic treatments, are therefore warranted to improve the outcome of these patients. The treatment of cancer is continually improving due to growing knowledge of oncogenesis and the development of new targeted compounds. Early clinical trials evaluating such candidates require a large number of patients, are expensive, are time consuming, and expose patients to certain risks. *In vivo* preclinical assessment of antitumor agents in relevant animal models is a crucial step in the drug development process. We have therefore developed and characterized a panel of uveal melanoma xenografts obtained from human primary tumors to allow preclinical pharmacologic assessment and to explore the biology of this human cancer.

clinical trials, the choice of the tumor models on which new compounds and novel drug combinations are evaluated is critical. Human tumor fragments obtained from patients and directly transplanted into immunodeficient mice, known as primary xenografts or tumor grafts (5), are one category of recognized models used as tools for preclinical assays. Xenografts are known to reproduce the marked heterogeneity of human tumors and generally very closely resemble the patient's tumor in terms of histopathologic and molecular features, as well as response to therapy (6, 7). Furthermore, procedures for assessment of therapeutic efficacy are now well standardized and facilitate evaluation of combined therapies, particularly in terms of biostatistical analysis.

This study was designed to establish a panel of primary human uveal melanoma xenografts obtained from patient tumor samples transplanted into severe combined immunodeficient (SCID) mice. The resulting xenografts were then characterized and compared with the patient's original tumors, particularly in terms of molecular prognostic markers previously identified in human uveal melanomas and response to standard chemotherapies. Our data indicate that these models constitute a useful and relevant tool for preclinical assessment of new therapeutic approaches.

Materials and Methods

Patients and tumor samples. Ninety tumor specimens were obtained after enucleation of uveal melanoma, 73 from primary tumors (enucleation), and 17 from metastases. All patients had previously given their informed consent for experimental research on residual tumor tissue available after histopathologic and cytogenetic analyses.

Some specimens were fixed in acetic acid, buffered formalin, alcohol solution (AFA) for further morphologic and immunohistochemical analysis, and others were stored in liquid nitrogen for further genomic analyses.

Data collection and statistical analysis. To define prognostic factors of *in vivo* tumor engraftment, the following patient characteristics were collected for the 90 cases included: gender, age, intraocular tumor location, thickness and diameter, retinal detachment, ciliary body and extrascleral tumor infiltration, primary treatment, histology, mitotic index, monosomy 3 (for available cases), primary tumor or metastatic sample, interval between diagnosis of primary tumor and first metastasis, and overall survival. A χ^2 test was used for univariate analysis. Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method (8). Statistical tests were two-sided and done using a 5% level of significance using the log-rank test. Metastasis-free survival was defined as the duration from initial diagnosis to first metastasis, and overall survival was measured from the date of initial diagnosis to the date of death irrespective of the cause.

Establishment of uveal melanoma xenografts. Fresh tumor samples obtained from pathologists were immediately transplanted into the interscapular fat pad of two to four non-preirradiated immunodeficient female SCID mice, 5 to 7 wk old, without any extracellular matrix preparation under total xylazine/ketamine anesthesia. Mice were maintained in a specific pathogen-free animal housing (Institut Curie) and regularly observed for tumor growth. Mice without growing tumors 1 y after initial transplantation were sacrificed. Animal care and housing were in accordance with the institutional guidelines of the French Ethics Committee (Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche, Direction de la Santé et de la Protection Animale, Paris, France) and under the supervision of authorized investigators.

At a volume of $\sim 1 \text{ cm}^3$, tumors were removed and subsequently transplanted to naive SCID mice. Samples were concomitantly stored frozen in DMSO-FCS solution or directly in liquid nitrogen and fixed in AFA for further studies. After three consecutive mouse-to-mouse passages, the xenograft was considered to be stabilized and was submitted to the process of standard characterization, including histopathologic, molecular, and genetic features, all of which were compared with the patient's tumor, and *in vivo* therapeutic assessments.

Histopathologic analyses. Morphologic examination was done on each xenograft and compared with the histologic findings of the corresponding patient's tumor. For light microscopy examination, 4- μm -thick AFA-fixed paraffin-embedded sections were stained with H&E safran. c-kit, Bcl-2, and β -catenin expressions were determined by immunohistochemistry. Antigen retrieval was done by incubating tissue sections for 20 min in 10 mmol/L citrate buffer (pH 6.1) in an 850 W microwave oven. Tissue sections were then incubated for 30 min with anti-c-kit (polyclonal rabbit, CD117; DAKO), anti-Bcl-2 (monoclonal mouse, clone 124; DAKO), or anti- β -catenin (monoclonal

mouse, 14/ β -catenin; BD Biosciences) antibodies. Antibodies were diluted to 1:100 except for c-kit, which was diluted to 1:200. Staining was revealed by using the Vectastain Elite ABC peroxidase mouse IgG kit (Vector Laboratories) and diaminobenzidine (DAKO) as chromogen. Staining for the various tumor samples was assessed semiquantitatively. An isotypic control was done by using IgG1 α FITC (1:1250 dilution; DAKO). Semiquantitative assessment was done by estimating at $\times 200$ magnification, the percentage of positive neoplastic cytoplasm or nuclei defined within the area of highest positivity chosen after scanning the entire tumor surface at low power (10 \times objective).

Genomic analyses. To define the chromosome 3 copy number and loss of heterozygosity status and to detect other abnormalities, genetic analyses of the patients' tumors and the corresponding xenografts were done using Affymetrix Genome-Wide SNP Arrays 6.0. DNA was purified as described (9), and loss of heterozygosity of chromosome 3 was detected with single-nucleotide polymorphisms (SNP) as described (10). Data were analyzed using Partek Genomic Suite software, version 6.4, build 6.09.0129 (Partek, Inc.) using Partek's default parameters. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and array comparative genomic hybridization (array-CGH) were done in two samples. FISH was done on intact nuclei after dissociation of the tumor fragment using a labeled centromeric probe specific for chromosome 3 (Vysis, Abbott Molecular) according to the supplier's protocol. For array-CGH, DNA extraction, labeling, and hybridization were done as previously described (11).

Expression of tumor-specific antigens. Expression of tumor-specific antigens was assessed by reverse transcription-PCR on RNA extracted from both frozen patient and tumor graft samples. Total RNA extraction was done by centrifugation on a CsCl cushion to totally eliminate melanin contamination. PCR amplification was carried out on cDNA (60 ng equivalent RNA) in the presence of 0.025 units/ μ L of Platinum Taq (Life Technologies), 200 μ mol/L of deoxynucleotide triphosphate, and 0.4 μ mol/L of each primer (12–14) in a final volume of 30 μ L. After a denaturation cycle of 4 min at 94 $^{\circ}$ C, amplification was run for 21 to 33 cycles (94 $^{\circ}$ C for 1 min, annealing temperature of 1 to 2 min, 72 $^{\circ}$ C for 1 min) according to Table 1 and followed by an extension cycle of 15 min at 72 $^{\circ}$ C. Serial dilutions of 60 ng of equivalent RNA from melanoma cell lines were used for semiquantitative determination: SK23 for Melan-A, tyrosinase, and NA17; MZ2 cell line for MAGE1, MAGE2, MAGE3, MAGE6, and MAGE10; LB23 cell line for MAGE4; and LB373 cell line for LAGE1, LAGE2, and MAGE-C2. Annealing temperatures and amplification cycles were as follows: β -actin, 65 $^{\circ}$ C for 1 min for 21 cycles; NA17, 62 $^{\circ}$ C for 1 min for 33 cycles; tyrosinase, 65 $^{\circ}$ C for 1 min for 25 cycles; Melan-A, 60 $^{\circ}$ C for 1 min for 24 cycles; MAGE1, 72 $^{\circ}$ C for 1 min for 31 cycles; MAGE2, 67 $^{\circ}$ C for 1 min for 31 cycles; MAGE3, 72 $^{\circ}$ C for 1 min for 31 cycles; MAGE4, 68 $^{\circ}$ C for 1 min for 31 cycles; MAGE6, 70 $^{\circ}$ C for 2 min for 31 cycles; MAGE10, 65 $^{\circ}$ C for 1 min for 31 cycles; LAGE1, 62 $^{\circ}$ C for 1 min for

Table 1. Clinical characteristics of all uveal melanoma patients ($n = 90$; univariate analysis) and *in vivo* tumor take rate (%)

Patients and tumor characteristics	Patients (n)	Tumor take rate (%)	P
Gender			
Male	47	23.4	NS
Female	43	32.6	
Age at diagnosis (y)			
<60	48	50.7	NS
≥ 60	42	49.2	
History of previous cancer			
No	86	25.6	NS (0.06)
Yes	4	75.0	
Primary tumor location			
Anterior to equator	3	0	NS
On equator	75	30.7	
Posterior to equator	11	18.2	
Origin of tumor sample			
Primary tumor	73	21.9	0.02
Metastatic tumor	17	52.9	
Primary tumor diameter (NA = 4)			
≤ 15 mm	18	16.7	NS
15-18 mm	27	37.0	
>18 mm	41	26.8	
Primary tumor thickness			
≤ 7 mm	17	29.4	NS
7-10 mm	14	42.8	
>10 mm	59	23.7	
Retinal detachment (NA = 2)			
No	31	38.7	NS (0.07)
Yes	57	1.0	
Extrasclearal invasion (NA = 5)			
No	78	26.9	NS
Yes	7	28.6	
Primary tumor treatment			
No enucleation	17	35.3	NS
Enucleation	73	26.1	
Histology ($n = 73$)			
Epithelioid	29	31.0	NS
Spindle	19	36.8	
Mixed	23	13.0	
Ciliary body involvement (NA = 1)			
No	53	22.6	NS
Yes	19	36.8	
Extrasclearal involvement (NA = 1)			
No	66	27.3	NS
Yes	6	16.7	
Mitotic index (NA = 9)			
Nil-low	72	24.2	NS
Medium-high	7	42.8	
Monosomy 3 of primary tumors (NA = 10)			
No	30	20.0	NS
Yes	33	33.3	
Initial treatment			
Proton therapy	73	35.3	NS
Enucleation	17	26.1	

Abbreviations: NA, not available; NS, not significant.

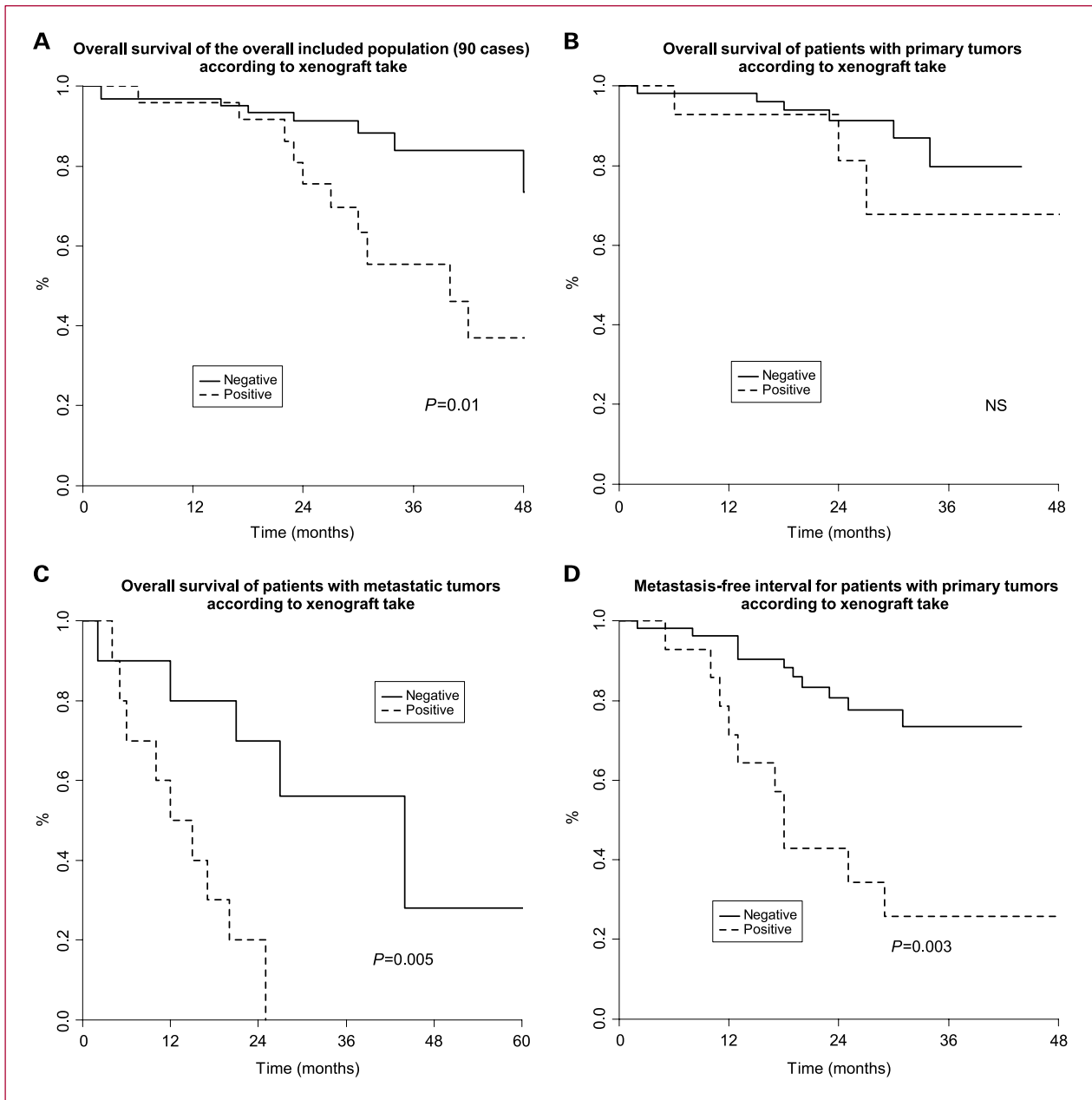


Fig. 1. Prognostic effect of *in vivo* tumor growth on survival of uveal melanoma patients. A, overall survival of the overall study population (90 cases) according to xenograft take. B, overall survival of patients with primary tumors according to xenograft take. C, overall survival of patients with metastatic tumors according to xenograft take. D, metastasis-free survival for patients with primary tumors according to xenograft take.

30 cycles; LAGE2, 62 °C for 1 min for 30 cycles; and MAGE-C2, 60 °C for 1 min for 30 cycles.

***In vivo* tumor growth and antitumor efficacy of standard chemotherapeutic drugs.** For each new tumor graft model, *in vivo* spontaneous tumor growth was determined by the growth delay after transplantation, the time to reach a tumor volume of 40 to 200 mm³, and the doubling time. For experimental therapeutic assays, female mice were xenografted with a tumor fragment of 15 mm³. Mice bearing

growing tumors with a volume of 40 to 200 mm³ were individually identified and randomly assigned to the control or treatment groups (6-10 animals per group, as detailed in the tables and legends of the figures), and treatment was started on day 1. Animals with tumor volumes outside this range were excluded. Mice were weighed twice a week. Xenografted mice were sacrificed when their tumor reached a volume of 2,500 mm³. Tumor volumes were calculated by measuring two perpendicular

diameters with calipers. Each tumor volume (V) was calculated according to the following formula: $V = a \times b^2 / 2$, where a and b are the largest and smallest perpendicular tumor diameters. Relative tumor volumes (RTV) were calculated from the following formula: $RTV = (V_x/V_1)$, where V_x is the tumor volume on day x and V_1 is the tumor volume at initiation of therapy (day 1). Growth curves were obtained by plotting the mean values of RTV on the Y axis against time (X axis, expressed as days after start of treatment). Antitumor activity was evaluated according to tumor growth inhibition (TGI), calculated according to the following formula: percent GI = $100 - (RTV_t / RTV_c \times 100)$, where RTV_t is the median RTV of treated mice and RTV_c is the median RTV of controls, both at a given time point when the antitumor effect was optimal. Fifty percent TGI was considered to be the limit for a meaningful biological effect. Statistical significance of differences observed between the individual RTVs corresponding to the treated mice and control groups was calculated by the two-tailed Student's t test. Growth delay index was calculated as the time required to reach the same RTV in the treated and control groups, at a RTV of 4.

Two cytotoxic drugs considered to be standard treatment for uveal melanomas were tested, namely, fotemustine (Muphoran, Servier) and temozolomide (Temodal, Schering Plough). Fotemustine was reconstituted in the

appropriate solution according to the supplier, diluted in 5% dextrose, and administered i.p. at a dose of 30 mg/kg every 3 wk. Temozolomide was reconstituted in water and diluted in PBS/5% dextrose/Tween 80 (2/1/1%) and administered orally in a 0.3 mL volume on day 1 every 4 wk. Mice were treated for three cycles.

Results

Establishment of xenografts. A total of 90 uveal melanoma samples obtained from primary tumors or metastases were implanted s.c. into SCID mice as described in Materials and Methods. Of the 90 tumors transplanted in immunodeficient mice, XX gave rise to viable tumors (take rate, 28%). Twenty-five of these tumors were shown to display uveal melanoma characteristics on histopathology. Molecular and genetic characterization was done on 16 models obtained from 10 primary ocular tumors (MP34/38/41/42/46/47/55/71/77/80), 5 liver metastases (MM26/28/52/66/74), and 1 skin metastasis (MM33). *In vivo* therapeutic evaluation was done on four models: MP77, MM66, MM26, and MP38.

Clinical characteristic of the 90 patients and their effect on the growth of the corresponding xenografted tumors are presented in Table 1. Briefly, gender, age, history of previous cancer, and tumor parameters such as tumor site,

Table 2. Histopathologic comparison between patient tumors and corresponding xenografts

Models	Histopathology		Chromosome 3		Bcl-2, % (intensity)*		c-kit, % (intensity)*		β-Catenin, % (intensity)*	
	P	X	P	X	P	X	P	X	P	X
MP34	E	E	—	L3p	70 (1)	0 [†]	0	0	100 (3)	100 (3)
MP38	S	E	Isodisomy	L	80 (2)	80 (2)	60 (2)	50 (1)	100 (3)	100 (3)
MP41	E	E	N	N	90 (3)	90 (2)	0	0	100 (3)	70 (1)
MP42	S	S	N	N	‡	60 (1)	‡	0	‡	70 (2)
MP46	E	M	L (FISH)	Isodisomy	‡	‡	‡	‡	‡	‡
MP47	E	E	L	L (CGH)	80 (2)	90 (2)	10 (1)	10 (1)	100 (3)	90 (3)
MP55	M	E	L	L	100 (3)	100 (2)	15 (1)	0	60 (2)	100 (2)
MP71	E	E	Isodisomy	L	80 (2)	70 (2)	40 (1)	30 (2)	100 (3)	100 (3)
MP77	E	E	L	L	60 (1)	100 (2)	0	0	90 (2)	100 (3)
MP80	M	M	L	L	70 (1)	70 (2)	60 (2)	40 (2)	80 (2)	70 (2)
MM26	M	E	L	L	100 (2)	75 (2)	0	0	100 (2)	100 (3)
MM28	M	E	—	Isodisomy	100 (3)	100 (3)	20 (1)	60 (1)	100 (3)	100 (3)
MM33	E	E	N	N	100 (2)	80 (2)	0	10 (1)	90 (1)	100 (3)
MM52	M	M [§]	L	L	70 (2)	70 (1)	80 (2)	80 (2)	80 (2)	100 (3)
MM66	E	E	N	N	100 (2)	90 (2)	5 (1)	30 (1)	80 (2)	70 (2)
MM74	E	E	L	L	90 (2)	90 (2)	20 (1)	40 (1)	90 (3)	80 (3)

Abbreviations: MP, xenografts obtained from primary tumors; MM, xenografts obtained from metastases; P, patient's tumor; X, xenograft; E, epithelioid; S, spindle; M, mixed; N, normal; L, loss of heterozygosity.

*Data are expressed as % of positive tumor cells.

[†]Eighty percent necrosis in the tumor graft sample.

[‡]Major pigment overload prevented definition of the phenotype.

[§]Majority spindle.

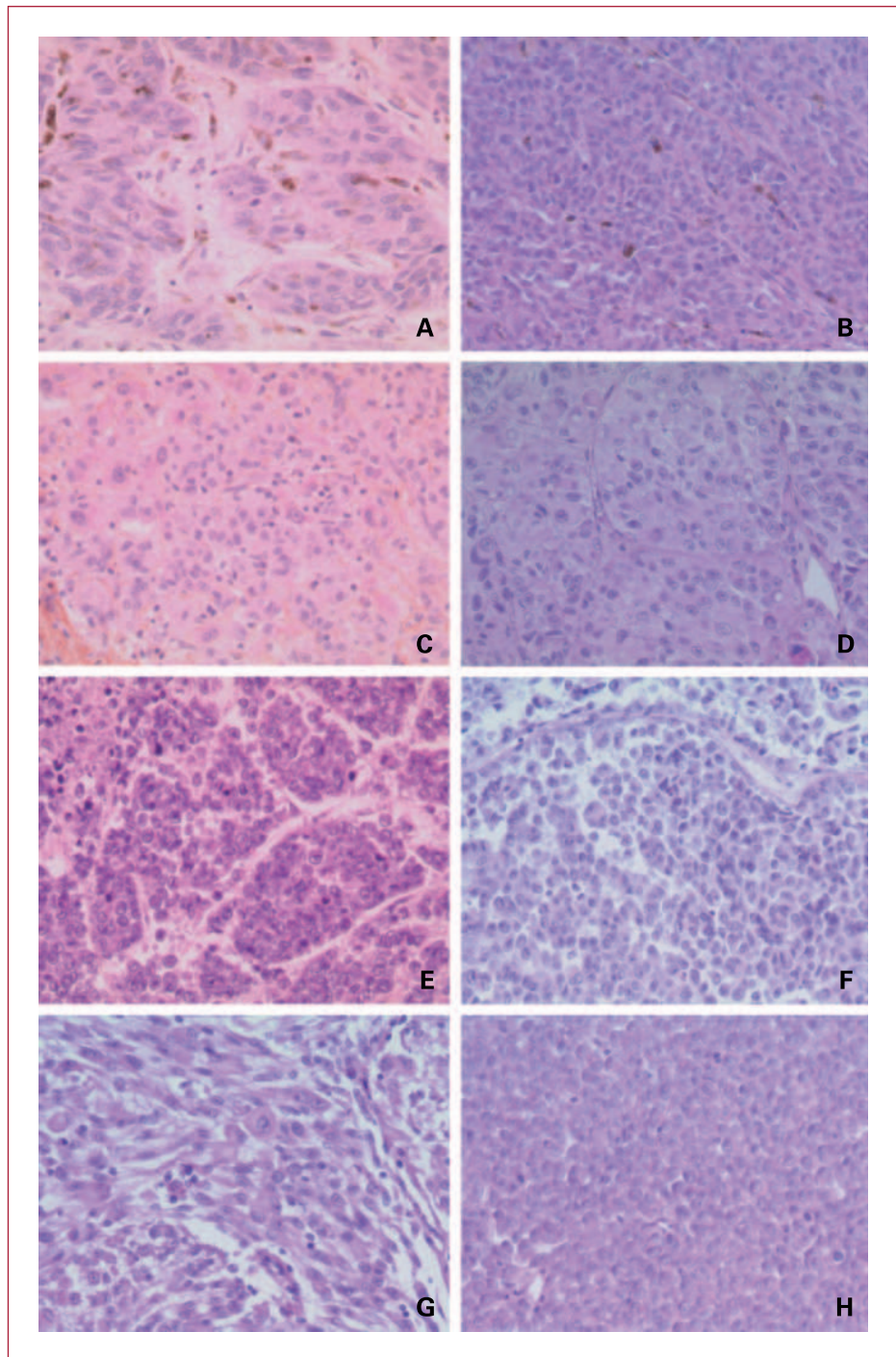


Fig. 2. Histopathologic features of four patient tumors and corresponding xenografts. MM26: patient (A) and xenograft (B); MM28: patient (C) and xenograft (D); MM66: patient (E) and xenograft (F); MP77: patient (G) and xenograft (H). H&E sections, $\times 200$.

diameter and thickness, retinal detachment, and tumor externalization were not predictive of *in vivo* tumor take. Tumor growth was also independent of histologic parameters, such as epithelioid or spindle cell morphology, ciliary body involvement, mitotic index, and the presence of monosomy 3. Inversely, the tumor take rate was significantly increased when the tumor tissues were derived from

metastases versus primary intraocular tumors, with take rates of 52.9% and 21.9%, respectively ($P = 0.02$). The 5-year overall survival of all patients included according to the *in vivo* tumor growth (growth/no growth) was 26% and 77%, respectively ($P = 0.01$; Fig. 1A). Tumor take in mice was predictive of a short overall survival in metastatic patients but not in primary tumor patients (Fig. 1B

and C). Interestingly, a significant correlation was shown between *in vivo* tumor growth and the 5-year metastasis-free survival of patients with a primary tumor (see Fig. 1D).

Histopathologic analyses. As shown in Table 2, the 16 uveal melanoma xenografts analyzed were composed of pure epithelioid cell in 9 cases, mixed with a predominance of epithelioid cells in 5 cases, and spindle cells in 1 case. In all but one case (MP38), histopathologic analyses showed a concordance between xenografts and the corresponding patient's tumor. For xenograft MP38, tumor cells were of the epithelioid type, whereas the patient had a spindle cell tumor. This apparent discrepancy could be explained by the presence of a small epithelioid contingent not observed on the histologic section. In three other cases of patient tumors with mixed cellularity, xenografts (MP55, MM26, and MM28) were defined as epithelioid cells, and in one case of a patient's epithelioid cell tumor, the corresponding xenograft (MP46) showed epithelioid cells, suggesting that these tumor cells may have a higher capacity for *in vivo* engraftment than spindle tumor cells. Four examples of patient tumors and corresponding xenografts are presented in Fig. 2.

To establish comparisons between xenografts and primary tumors, patient tumors, and their corresponding xenografts, the expression of three proteins was determined by immunohistochemistry for all patients and the corresponding xenografts (i.e., Bcl-2, c-kit, and β -catenin). The expression of these proteins was not affected by the localized or metastatic status of the tumors. Bcl-2 expression was similar in all 14 patient tumors and their corresponding xenografts, with a range of positive tumor cells from 60% (MP77) to 100% (MP55 and MM28) and an immunostaining intensity of 1 (14%), 2 (79%), and 3 (7%). A major pigment overload prevented Bcl-2 phenotyping in two cases. c-kit expression was heterogeneous and varied between 0% (four patients and their corresponding xenografts) and 80% (MM52) with a staining intensity of 1 (67%) and 2 (33%). Three xenograft and patient tumor couples presented slight variations in c-kit expression (MP55, MM33, and MM66). All 14 patient tumors and their corresponding xenografts presented a high level of β -catenin expression, between 70% and 100% of tumor cells, and a staining intensity of 1 (7%), 2 (27%), and 3 (66%), with complete concordance between tumor grafts and primary tumors in all cases.

Genomic analyses. To validate the concordance between patient tumors and the corresponding xenografts, genomic analyses focused on chromosome 3 status. As shown in

Table 2, chromosome 3 status was determined by SNP array analyses in all 16 tumor grafts and in 14 corresponding patient tumors due to insufficient material in 2 cases. Moreover, except for patient tumor MP49 and xenograft MP47 analyzed by FISH and array-CGH, respectively, all analyses were done by SNP analysis. Of the 14 cases for which both xenograft and patient tumor were studied, 10 tumors presented loss of heterozygosity of chromosome 3 (either monosomy or isodisomy) and 4 had a normal chromosome 3 status. A good concordance was observed between patient tumors and their corresponding xenografts. The four tumors with disomic and heterozygous chromosome 3 led to xenografts with a similar chromosome 3 status. All chromosome 3 monosomic tumors led to monosomic xenografts. Interestingly, the two chromosome 3 isodisomic tumors led to monosomic xenografts. Minor differences in the genomic profiles of a tumor and its corresponding xenograft were also revealed by SNP arrays: in xenograft MP77 (derived from a chromosome 3 monosomic tumor), a homozygous loss was observed in 3p14.2 over ~250 kb (containing the *FHIT* gene, which shows aberrant transcripts in about one half of all esophageal, stomach, and colon carcinomas) and in 3q13.31 over 360 kb (containing a noncoding RNA). In xenograft MM26, a normal DNA copy number (two copies) was observed in 3p14.1 over 260 kb (containing the microphthalmia-associated transcription factor, which regulates differentiation of melanocytes in retinal pigment epithelium).

Expression of tumor-specific antigens. To compare xenografts and primary tumors, patient tumors and their corresponding xenografts were tested for 12 tumor-specific antigens (i.e., MAGE1, MAGE2, MAGE3, MAGE4, MAGE6, MAGE10, MAGE-C2, LAGE1, LAGE2, NA17, tyrosinase, and Melan-A). As shown in Supplementary Table S1, no MAGE and LAGE antigens were significantly expressed in either the patient tumors or their corresponding xenografts, except in two cases (patient tumor MP41 expressed LAGE2 <4% in comparison with 20-100% for the corresponding xenograft; patient tumor MP55 expressed MAGE1 to MAGE6 and no MAGE10, MAGE-C2, and LAGE1, whereas the corresponding xenograft expressed all MAGE and LAGE antigens except for MAGE-C2). Melan-A was expressed in all patient tumors and corresponding xenografts, with variations in the expression level in four cases (MP34, MP41, MP42, and MP46). NA17 was expressed in all cases. Finally, the level of expression of tyrosinase was similar between patient tumors and their corresponding xenografts, except in

Fig. 3. Effects of fotemustine and temozolomide in the four human uveal melanoma xenografts: MP77 (A and B), MM26 (C and D), MM66 (E and F), and MP38 (G and H). A, C, E, and G, fotemustine (●) was administered i.p. at a dose of 30 mg/kg every 3 wk. Mice in the control groups (○) received 0.2 mL of the drug-formulating vehicle with the same schedule as the treated animals. B, D, F, and H, temozolomide (■) was administered orally at a dose of 40 mg/kg day 1 to day 5 every 28 d. Mice in the control groups (□) received 0.3 mL of the drug-formulating vehicle with the same schedule as the treated animals. Treatments started when subcutaneous growing tumor volumes were 63 to 400 mm³. Tumor growth was calculated by measuring two perpendicular diameters with calipers. Tumor volume and RTV were calculated as described in Materials and Methods. Growth curves were obtained by plotting mean RTV against time. Bars, SD. Fotemustine (*n* = 8-9 mice) and corresponding fotemustine control group (*n* = 8-10 mice); Temodal (*n* = 6-10 mice) and corresponding Temodal control group (*n* = 6-10 mice).

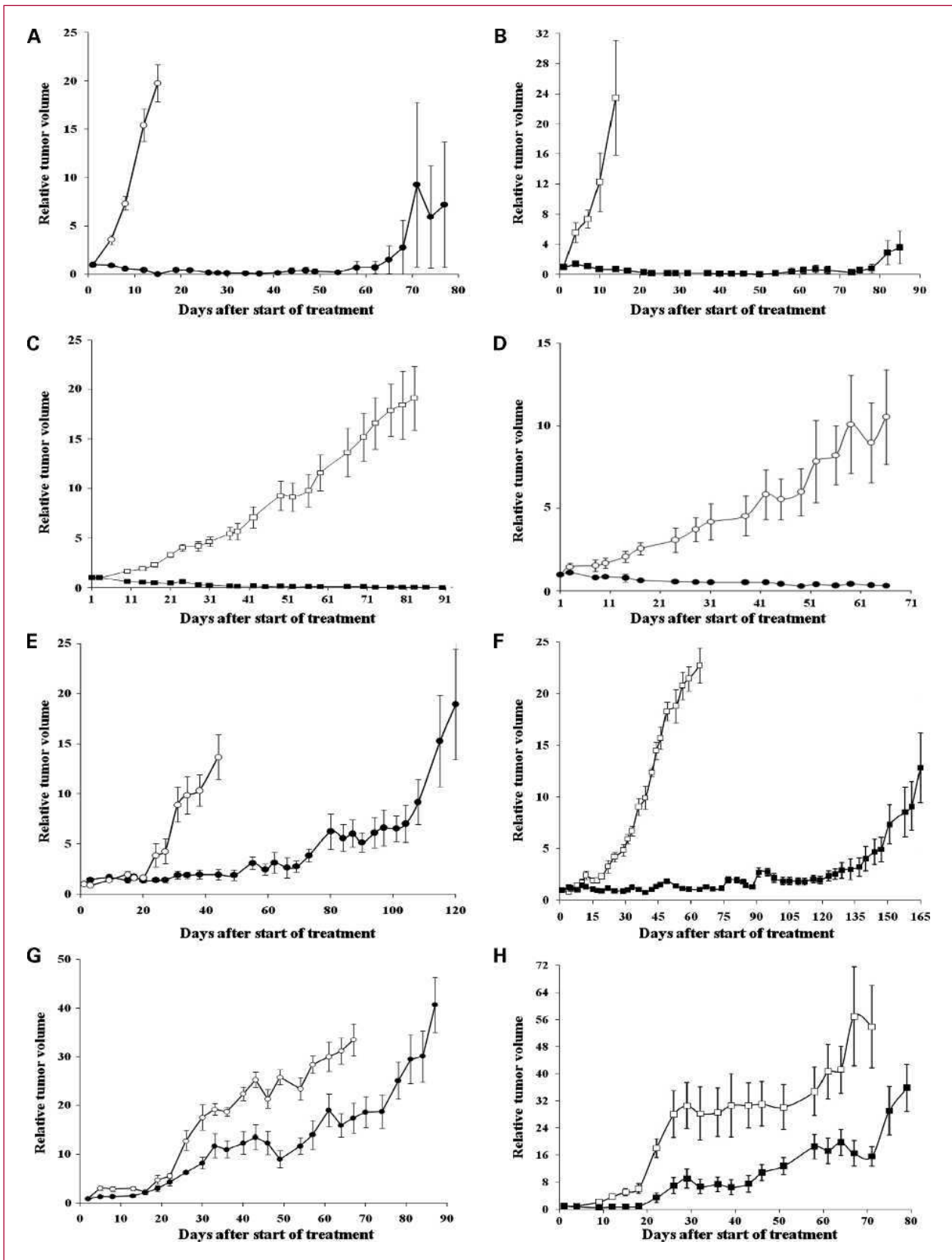


Table 3. *In vivo* efficacy of fotemustine and temozolomide in the four human melanoma xenografts tested

Models	Treatments	GDI (d)	TGI (%)	CR/total mice (%)	Median CR duration (d)
MP77	Fotemustine	13.8	100 (15)	8/9 (89)	58
	Temozolomide	21.3	97 (14)	7/8 (87)	36
MP38	Fotemustine	>3.75	100 (73)	7/9 (66)	(>48-30)
	Temozolomide	>2	97 (66)	0/9 (0)	—
MM26	Fotemustine	2.8	86 (44)	0/8 (0)	—
	Temozolomide	5.1	95 (59)	0/10 (0)	—
MM66	Fotemustine	1.2	65 (49)	0/8 (0)	—
	Temozolomide	1.8	86 (15)	2/6 (33)	5

Abbreviations: GDI, growth delay inhibition defined as the time required to reach the same RTV in the treated group and the control group (usually at a RTV of 4); CR, complete remission.

four cases (MP46, MP77, MM66, and MM74). A very marked difference was observed in one case (i.e., MM66) for which the patient's tumor did not express tyrosinase, whereas the xenograft expressed a level of 100%. However, it should be noted that for this tumor, derived from a liver metastasis, the patient's corresponding primary tumor expressed a high level of tyrosinase antigen (i.e., 100%), as in the metastasis-derived xenograft (data not shown).

In vivo tumor growth and antitumor efficacy of standard chemotherapeutic drugs. The characteristics of spontaneous tumor growth of the 16 characterized xenografts are shown in Supplementary Table S2. The main features were as follows: (a) the growth delay after initial transplantation ranged from 1 to 18 months; (b) after *in vivo* stabilization and serial transplantations, the time from transplantation to a tumor size of 60 to 200 mm³ ranged from 20 days (MP77) to 132 days (MP38); and (c) the doubling time measured between 500 and 1,000 mm³ ranged from 5 days (MP77) to 100 days (MP47).

Finally, to further characterize the established xenograft models, extensive therapeutic experiments with fotemustine and temozolomide, currently used in the treatment of metastatic uveal melanoma, were done. Four xenografts were chosen for pharmacologic characterization (Fig. 3; Table 3): xenograft MP77 obtained from a patient's primary tumor and displaying monosomy 3, xenograft MM26 obtained from a liver metastasis also displayed monosomy 3, xenograft MM66 obtained from a liver metastasis and defined by a disomy 3 status, and xenograft MP38 obtained from primary tumor with monosomy 3. *In vivo* responses to chemotherapy are shown in Fig. 3. For xenograft MP77, fotemustine and temozolomide were both cytotoxic, with optimal TGI of 100% and 97% and a growth delay index of 21.3 and 13.8 days, respectively (Fig. 3A and B). Both cytotoxic agents induced complete regression of the tumors in 89% and 87% of treated mice, respectively. However, in both situations, tumor relapse occurred after a median time of 58 days after fotemustine administration and 36 days after temozolomide treatment. Similarly, fote-

mustine and temozolomide were both highly effective on xenograft MP38, with an optimal GI of 100% and 97%, respectively (Fig. 3C and D). Optimal GIs induced by fotemustine and temozolomide on xenograft MM26 were 86% and 95%, respectively (Fig. 3E and F). Finally, no complete remission was observed after either treatment on xenograft MM66: fotemustine and temozolomide were less effective in this model, with an optimal GI of 65% and 86% and a growth delay index of 1.2 and 1.8, respectively (Fig. 3G and H). No complete remission was observed after either treatment.

Discussion

The aim of this study was to establish a panel of representative xenografts obtained from human uveal melanomas and to constitute a pharmacologic tool for drug efficacy evaluation. These tumor grafts were obtained by transplantation of human primary tumors or metastases into immunodeficient mice. Such validated tumor grafts could then be useful to test the antitumor efficacy of new agents or drug combinations to improve the clinical outcome of uveal melanoma patients. Various uveal melanoma models have been developed, mainly by inoculation into mice, rats, or rabbits of various established human cell lines obtained from primary or metastatic tumors, such as 92-1, SP-6.5, OCM-1, OCM-2, OCM-3, OCM-8, IPC227, OM431, C918, and M619 cells (15). Various injection modalities have also been used in orthotopic (16–18) and nonorthotopic situations (19). Similarly, a few genetic engineering models have been obtained by transforming uveal cells with oncogenic viruses (20). Primary tumor growth was observed in the retinal pigment epithelium and in metastatic lesions. One therapeutic experiment (dacarbazine and external beam irradiation) has already been reported (21). However, the prevalence of mice developing tumors remains low (i.e., ~20%) and insufficient for preclinical pharmacologic screening. Finally, two research teams have each developed a primary human tumor xenograft (16, 22). Establishment of a large panel

of uveal melanoma models therefore constitutes an essential step for preclinical experiments.

Ninety human uveal melanoma fresh tumors were grafted into SCID immunodeficient mice, and 25 tumor grafts were obtained (28%). Univariate analyses of prognostic factors for *in vivo* tumor growth showed that the origin of the patient's tumor samples was the only parameter significantly correlated with tumor take. Heegaard et al. (22) obtained only one tumor after eight grafts (13%). This tumor was histologically a mixed cell tumor, as was the patient tumor from whom the xenograft was established. The authors considered that the low tumor graft could be due to the stromal content of the tumor that might influence the take rate. The tumors investigated all had very scant stroma, which may have affected tumor nutrition immediately after transplantation and may have resulted in the low take rate.

In other human cancer types (i.e., breast cancers), pejorative clinical and biological factors are associated with an increased *in vivo* tumor take (6, 23, 24). As reported with other cancers (25), *in vivo* tumor growth in this study population constituted a predictive factor for overall survival and, in nonmetastatic patients, for metastasis-free survival. This observation could therefore be the basis for molecular studies in the two groups of tumors discriminated by their capacity to grow in immunodeficient mice.

Tumor graft characterization constitutes the first step of validation of the model and comprises histopathologic analyses done concomitantly in both tumor grafts and the corresponding patient tumors by a pathologist experienced in the field of human cancer. A very good concordance was observed between the histologic features of the patient's tumor and the corresponding xenografts. However, in a few cases of mixed or spindle cell uveal melanoma, an epithelioid uveal melanoma was diagnosed in the xenograft, suggesting that these tumor cells have a better capacity to survive and grow in mice, as reported by Liggett et al. (26). This observation is concordant with the fact that epithelioid uveal melanoma has a poorer prognosis than other forms (4, 27, 28). Immunohistochemical studies showed that xenografts preserved the characteristic properties of the patient's tumor. Bcl-2, previously shown to be highly expressed in uveal melanoma (29, 30), was expressed in all cases studied. The expression of c-kit, β -catenin, and tumor-specific antigens, studied in patient tumors and the corresponding tumor grafts, showed very few discordances, suggesting relative stability of tumor cell characteristics during the *in vivo* transplantation process. β -Catenin, described as a biomarker involved in class 2

tumor metastasis signature (27, 31, 32), was strongly expressed in all uveal melanoma samples and may explain the relatively high risk of metastatic disease for uveal melanoma patients.

Biological characterization of the models was completed by evaluating the response of four tumor grafts to conventional chemotherapy used in metastatic uveal melanoma patients (i.e., temozolomide and fotemustine). Three of the four models studied showed high sensitivity to treatment, with complete remissions but constant and rapid progression after stopping treatment. A similar situation was observed in uveal melanoma patients for whom the overall response rate after temozolomide and fotemustine administered in the metastatic setting was 14.3% and 36%, respectively, with a median response duration of 1.84 and 11 months (1–3, 33, 34). All these data therefore suggest that these uveal melanoma tumor grafts correlate with the clinical outcome of metastatic uveal melanoma patients and can be used for preclinical pharmacologic assessments. Moreover, the high complete remission rate in one model (MP77) is of particular interest to evaluate therapeutic compounds that could be concomitantly combined with chemotherapy or administered as adjuvant treatment, with a main readout defined as the relapse rate in both situations.

In conclusion, the present study describes a new panel of uveal melanoma tumor xenografts, corresponding to the clinical outcome observed in patients. Such a panel could therefore be useful for preclinical therapeutic experiments and for screening of new molecular markers of response and resistance. To improve the accuracy of our established models, as previously reported with other tumor cell lines (18, 35), we are currently developing orthotopic and/or liver metastatic tumors that might more closely mimic the natural characteristics and natural history of human uveal melanoma.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received 11/19/2009; revised 01/15/2010; accepted 01/18/2010; published OnlineFirst 04/06/2010.

References

- Peters S, Voelter V, Zografos L, et al. Intra-arterial hepatic fotemustine for the treatment of liver metastases from uveal melanoma: experience in 101 patients. *Ann Oncol* 2006;17:578–83.
- Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 2000;18:158–66.
- Bedikian AY, Papadopoulos N, Plager C, et al. Phase II evaluation of temozolomide in metastatic choroidal melanoma. *Melanoma Res* 2003;13:303–6.
- Desjardins L, Levy-Gabriel C, Lumbroso-Lerouic L, et al. Prognostic factors for malignant uveal melanoma. Retrospective study on 2,241 patients and recent contribution of monosomy-3 research. *J Fr Ophtalmol* 2006;29:741–9.

5. Garber K. From human to mouse and back: 'tumorgraft' models surge in popularity. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:6–8.
6. Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, et al. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res* 2007;13:3989–98.
7. Arvelo F, Poupon MF, Goguel AF, et al. Response of a multidrug-resistant human small-cell lung cancer xenograft to chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;120:17–23.
8. Kaplan EL. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457–81.
9. Marty B, Maire V, Gravier E, et al. Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008;10:R101.
10. Tuefferd M, De Bondt A, Van Den Wyngaert I, et al. Genome-wide copy number alterations detection in fresh frozen and matched FFPE samples using SNP 6.0 arrays. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:957–64.
11. Trollet J, Hupe P, Huon I, et al. Genomic profiling and identification of high-risk uveal melanoma by array CGH analysis of primary tumors and liver metastases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2572–80.
12. Chambost H, van Baren N, Brasseur F, Olive D. MAGE-A genes are not expressed in human leukemias. *Leukemia* 2001;15:1769–71.
13. Jacobs JF, Brasseur F, Hulsbergen-van de Kaa CA, et al. Cancer-germline gene expression in pediatric solid tumors using quantitative real-time PCR. *Int J Cancer* 2007;120:67–74.
14. Chambost H, Van Baren N, Brasseur F, et al. Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells. *Blood* 2000;95:3530–3.
15. Beliveau A, Berube M, Carrier P, et al. Tumorigenicity of the mixed spindle-epithelioid SP6.5 and epithelioid TP17 uveal melanoma cell lines is differentially related to $\alpha 5\beta 1$ integrin expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:3058–65.
16. Cheng H, Wu ZY, Zheng JL, et al. A preliminary study in establishment of mice model of experimental uveal melanoma. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2006;42:733–7.
17. Braun RD, Vistisen KS. Measurement of human choroidal melanoma xenograft volume in rats using high-frequency ultrasound. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:16–22.
18. Wang S, Coleman EJ, Pop LM, et al. Effect of an anti-CD54 (ICAM-1) monoclonal antibody (UV3) on the growth of human uveal melanoma cells transplanted heterotopically and orthotopically in SCID mice. *Int J Cancer* 2006;118:932–41.
19. Verin P, Meunier J, Gendre P, et al. Graft of a uveal melanoma on hamster kidney; ultrastructure of the original tissue and of cultivated fragments. *Bull Soc Ophthalmol Fr* 1971;71:170–4.
20. Albert DM, Shaddock JA, Liu HS, et al. Animal models for the study of uveal melanoma. *Int Ophthalmol Clin* 1980;20:143–60.
21. Syed NA, Windle JJ, Darjatmoko SR, et al. Transgenic mice with pigmented intraocular tumors: tissue of origin and treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:2800–5.
22. Heegaard S, Spang-Thomsen M, Prause JU. Establishment and characterization of human uveal malignant melanoma xenografts in nude mice. *Melanoma Res* 2003;13:247–51.
23. Sharkey FE, Fogh J. Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis Rev* 1984;3:341–60.
24. Fogh J, Orfeo T, Tiso J, Sharkey FE. Establishment of human colon carcinoma lines in nude mice. *Exp Cell Biol* 1979;47:136–44.
25. John T, Li M, Panchal D, et al. Correlation of primary tumor engraftment in immune deficient mice and relapse rate in patients with early-stage non-small cell lung carcinoma (NSCLC) [abstract 11082]. *J Clin Oncol* 2009;27.
26. Liggett PE, Lo G, Pince KJ, et al. Heterotransplantation of human uveal melanoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231:15–20.
27. Chang SH, Worley LA, Onken MD, Harbour JW. Prognostic biomarkers in uveal melanoma: evidence for a stem cell-like phenotype associated with metastasis. *Melanoma Res* 2008;18:191–200.
28. Damato B. Developments in the management of uveal melanoma. *Clin Experiment Ophthalmol* 2004;32:639–47.
29. Triozzi PL, Eng C, Singh AD. Targeted therapy for uveal melanoma. *Cancer Treat Rev* 2008;34:247–58.
30. Sulkowska M, Famulski W, Bakunowicz-Lazarczyk A, et al. Bcl-2 expression in primary uveal melanoma. *Tumori* 2001;87:54–7.
31. Zuidervaart W, Pavey S, van Nieuwpoort FA, et al. Expression of Wnt5a and its downstream effector β -catenin in uveal melanoma. *Melanoma Res* 2007;17:380–6.
32. Conway RM, Cursiefen C, Behrens J, et al. Biomolecular markers of malignancy in human uveal melanoma: the role of the cadherin-catenin complex and gene expression profiling. *Ophthalmologica* 2003;217:68–75.
33. Voelter V, Diserens AC, Moulin A, et al. Infrequent promoter methylation of the MGMT gene in liver metastases from uveal melanoma. *Int J Cancer* 2008;123:1215–8.
34. Leyvraz S, Spataro V, Bauer J, et al. Treatment of ocular melanoma metastatic to the liver by hepatic arterial chemotherapy. *J Clin Oncol* 1997;15:2589–95.
35. Yang H, Fang G, Huang X, et al. *In-vivo* xenograft murine human uveal melanoma model develops hepatic micrometastases. *Melanoma Res* 2008;18:95–103.

Table S1: Tumor-specific antigen mRNA expression (supplementary data)

Models (P/X)*	Actin (%)	NAI7 (%)	Tyrosinase (%)	Melan-A (%)	MAGE-1 (%)	MAGE-2 (%)	MAGE-3 (%)	MAGE-4 (%)	MAGE-6 (%)	MAGE-10 (%)	MAGE-C2 (%)	LAGE-1 (%)
MP34	+++	++++	+++	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	+	++++	+++	+/-	+/-	0	0	+/-	0	0	0
MP38	++++	++++	++++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
MP41	+++	+++	+++	+	0	0	0	0	0	0	+/-	0
	+++	+++	++++	++++	0	0	0	0	0	0	++	0
MP42	+++	++	+++	++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	+++	++++	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
MP46	+/-	+++	+/-	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0
	++	++++	++++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
MP47	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
	++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
MP55	++	+++	++	++	+/-	+++	++	+/-	+++	0	0	0
	++	++	++++	++++	+++	+++	+++	+/-	+++	+/-	0	++
MP71	++	+++	+++	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	++++	++++	++++	+/-	+/-	0	0	+/-	0	0	0
MP77	++	+++	+	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	+++	0	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
MP80	+++	+++	++++	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
	++	+++	++++	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
MM26	+++*	++++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	+++	++++	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
MM28	+++	+++	++	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	+++	+++	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
MM33	++++	++++	++++	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	0	+/-	0
MM52	+++	+++	+++	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
	++	+++	++++	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
MM66	+++	+++	0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	+++	+++	++++	0	0	0	0	0	0	0	0
MM74	+++	+++	0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	+++	+	++++	0	0	0	0	0	0	0	0

+/-: < 4% of tumors; +: 20%; ++: 20-100%; +++: 100%; ++++: > 100%.

* Data are presented consecutively for the patient's tumor and the corresponding xenografts.

Table S2: Spontaneous tumor growth of uveal melanoma xenografts (supplementary data)

Models	Growth delay after initial transplantation (months)	Growth time to reach a tumor volume of 60-200 mm³ (days)	Doubling time (days)
MP34	18.5	35	34
MP38	3.5	132	20
MP41	7.5	120	26
MP42	4	101	40
MP46	12.5	40	36
MP47	7	110	100
MP55	5	30	22
MP71	7	88	55
MP77	3.5	20	5
MP80	2	46	10
MM26	6.5	32	10
MM28	5	68	36
MM33	1	42	18
MM52	6	66	20
MM66	1	30	18
MM74	1.5	60	16

7.2.2 Caractérisation des modèles murins par analyse transcriptome et génome

Après la caractérisation des données aux niveaux histologique, génique, sur les chromosomes d'intérêts dans le mélanome de la choroïde (principalement le chromosome 3 [Trolet et al., 2009]), ou encore concernant l'expression d'antigènes tumoraux ou leur comportement en réponse à des chimiothérapies, présentée dans le papier précédent, des analyses haut-débit ont été réalisées sur ces modèles. Le génome des patients et des xéno greffes correspondantes a été analysé sur puces Affymetrix Human Genome Wide SNP6.0, le transcriptome sur puces Affymetrix Human Exon 1.0 ST et le protéome sur puces RPPA (Reverse Phase Protein Arrays).

En parallèle, des recherches de mutations ont été effectuées suite aux récentes publications parues dans le domaine chez ce mélanome (sous-unité α des protéines G, GNAQ et GNA11).

L'analyse du protéome est en cours sur la plateforme du département de Transfert de l'Institut Curie en charge de ce type de données et fera l'objet d'une autre publication.

Les données de génome, transcriptome et des mutations sont quant à elles analysés et les résultats obtenus sont en cours d'écriture.

J'ai effectué les analyses des données génome et transcriptome afin de comparer les patients d'origine et les xéno greffes associées, ainsi que les différents passages des xéno greffes entre eux. Les résultats sont présentés sous forme d'article.

Nota Bene : L'article présenté est en cours de préparation et sera modifié avant soumission pour publication.

PUBLICATION

« **Genetic, genomic, and transcriptomic validation of primary human uveal melanoma xenografts** »

Laurent C, Gentien D, Piperno-Neumann S, Némati F, Desjardins L, Mariani P, Rapinat A, Sastre-Garau X, Couturier J, Hupé P, Roman-Roman S, Stern MH, Barillot E, Saule S, Decaudin D *In preparation*.

RESUME EN FRANÇAIS

Historiquement, le mélanome de la choroïde était traité par énucléation, radiation ou autres. Les nouvelles thérapies conservatrices telles que la protonthérapie permettent de réduire le nombre d'énucléations. Avec le développement de ces nouvelles thérapies, il est important de pouvoir valider l'efficacité de différentes molécules sur des modèles animaux pertinents. Dans une étude précédente, l'établissement et la caractérisation de modèles de xéno greffes de mélanomes uvéaux transplantés dans des souris immunodéficientes ont été présentés [Némati et al., 2010].

L'objectif de cette étude est de comparer les tumeurs oculaires des patients et les xéno greffes correspondantes selon leurs profils génétiques, transcriptomiques et mutationnels. Le but est de confirmer si ces modèles murins de mélanomes choroïdiens sont

bien représentatifs des tumeurs des patients d'origine, afin de les valider comme outils précliniques dans des évaluations pharmacologiques et biologiques.

Parmi les 16 modèles décrits, 42 échantillons d'ADN issus de tumeurs de patients et de leur xénogreffes ont été analysés sur puces Affymetrix GeneChip® Genome-Wide Human SNP6.0 arrays et 50 échantillons d'ARN ont été analysés sur puces Affymetrix GeneChip® Human Exon 1.0 ST arrays.

Les profils génomiques révèlent une très bonne concordance entre les tumeurs des patients et les xénogreffes associées. L'analyse des profils d'expression met en évidence des gènes différenciellement exprimés entre les tumeurs des patients et les xénogreffes correspondantes. Ces gènes sont impliqués dans le système immunitaire ou la matrice extra-cellulaire et leur différence d'expression est principalement due au changement d'hôte. Une fois établis dans la souris, les profils d'expression des xénogreffes sont stables.

Cette étude semble donc indiquer que cet ensemble de 16 modèles de xénogreffes représente un outil pertinent dans l'étude du mélanome de la choroïde. Il s'agit d'un outil préclinique intéressant pour sélectionner des molécules qui présenteraient des effets prometteurs dans le traitement de ce cancer.

Genetic, genomic, and transcriptomic validation of primary human uveal melanoma xenografts

Cécile Laurent¹⁻³, David Gentien⁴, Sophie Piperno-Neumann⁵,
Fariba Némati⁶, Laurence Desjardins⁷, Pascale Mariani⁸, Audrey Rapinat⁴,
Xavier Sastre-Garau⁹, Jérôme Couturier¹⁰, Philippe Hupé^{2,3}, Sergio Roman-
Roman¹¹, Marc-Henri Stern¹², Emmanuel Barillot^{2,3}, Simon Saule¹,
Didier Decaudin^{5,6}

¹ UMR 3347 CNRS, Institut Curie, Paris; ² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U900/U1021, Paris; ³ Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau; ⁴ platform of Molecular Biology facilities, Translational Research Department, Institut Curie, Paris; ⁵ Department of Medical Oncology, Institut Curie, Paris; ⁶ Laboratory of Preclinical Investigation, Translational Research Department, Institut Curie, Paris; ⁷ Department of Ophthalmological Oncology, Institut Curie, Paris; ⁸ Department of Surgery Oncology, Institut Curie, Paris; ⁹ Department of tumor Biology, Institut Curie, Paris; ¹⁰ Department of Genetics, Institut Curie, Paris; ¹¹ Translational Research Department, Institut Curie, Paris; ¹² Inserm U830, Institut Curie, Paris; France.

Key words: uveal melanoma, GNAQ/GNA11/BAP1 mutations, genomic and gene expression profiles, RPPA, xenografts.

Corresponding author:

Dr Didier Decaudin, MD, PhD,
Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris cedex 05, France.
Phone number: (33) 1.44.32.46.90 / Fax number: (33) 1.53.10.40.11.
didier.decaudin@curie.net

Conflict-of-interest statement: All the authors have no conflict-of-interest to declare.

ABSTRACT

Rationale: Uveal melanoma (UM) is marked by the occurrence of liver metastases in 50% of patients, without any curative treatment. New therapeutic strategies are therefore warranted, and require to be previously evaluated in relevant and predictive preclinical models in this rare tumor.

Objectives: We have developed a panel of UM xenografts and performed a first comparative characterization with their corresponding patient's tumors. In this study, we have completed this characterization by determination of their genetic, genomic, and gene expression profiles.

Findings: Sixteen UM xenografts at different *in vivo* passages and their corresponding patient's tumors have been included in the study. Mutations of *GNAQ*, *GNA11*, *GNAS*, *GNA15*, *BAP1*, and *BRAF* genes, genomic and gene expression Affymetrix Arrays have been assessed. Comparing xenografts to their originated patient's tumor samples, and xenografts to themselves at different and later *in vivo* passages, we have shown that UM tumorgrafts well reproduce human UM.

Conclusions: Genetic, genomic, gene and protein expression profile characterization of our UM xenografts showed a high conservation of their molecular features during their *in vivo* transplantation process and *in vivo* maintain. We therefore consider that they constitute relevant preclinical tools for pharmacological experiments.

INTRODUCTION

With 6 new cases per million per year, uveal melanoma (UM) remains the most frequent ocular primary tumor in adults. Despite a local control rate of 95% at 10 years, over 50% of UM patients will die of metastases, restricted to the liver for 90% of them. Very few studies are dedicated specifically to metastatic UM patients, and only 80 publications from the last 30 years with data on the efficacy of treatments were identified by Augsburger and colleagues in a recent meta-analysis (Augsburger). In a retrospective series of 470 consecutive metastatic patients managed at the Institut Curie between 2000 and 2008, we have observed a median overall survival of 13 months, with a statistically significant difference according to the first treatment in the metastatic setting, i.e. 28 months for surgery, 12 months for any systemic treatment, and 4 months for a best supportive care (Piperno-Neumann et al, ESMO 2010). Moreover, very few studies focused on metastatic UM patients were prospective clinical trials, without any randomized phase III trial, confirming the lack of effective therapies in this rare cancer.

Clinical and pathological risk factors for metastasis include age at diagnosis, largest tumor diameter and thickness, anterior location, ciliary body involvement, retinal detachment, extra-scleral extension, and epithelioid cell type. More recently, genome-wide techniques of genomic and gene expression profiling make possible to study tumors on a systematic basis and to improve the characterization of high-risk UM. In this, genetic features as monosomy 3, amplification of 8q, and multiple genomic alterations have been shown to be poor prognostic parameters (Prescher et al, 1996; Trolet et al, 2009). Moreover, the gene expression signature from Onken and colleagues identified two molecular classes of UM with low risk (Class 1) and high risk (Class 2) of metastasis (Onken et al, 2007). Finally, mutations in the GNAQ/GNA11 genes activating

the MAP kinase pathway (Onken et al, 2008, Van Raamsdonk et al, 2009-2010) and in the BAP1 (BRCA1-associated protein 1) gene (Harbour) have recently been described in UM. As GNAQ and GNA11 mutational status do not impact the outcome of UM patients (Bauer et al, 2009; Van Raamsdonk, 2010), BAP1 mutations have been correlated to the high risk metastatic Class 2 patients (Harbour). Systematic genetic analysis of primary tumors is therefore recommended for the next years, either by transvitreal or transcleral access for posterior and anterior tumors, respectively, in the prospect of future adjuvant trials based on new identified biological targets.

In order to improve UM patient's outcome, new therapies are therefore warranted. However, because of the very small incidence of the disease, it appears not possible to multiply clinical trials for testing efficacy of innovative therapeutic approaches administered alone or in combinations. It is therefore strongly necessary to develop preclinical models that well reproduce molecular features of human UM and possess a high predictive value for clinical efficacy in patients. One main category of preclinical cancer models generally used in preclinical investigations are xenografts obtained from human tumor fragments directly transplanted into immunodeficient mice, without an intermediate *in vitro* passage, recently called "Tumorgrafts" [Garber]. Tumorgrafts accurately reproduce the marked heterogeneity of human cancers, particularly when large panels of a specific tumor type are available. Furthermore, procedures for assessment of therapeutic efficacy have been well standardized and readily allow evaluation of combined therapies, particularly for the purposes of objective biostatistical assessment. We have recently reported the establishment and characterization of UM xenografts obtained from patient tumor samples (primary intraocular tumors after enucleation or metastases) [Némati]. Our first characterization included comparative

histopathological analyses of both xenografts and corresponding patient's tumors, as well as determination of few molecular markers and status of the chromosome 3.

The aim of this study was to complete model's characterization at the genetic, genomic and gene expression levels. Comparing xenografts to their originated patient's tumor samples, and xenografts to themselves at different and later *in vivo* passages, we have shown that UM tumorgrafts well reproduce human UM in a individual fashion (patient's tumor and corresponding xenograft) and in a collective fashion (panel of UM models), and are strongly stable during their *in vivo* maintain into immunodeficient mice. In particular, we have observed that signaling pathways usually up-regulated in human UM are also activated in UM xenografts, showing that our models constitute relevant preclinical tools to study new therapeutic strategies.

RESULTS

Mutational status

In a first time, we have studied and compared gene mutations in both patient's tumors and corresponding xenografts at different *in vivo* passages. Concerning G proteins GNAQ and GNA11, mutations have been found in 5 and 10 cases among the 16 studied xenografts, respectively, with a total concordance between xenografts, whatever passages, and their originated patient's tumors (Table 3). GNAS and GNA15 were not found mutated when tested on wild type GNA11 and GNAQ. In a larger study (data not shown), equivalent number of patient's GNA11 or GNAQ mutated and wild type were screened for GNAS and GNA15, and all tumor samples were GNAS and GNA15 wild type. Overall, 94% of studied xenografts had either exclusive GNAQ or GNA11 mutation, that proportion being quite similar to the observations reported in UM patients. GNAQ mutations that have been found were mainly missense mutation in exon 5 (c.626A>C) changing a Glycine to a Proline leading an important modification of alpha subunit (Grantham distance calculated by Alamut: 76). Furthermore, one of 5 primary tumors has also a missense mutation in exon 5 (c.631T>A), leading to a fine predicted modification of the alpha subunit: p.Ser211Thr (Grantham distance: 58). GNA11 mutations were mostly found in exon 5 on the same Gln209. 12 of 13 primary tumors and 2 of 2 were missense mutations (c.626 a>T), leading a moderate physicochemical difference between Gln and Pro (Grantham dist.: 76). Furthermore in one of the 13 primary tumors a missense mutation in exon 4 of GNA11 was found: (c.547C>T), modifying the arginine at position to a cysteine. This mutation is predicted as a large physicochemical difference between (Grantham distance: 180). Concerning BAP1

mutation, we have detected 6/16 mutated xenografts (38%), also with a complete concordance with the mutational status of the corresponding patient's tumors (Table3). Frameshift truncated mutations were found in 4 models (MM065; c.1717del, p.Leu573TrpfsX3, MP042: c.662del p.Glu221GlyfsX10, MP047: c.862_920del, p.Ala288GlnfsX90, MM074: c.790del, p.Arg264GlyfsX2). A nonsense mutation was found in MM052 (c.781C>T, p.Gln261X). A missens mutation was found in samples (c.516C>G, p : Ser172Arg). A non truncated mutation was detected in MP055 modifying the aminoacid 172, a serine to an arginie. Finally the MP038 was mutated due to a deletion of 14pb deteted in intron 2 (c.68-9_72del) leading eventually to a lost of a splice site. For two models (MP047 and MM074) cell lines were not mutated contrary to early passages (tu peux apporter des info suppl fariba)...

Finally, no BRAF mutation have been found, as largely reported in UM patients.

In a second time, we have evaluated whether mutational status could impact the *in vivo* growth into mice of transplanted patient's tumors. Overall, 52 samples (41 of primary tumors and 11 of metastases) xenografted into SCID mice were available for genetic analyses. Among these samples, 22/41 primary tumors have grown after *in vivo* transplantation, and 4/11 metastases. As shown in the Table 1, we have observed a significant lower proportion of GNAQ-mutated tumors that are able to grow into mice ($p < 10^{-3}$) and, inversely, a significant higher proportion of GNA11-mutated tumors that have grow after *in vivo* transplantation ($p < 0.05$). None difference has been observed in the mutational status of BAP1 between tumors that have grown into mice and tumors that failed to grow. All data are presented in the Table 2S (Supplementary data).

Chromosomal aberrations of high risk datasets

Forty-two uveal melanoma samples were analyzed on SNP arrays, in which 13 patient's tumors, 24 xenografts at very early (n=11), early (n=8), and late (n=5) *in vivo* passages, and 5 xenograft-derived UM cell lines. Detection of copy number alterations revealed that 19 tumors (45%) presented a loss of chromosome 1p, 24 tumors (57%) a gain of 1q, 31 tumors (74%) a loss of 3, 16 tumors (38%) a gain of 6p, 32 tumors (76%) a loss of 6q, 34 tumors (81%) a loss of 8q, and 26 tumors (62%) a loss of 16q (Figure 1). Moreover, 31 tumors (74%) were defined by at least multiple genomic alterations of chromosomes 3 and 8, as previously associated with high risk uveal melanomas (Häusler, 2005; White, 2006; Trolet, 2009). Such an observation is concordant with our first report showing that *in vivo* tumor growth of UM samples was significantly correlated to a low metastatic-free survival of patients with a primary intraocular tumor (Némati).

Good conservation of genomic profiles

As previously mentioned, one main objective of our study was to evaluate the genomic stability of the tumors during the *in vivo* transplantation process of patient's UM and the *in vivo* maintain of UM xenografts. For 5 models (MM066 / MM074 / MP038 / MP055 / MP071), patient's tumors and corresponding P1 and P4 xenografts were available. The comparison of chromosomal aberrations in these paired samples observed in Figure 2A suggested a high conservation of genomic profiles from tumor patients to xenografts at very early and early *in vivo* passages in mice. Moreover, very few genomic alterations occurred in xenografts between P1 and P4. Two examples are shown in the Figure 2B and 2C. Similarly, when tumor DNA was available at a late

passage (P9), we have also observed a good conservation of the genomic profiles observed in originating patient's tumors (4 models) (Figure 2D). Interestingly, the very long delays between the first and the 9th transplantations that ranges between XX and XX months, underline the high genomic stability of our primary human UM xenografts. The MM066 model, for which DNA was available at all *in vivo* passages, was shown in the Figure 3B). We have also compared chromosomal aberrations of the 5 xenograft-derived UM cell lines (MM074 / MP038 / MP041 / MP074 / MP065) to their corresponding patient's tumors, showing numerous new alterations and more altered genomic profiles in cell lines (Figure 2E).

To evaluate the good concordance within tumors compared to others, the correlation based on smoothing copy number value from 41 samples (all models except MP046 where only passage 1 xenograft sample is available) was calculated. Heatmap representing correlation coefficient was presented in the Figure 3A. Each group of models was separated by purple line and a perfect correlation is observed per sample on the median line. Comparison of patient's tumors and corresponding xenografts showed high similarities, with a total correlation score of 0.89. Samples per model were clearly well correlated compared to others from datasets. The comparison by Kolmogorov-Smirnov test of correlations calculated on all samples and correlations calculated on data per models revealed a significantly different distribution ($p < 2.2e-16$). This observation was only available for patient's tumors and their corresponding xenografts. Indeed, concerning xenograft-derived UM cells, except for model MP038 where all samples presented a strong similarity, the four remaining cell lines were not well correlated to their corresponding tumor's samples. Such an observation was confirmed by a hierarchical clustering on copy number information. Indeed, as shown in

the Figure 3B, a strong proportion of xenografts clustered to their corresponding patient's tumors (12/16 models, 75%), but only one UM cell line among five appropriately clustered. Interestingly, 4 among 5 xenograft-derived cell lines clustered together, suggesting that *in vitro* culture may induce recurrent genomic alterations.

Finally, allele frequency was also available with SNP6,0 microarrays, as shown in the Figures 2B and 2C. Our results did not focus on this part of information, but as for copy number profiles, patients' tumors and their corresponding xenografts revealed same allele frequency profiling (data not shown).

Main genomic alterations of each xenograft are presented in the Table 2S ('Supplementary data).

Gene expression profiles from intraocular and metastatic UM samples

Fifty uveal melanoma samples were analyzed on Affymetrix GeneChip® Human Exon 1.0 ST arrays, in which 12 patient's tumors, 33 xenografts at very early (n=16), early (n=13), and late (n=4) *in vivo* passages, and 5 xenograft-derived UM cell lines. In addition to genomic profiles, we evaluated the stability of gene expression profiles among patient's tumor samples and their corresponding xenografts. Because of the two different tumor origins, i.e. from intraocular and metastatic lesions, we first evaluated by clustering if all models could be analyzed together. Hierarchical clustering on the 12 samples from patients' tumors performed on all 22517 genes demonstrated mixed data with no organ bias (data not shown). We therefore considered all data together.

Comparison of the gene expression profiles between patient's tumors and their corresponding xenografts

Hierarchical clustering was performed on the 10 models for which RNAs from patient's tumor and xenografts at very early and late *in vivo* passages were available exhibited, showing that 5 patient's tumors and xenografts, whatever passages, clustered together (50%) and that 9 xenografts/P1 and xenografts/P4 clustered together (90%) (Figure 4A). RNAs from xenografts/P9 were available for only 4 models in which RNAs from patient's UM were not available, preventing the analysis of this late passage due to lack of statistical power. Moreover, for 5 models, xenograft-derived UM cells are available and were compared to patient's UM and xenografts. Despite the small amount of samples, comparison between xenograft-derived UM cells and patient's tumors and xenografts revealed that these samples are more different from patients and xenografts (3,72% genes are differentially expressed between cell lines and patients, 1,01% and 1,35% in the comparison with xenografts/P1 and P4 respectively). These results are consistent with genomic comparison.

As shown in the Table 2, analyses identified about 700 genes differentially expressed between patient's tumors and xenografts (P1 and P4), representing 3% of the genes available on the microarrays. In contrast, we have observed that no gene was differentially expressed (FDR < 0.01) between xenografts at very early and early *in vivo* passages. Among the 700 differentially expressed genes between patient's UM and xenografts, about 2/3 were over-expressed in patient's tumors and 1/3 were over-expressed in xenografts (Table 2). Enrichment analysis of these differentially expressed genes by hyper-geometric tests revealed an over-expression in the immune system, extra-cellular matrix and angiogenesis biological process categories in patient's tumors compared to xenografts and an over-expression in the cell cycle, DNA repair and kinase

activity biological process categories in xenografts compared to patient's tumors (Table 3).

Such down-expression of genes belonging to the immune system, extracellular matrix and angiogenesis may be the consequence of the fact that stroma cells are of human origin in patient's tumors and of mouse origin in xenografts, and may explain the relative low clustering of patient's tumors and xenografts. To evaluate the importance of these genes in the comparison, we therefore excluded from microarray genes related to the immune system, extra-cellular matrix and angiogenesis (Gene Ontology annotation), resulting in the analysis of 17637 genes from 22517 in original data. In such conditions, 9 patient's tumors and xenografts, whatever passages, clustered together (90%) and all xenografts/P1 and xenografts/P4 clustered together (100%) (Figure 4B). Differential analysis on these remaining genes revealed a variation of about 1% of the genes between patient's tumors and xenografts (Table 4).

Clinical prognostic significance of the genes up-expressed into xenografts

In a first time, we have studied the expression of the 12 genes involved in the metastatic signature reported by Onken (Onken 2007) in all included tumor samples. These samples could be divided in 3 categories, one from primary intraocular UM and corresponding xenografts for which no metastatic occurrence within 24 months after initial diagnosis has been observed in patients (MP041/MP055/MP065), one other from primary intraocular UM and corresponding xenografts for which metastatic relapse within 24 months after initial diagnosis has been observed in patients (MP034/MP038/MP042/MP046/MP047/MP071/MP077/MP080), and the third one from metastatic UM (MM026/MM033/MM052/MM066/MM074). As shown in the Figure 5A, we

could not differentiate the first category from the two other ones, suggesting that all tumor samples probably correspond to patients with a worse clinical outcome. Such an observation is concordant with our previous report where we have observed that tumor take in mice was predictive of a short overall survival in metastatic patients and of a short 5-year metastatic free survival of patients with a primary tumor (Némati 2010).

Finally, we have evaluated whether or not *BAP1* mutation and BAP1 gene expression could be correlated. As shown in the Figure 5B, in patient's tumors and xenografts at different *in vivo* passages, we have observed that BAP1 expression was significantly lower in all *BAP1*-mutated tumors. This observation is concordant with the fact that main of these mutations corresponds to gene deletion and loss of function.

Specific status of signaling pathways and gene expression profiles

In order to evaluate signaling pathways that have been described as activated in UM, we have focused the study of gene expression on the MAPK and the MET/Pi3K pathways. However, to avoid biases due to non-homogeneous RNA deposit, and unreliable comparisons of gene expression between one tumor sample to an other one, we have just compared the differential expression of specific genes related to the MAPK pathway between patient's tumors and corresponding xenografts at late passage P4. As shown in the Figure 6, very few genes are differentially expressed, showing that xenografted tumors are similar to their originated patient's tumors in term of relevant signaling pathway.

DISCUSSION

The aim of this study was to complete model's characterization of primary human UM xenografts at the genetic, genomic, gene and protein expression levels. Indeed, molecular assessment of both tumorgrafts and corresponding patient's tumors constitute a necessary step of initial characterization to address two distinct fundamental issues: (1) are genetic/genomic abnormalities, as well as signalling pathways activations, present and recurrent in human tumors also found in preclinical models, and (2) are genetic/genomic abnormalities, as well as signalling pathways activations, similar between tumorgrafts and originated patient's tumors?

The first issue is of particular importance in the presence of alterations that possess an oncogenic role, prognostic value, and/or a therapeutic implication, such as specific genomic alterations that impact the outcome of UM patients (Häusler, 2005; White, 2006; Trolet, 2009). In this, we have shown a dramatic correlation between genetic/genomic alterations observed in patient's tumors and their corresponding xenografts. Few other publications have raised this first issues. Focusing on two specific markers (*KRAS* gene mutation and Dpc4 expression) in twelve models of pancreatic carcinoma, Rubio-Viqueira *et al.* showed a high degree of concordance between primary originated and xenografted tumors [Rubio-Viqueira]. Similarly, high stability has been observed in various cancer types including BRCA1 mutated ovarian carcinoma [Press, Indraccolo], glioblastoma [Jeuken, Claes], breast cancers [Marangoni, Bergamaschi, de Plater, Reyal], synovial sarcoma [Subramaniam], and acute lymphoblastic leukemia [Borgmann]. Our data, and others, therefore support the fact that primary human cancer xenografts well reproduce genetic and genomic alterations of their originated patient's tumors.

The second issue raises two very important questions, namely (1) are genetic/genomic/gene expression profiles modified during the *in vivo* transplantation process and (2) are these profiles modified during *in vivo* maintenance of the model. Despite the extensive use of primary human xenografted tumors, very few published studies have evaluated such a stability. Comparison of genomic profiles between tumorgrafts and their originated tumors in four types of cancer, i.e. breast cancers [Reyal], gynecologic tumors [Indraccolo], pancreatic adenocarcinomas [Armengol], and glioblastomas [Jeuken], demonstrated that both samples matched in the same cluster, suggesting genetic stability during the *in vivo* transplantation process. In our study, we have observed that a very small amount of genes, i.e. about 3% of the 22517 studied ones, are differentially expressed between patient's tumors and corresponding xenografts and that a complete gene expression stability was observed in xenografts at different *in vivo* passages. Looking at this 3% variably expressed genes, we have shown that two thirds of them correspond to the stroma components, namely immune response, response to wounding, extracellular matrix component, cell adhesion, and angiogenesis, as previously observed with our breast cancer xenografts (Reyal). Nevertheless, in contrast to breast cancer models, 1% of genes are found to be over-expressed in UM xenografts than in corresponding patient's tumors. These genes are related to cell cycle, DNA repair and kinase activity biological processes, and transmembrane transport.

Finally, in our comparative analysis, we have clearly shown that signalling pathways activated in UM are also activated in xenografts, such as the MAPK pathway (Jianhong). Such an observation is of importance to underline the fact that our preclinical UM xenografts therefore constitute a relevant tool for pharmacological

assessments. Indeed, next to their molecular validation, such tumorgrafts should ensure a high predictive value in humans for therapeutic efficacy of standard and innovative treatments. In the view of uveal melanoma, where new possible targeted therapies are under exploration (Patel), our models offer well-defined tumors in term of signalling pathways through gene and protein expression, as well as ratio of phosphoproteins and proteins, which are currently under analysis. Based on these features, various preclinical trials may easily define the best compound(s) and the best combination(s) of treatments, and be in a second time translated into clinical studies that will inevitably improve the outcome of UM patients.

METHODS

Tumor samples

Human uveal melanoma xenografts have previously been established from primary intraocular (enucleation) or metastatic tumor samples, and characterized [1]. Among those 26 preclinical models, 16 were included in this study in which 11 obtained from primary intraocular tumors (MP034 / 038 / 041 / 042 / 046 / 047 / 055 / 065 / 071 / 077 / 080), 4 from liver metastases (MM026 / 052 / 066 / 074), and 1 from skin metastasis (MM033). For each model, when DNA and RNA could be obtained (Table 1S, supplementary data), the study included samples from originating patient's tumors and xenografts at very early (P1), early (P4) and late (P9) *in vivo* passages into SCID mice. Moreover, five tumor cell lines derived from xenografts (MP038 / 041 / 047 / 065 and MM074) have also been included in the study. For two models (MM066, MM074) mutations screening was not performed due to low amount of available material. To compare mutational status, and xenograft of uveal melanoma, all biopsies grafted in SCID mice were analyzed (Table1), 41 primary tumors and 11 metastasis were grafted, leading to 26 available models.

Mutations' screening

As uveal melanoma is a rare disease, screening of activating mutation of several genes was a way to highlight deregulation of pathways, to evaluate new agent using human xenograft, or to enroll patient in dedicated early trials. We have therefore evaluated mutational status of different genes, i.e. G proteins, BAP1, and BRAF.

G proteins that are highly mutated in UM have been studied, including GNAQ, GNA11, and other α G subunit such as GNAS and GNA15 that have been described in other tumors (Ashktorab 2010, reference GNA15 (David)). Primers for GNAQ are GNAQ_F gatgtgcttagagttcgagtcc and GNAQ_R ttctcattgtctgactccacga, and primers for GNA11 are GNA11_F taccagctctccgactctgc and GNA11_R ttggctgtattcgctgagg. GNAS was screened for R201, Q227, R265 mutations using following primers, GNAS_F AGTGCGTGCCTGCTACGAA and GNAS_R CCGGATGACCATGTTGTAGCT. Mutations of GNA15 was screened using following primers GNA15-F: CAGCCGTGTACTACCTGTCC and GNA15-R: CCAAACAATGCGAGGCTCTC

Frequent mutations of BAP1 were detected using a smart method (Weber, Houdayer, Caux-Moncoutier), based on Enhanced Mismatch Mutation Analysis (EMMA) followed with a specific standard mutation screen to confirm abnormal pics. Briefly, 4 different multiplex PCR were setup on 15 BAP1 hotspot mutations among the 17 exons. As uveal melanoma genomes show monosomy or isodisomy for chromosome 3, a normal DNA was mixed to samples, to highlight heterodimer during the emma process. Data were analyzed using a dedicated software (Emmalys, Fluigent, Paris, France) Abnormal pics, compared to standard BAP1 pics, were sequenced individually, using specific primers (supplementary data, Table 6S, and figure 6S David). Samples were labeled mutated when truncated mutations were found, or non truncated mutation associated with modifications of the BAP1 protein. Wild type samples were nor normal DNA, nor DNA containing missens mutations in intron without any predicted evidence on splicing.

BRAF mutations have been described in cutaneous melanomas, particularly in a metastatic setting (Davies; Lin) [13, 14]. The main observed mutation of BRAF is the substitution of a glutamic acid for a valine at codon 600 in exon 15, leading to a constitutive activation of its basal kinase activity. Analysis of the codon 600 was assessed by PCR using the following primers BRAF S 5-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3 and BRAF AS 5-AGCATCTCAGGGCCAAAAT-3. Sequencing of BRAF amplicons was done on both strands on samples and on a positive control (cell line A673) using an ABI BigDye TerV3.1 cycle sequencing kit and 3130XL or 3500XL analyzers (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, U.S.A.).

DNA extraction and Array hybridization

Genomic DNA was purified using a phenol/chloroform method and controlled on 0.5% agarose gel. Five hundred ng of gDNA were used to perform Affymetrix Human mapping SNP 6.0 assay following the manufacturer's protocol at the Institut Curie microarray core facility. Briefly, gDNA was split to do two independent digestions with Styl or Nspl enzyme. Dedicated adaptors were ligated to DNA before running 7 independent PCR reactions, using TitaniumTM Taq DNA polymerase (Clontech). The PCR products were then controlled on 2% agarose gel, pooled, and fragmented using DNase I enzyme. Size of resulting DNA was checked by gel electrophoresis before terminal labeling and microarray hybridizations on SNP 6.0 array. After hybridization, microarrays were stained, washed and scanned using Affymetrix GCS3000 system. Data were controlled with Affymetrix Genotyping console: contrast QCs were higher than 0.4 (mean = 1.16), call rate were higher than 86% (mean 91.8%) and MAPD were lower than 0.4 (mean = 0.35).

RNA extraction and Array hybridization

Total RNA was isolated from frozen biopsy using an miRNeasy mini kit (Qiagen) and quality assessment was achieved using RNA 6000 Nano labchip (Bioanalyzer, Agilent) and by a Nanodrop spectrophotometer (Thermo). Total RNAs RIN values were between 7.2 and 10 (average: 9.2). Affymetrix Human Exon 1.0 ST arrays were hybridized according Affymetrix recommendations using the Ambion WT protocol (Life technologies, France) and Affymetrix labelling and hybridization kits. 100ng of total RNA were processed in parallel with an external MAQC A RNA to control robustness of data. Labelled DNA mean yield was 7.7 µg (min: 3.9µg; max: 5.5µg). Affymetrix GeneChip® Human Exon 1.0 ST microarrays were hybridized with 4.7 µg of labelled DNA. Raw data, transcript data and exon data were controlled with Expression console (Affymetrix) the Institut Curie microarray core facility.

Microarray Analysis Genome Arrays

Data were analyzed using Partek Genomic Suite software, version 6.5, build 6.10.0915 (Partek, Inc.) using Partek's default parameters. Data were also analysed and visualized using R software (version 2.12). Files obtained from Genotyping Console (Affymetrix, Santa Clara, CA) were imported to R, segmented using pruned DPA algorithm (Rigaill) and calling were estimated by GLAD method (Hupé).

Microarray Analysis - Transcriptome Arrays

Transcriptome profiling of patients tumors and corresponding xenografts were defined using Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array. Analyses were performed with R

software (version 2.12). Analyses were performed at gene level using custom Brainarray Chip Description Files (CDF) based on Entrez Gene database (version 13) (Dai). This custom CDF improved the quality of the data and thus the results of related gene expression studies. Data were normalized by RMA method (Gautier) and the expression of 22517 genes were compared. Expression comparison between patients and xenografts models were performed using linear models method with Limma package in R Software (Smyth; Smyth). Our analysis is a paired analysis per models, the design matrix for the comparison take into account when patients and xenografts belong to the same model. Adjusted p-values by Benjamini and Hochberg of <0.01 were considered statistically significant (Benjamini). Gene sets enrichments were calculated using functions from EMA package (Servant) based on hypergeometric tests from GOStats package (Falcon). GenMAPP 2.0 was used to evaluate differentiated gene expression in biological pathways (Salomonis).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Caroline Hego, Cécile Reyes and Benoît Albaud (Affymetrix platform, Translational Research Department, Institut Curie) for their technical assistance; Pierre Gestraud for his bioinformatic assistance;

We thanks Olivier Lantz, Jordan Madic, Patricia de Cremoux for respectively GNAQ, GNA15, BRAF primers. We thanks Laurence Tremolet of the sequencing platform of Institut Curie. We thanks the group of Dr Dominique Stoppa-Lyonnet for the Emma technique and analysis. We also thank Lucie Hebert and Virginie Jacquemin for BAP1 mutation analysis.

REFERENCES

1. Augsburger JJ, Corrêa ZM, Shaikh A. Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma. *Am J Ophthalmol*. 2009;148(1):119-127.
2. Piperno-Neumann S, et al. To be completed (Sophie).
3. Prescher G, Borngeld N, Horsthemke B, Becher R. Chromosomal aberrations defining uveal melanoma of poor prognosis. *Lancet*. 1992;339(8794):691-692.
4. Trolet J, et al. Genomic profiling and identification of high-risk uveal melanoma by array cgh analysis of primary tumors and liver metastases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(6):2572-2580.
5. Onken MD, et al. Loss of heterozygosity of chromosome 3 detected with single nucleotide polymorphisms is superior to monosomy 3 for predicting metastasis in uveal melanoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13(10):2923-2927.
6. Onken MD, et al. Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(12):5230-5240.
7. Van Raamsdonk CD, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*. 2009;457(7229):599-602.
8. Van Raamsdonk CD, et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(23):2191-2199.
9. Harbour JW, et al. Frequent mutation of *BAP1* in metastasizing uveal melanomas. *Science*. 2010;330(6009):1410-1413.
10. Garber K. From human to mouse and back: "Tumorgraft" models surge in popularity. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(1):6-8.
11. Némati F, et al. Establishment and characterization of a panel of human uveal melanoma xenografts derived from primary and/or metastatic tumors. *Clin Cancer Res*. 2010;16(8):2352-2362.
12. Laurent C, et al. (2011). High PTP4A3 phosphatase expression correlates with metastatic risk in uveal melanoma patients. *Cancer Res*. 2011;71(3):666-674.
13. Häusler T, et al. Loss of heterozygosity of 1p in uveal melanomas with monosomy 3. *Int J Cancer*. 2005;116(6):909-913.
14. White JS, et al. Correlation of comparative genomic hybridization results of 100 archival uveal melanomas with patient survival. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2006;170(1):29-39.
15. Rubio-Viqueira B, et al. An *in vivo* platform for translational drug development in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(15):4652-4661.
16. Indraccolo S, et al. Establishment and characterization of xenografts and cancer cell cultures derived from BRCA1 -/- epithelial ovarian cancers. *Eur J Cancer*. 2006;42(10):1475-1483.
17. Press JZ, et al. Xenografts of primary human gynaecological tumors grown under the renal capsule of NOD/SCID mice show genetic stability during serial transplantation and respond to cytotoxic chemotherapy. *Gynecol Oncol*. 2008;110(2):256-264.
18. Jeuken JWM, et al. Genetic reflection of glioblastoma biopsy material in xenografts: characterization of 11 glioblastoma xenograft lines by comparative genomic hybridization. *J Neurosurg*. 2000;92(4):652-658.
19. Claes A, et al. Phenotypic and genotypic characterization of orthotopic human

- glioma models and its relevance for the study of anti-glioma therapy. *Brain Pathol.* 2008;18(3):423-433.
20. Marangoni E, et al. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res.* 2007;13(13):3989-3998.
 21. Bergamaschi A, et al. Molecular profiling and characterization of luminal-like and basal-like in vivo breast cancer xenograft models. *Mol Oncol.* 2009;3(5-6):469-482.
 22. De Plater L, et al. Establishment and characterization of a new breast cancer xenograft obtained from a woman carrying a germline BRCA2 mutation. *Br J Cancer.* 2010;103(8):1192-1200.
 - 23.
 24. Reyat F, et al. XXXXX. (Didier)
Subramaniam MM, et al. Tissue microarray profiling of primary and xenotransplanted synovial sarcomas demonstrates the immunophenotypic similarities existing between SYT-SSX fusion gene confirmed, biphasic, and monophasic fibrous variants. *Virchows Arch.* 2006;449(4):435-447.
 25. Borgmann A, et al. Childhood ALL blasts retain phenotypic and genotypic characteristics upon long-term serial passage in NOD/SCID mice. *Pediatr Hematol Oncol.* 2000;17(8):635-650.
 26. Armengol G, et al. DNA copy number changes and evaluation of MYC, IGF1R, and FES amplification in xenografts of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000;116(2):133-141.
 27. An J, et al. A comparative transcriptomic analysis of uveal melanoma and normal uveal melanocyte. *PLoS ONE.* 2011;6(1):1-10.
 28. Patel M, et al. Therapeutic implications of the emerging molecular biology of uveal melanoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(8):2087-2100.
 29. Ashktorab H, et al. Distinct genetic alterations in colorectal cancer. *PloS One.* 2010;5(1):e8879.
 - 30.
 31. References GNA15 (David)
Weber J, et al. High-throughput simultaneous detection of point mutations and large-scale rearrangements by CE. *Electrophoresis.* 2007;28(23):4282-4288.
 32. Houdayer C, et al. Enhanced mismatch mutation analysis: simultaneous detection of point mutations and large scale rearrangements by capillary electrophoresis, application to BRCA1 and BRCA2. *Methods Mol Biol.* 2010;653 (X):147-180.
 33. Caux-Moncoutier V, et al. EMMA, a cost- and time-effective diagnostic method for simultaneous detection of point mutations and large-scale genomic rearrangements: application to BRCA1 and BRCA2 in 1,525 patients. *Hum Mutat.* 2011;32(3):325-334.
 34. Rigai G, XXXXX. Pruned dynamic programming for optimal multiple change-point detection. XXXXX. (David)
 35. Hupé P, Stransky N, Thiery J-P, Radvanyi F, Barillot E. Analysis of array cgh data: from signal ratio to gain and loss of dna regions. *Bioinformatics.* 2004;20(18):3413-3422.
 36. Dai M, et al. Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of genechip data. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e175.
 37. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. Affy---analysis of Affymetrix GeneChip

38. data at the probe level *Bioinformatics*. *Oxford University Press*. 2004;20(3):307-315.
39. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3:Article 3.
Smyth GK. Limma: linear models for microarray data. In *Gentleman R, et al. Editors, Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Springer, New York. 2005;397-420.
40. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate : a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Statist Soc Ser*. 1995;B 57(1):289-300.
41. Servant N, et al. Ema - a r package for easy microarray data analysis. *BMC Res Notes*. 2010;3:277.
42. Falcon S, Gentleman R. Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics*. 2007;23(2):257-258.
43. Salomonis N, et al. GenMAPP 2: new features and resources for pathway analysis. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:217.

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1: Chromosomal alterations observed in our dataset of 42 samples. Percentage of alterations were representing. Red: gain. Green: loss. More than half of tumors present known high risk alterations like Loss 1p, Gain 1q, Loss 3, Gain 6p, Loss 6q, Gain 8q, and Loss 16q.

Figure 2: A. Comparison between genomic alterations observed in patients, and xenografts passage 1 and passage 4. Genomic alterations are observed in 5 paired models. **B. Example of the MM026 model.** **C. Example of the MM066 model.** **D. Comparison between genomic alterations observed in patient, and xenografts passage 9.** Genomic alterations are observed in 4 paired models. **E. Comparison between genomic alterations observed in patients and xenograft-derived cell lines.** Genomic alterations are observed in 5 paired models.

Figure 3: A. Correlation on smoothing copy number between all samples divided per models. Models MM026, MM033, MM066, MM074, MP038, MP041, MP055, MP065, MP071, MP078, MP080 revealed strong correlation between the genomic alterations of the patient's tumors and corresponding xenografts. In contrast, there is no good correlation between the genomic alterations of patient's tumors and xenografted-derived cell lines in 4/5 cases (MM074, MP038, MP047, and MP065), but these cell lines are well correlated together. **B. Hierarchical clustering on copy number.** A large part of models are well clustered, except cell lines.

Figure 4: A. Hierarchical clustering of paired patients' tumors and passages 1 and 4 of corresponding xenografts. Hierarchical clustering was performed for models with patients, passage 1 and passage 4. Clustering is based on 22517 genes of arrays and used Ward method as linkage and Pearson correlation as metric. **B. Hierarchical clustering of paired patients' tumors and passages 1 and 4 of corresponding xenografts for selected 17637 genes.** Hierarchical clustering was performed for models with patients, passage 1 and passage 4. Clustering is based on 17637 genes (remaining genes after removal genes from immune system, extracellular matrix and angiogenesis). Ward method as linkage and Pearson correlation as metric were used.

Figure 5: A. Expression of the 12 genes of the ONKEN signature (Onken 2007) in all studied tumor samples. These samples could be divided in 3 categories, one from

primary intraocular UM and corresponding xenografts for which no metastatic occurrence within 24 months after initial diagnosis has been observed in patients (MP041/MP055/MP065), one other from primary intraocular UM and corresponding xenografts for which metastatic relapse within 24 months after initial diagnosis has been observed in patients (MP034/MP038/MP042/MP046/MP047/MP071/MP077/MP080), and the third one from metastatic UM (MM026/MM033/MM052/MM066/MM074). **B. Correlation between BAP1 mutation and BAP1 gene expression.**

Figure 6: Differential expression of MAPK genes between patient's tumors and P4 xenografts. Differential expression of specific genes related to the specific signaling pathways between patient's tumors and corresponding xenografts at late passage P4 was evaluated. Red: gain. Green: loss.

Figure 7S: Detection and validation of BAP1 mutation by EMMA method. Example of on EMMA analysis of exon 10 of a normal DNA 'A', and two passages of MM074. Mutation were confirmed by sequencing on the human metastatic sample, and early passages. The derived uveal melanoma cell lines, was found will type for this exon.
:

Table 1S: Description of available DNA and RNA tumor samples

Models	Patients	Passage1	Passage4	Passage9	Cultured Cells
MM026	DNA	DNA	-	DNA	-
	RNA	RNA	RNA	RNA	-
MM033	DNA	DNA	-	DNA	-
	RNA	RNA	RNA	RNA	-
MM052	DNA	-	DNA	-	-
	RNA	RNA	RNA	-	-
MM066	DNA	DNA	DNA	DNA	-
		RNA	RNA	RNA	-
MM074	DNA	DNA	DNA	-	DNA
	RNA	RNA	RNA	-	RNA
MP034	-	-	DNA	DNA	-
	-	RNA	RNA	RNA	-
MP038	DNA	DNA	DNA	-	DNA
	RNA	RNA	RNA	-	RNA
MP041	DNA	-	DNA	-	DNA
	RNA	RNA	RNA	-	RNA
MP042	-	-	-	-	-
	-	RNA	RNA	-	-
MP046	-	DNA		-	-
	-	RNA		-	-
MP047	DNA	-	-	-	DNA
	RNA	RNA	RNA	-	RNA
MP055	DNA	DNA	DNA	-	-
	RNA	RNA	RNA	-	-
MP065	DNA	DNA	-	-	DNA
	RNA	RNA	-	-	RNA
MP071	DNA	DNA	DNA	-	-
	RNA	RNA	RNA	-	-
MP077	DNA	DNA	-	DNA	-
	RNA	RNA	-	-	-
MP080	DNA	DNA	-	-	-
	RNA	RNA	RNA	-	-

Table 1: Mutational status observed in patient's tumors according to their ability to grow into mice

Tumor type	Model Name	Xenografts growth	GNAQ mutation	GNA11 mutation	GNAS mutation	GNA15 mutation	BRAF mutation	BAP1 mutation
Primary tumors	MP030	Yes	1	0	NT	NT	0	1
Primary tumors	MP031	Yes	1	0	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP032	Yes	1	0	NT	NT	0	1
Primary tumors	MP034	Yes	0	1	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP036	Yes	0	1	NT	NT	0	UD
Primary tumors	MP038	Yes	1	0	0	0	0	1
Primary tumors	MP039	Yes	0	0	0	0	0	1
Primary tumors	MP040	Yes	0	0	0	0	0	UD
Primary tumors	MP041	Yes	0	1	0	0	0	0
Primary tumors	MP042	Yes	0	1	NT	NT	0	1
Primary tumors	MP044	Yes	0	1	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP046	Yes	0	0	0	0	0	UD
Primary tumors	MP047	Yes	0	1	NT	NT	0	1
Primary tumors	MP053	Yes	0	1	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP056	Yes	0	1	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP059	Yes	0	1	NT	NT	0	1
Primary tumors	MP062	Yes	0	0	0	0	0	UD
Primary tumors	MP065	Yes	0	1	0	0	0	1
Primary tumors	MP071	Yes	1	0	0	NR	0	0
Primary tumors	MP077	Yes	0	1	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP080	Yes	0	1	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP099	Yes	0	1	NT	NT	0	1
Primary tumors	MP029	No	1	0	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP035	No	0	1	NT	NT	0	1
Primary tumors	MP043	No	1	0	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP051	No	1	0	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP067	No	0	1	NT	NT	0	1
Primary tumors	MP068	No	1	0	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP070	No	0	1	NT	NT	0	UD
Primary tumors	MP081	No	1	0	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP082	No	1	0	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP087	No	0	1	NT	NT	0	1
Primary tumors	MP088	No	1	0	NT	NT	0	1
Primary tumors	MP092	No	0	1	NT	NT	0	1
Primary tumors	MP094	No	1	0	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP095	No	0	0	0	0	0	0
Primary tumors	MP008	No	0	1	NT	NT	0	0
Primary tumors	MP013	No	1	0	NT	NT	0	1
Primary tumors	MP015	No	1	0	NT	NT	0	1
Primary tumors	MP024	No	1	0	NT	NT	0	UD
Primary tumors	MP027	No	1	0	NT	NT	0	0
Metastatic tumors	MM026	Yes	1	0	0	0	0	0
Metastatic tumors	MM028	Yes	0	1	0	0	0	UD
Metastatic tumors	MM052	Yes	0	0	0	0	0	1
Metastatic tumors	MM090	Yes	0	1	NT	NT	0	0
Metastatic tumors	MM037	No	1	0	NT	NT	0	0
Metastatic tumors	MM063	No	1	0	NT	NT	0	0
Metastatic tumors	MM072	No	1	0	NT	NT	0	0
Metastatic tumors	MM076	No	1	0	NT	NT	0	UD
Metastatic tumors	MP049	No	0	1	NT	NT	0	1
Metastatic tumors	MP101	No	1	0	NT	NT	0	0
Metastatic tumors	MM025	No	1	0	NT	NT	0	1

Table 2: Mutational status observed in patient's tumors according to their ability to grow into mice

	Primary tumors		Metastatic tumors		All tumors		p
	+	-	+	-	+	-	
<i>In vivo</i> growth							/
N	22	19	4	7	26	26	/
GNAQ	5 (23%)	12 (63%)	1 (25%)	6 (86%)	6 (23%)	18 (69%)	< 10⁻³
GNA11	13 (59%)	6 (32%)	2 (50%)	1 (14%)	15 (58%)	7 (27%)	< 0.05
BAP1	9 (45%)	7 (37%)	1 (25%)	2 (29%)	10 (38%)	9 (35%)	NS

NS, not significant.

Table 3: Mutation screening of established models

	Mutations detected in				Mutations detected in		
	GNAQ	GNA11	BAP1		GNAQ	GNA11	BAP1
MP034				MP071			
Primary tumor	0	1	0	Primary tumor	1	0	0
p1	UD	UD	0	p1	1	0	0
p4	0	1	0	p4	1	0	0
p9	0	1	0				
MP038				MP077			
Primary tumor	1	0	1	Primary tumor	0	1	0
p1	1	0	1	p1	0	1	0
p4	1	0	1				
p105	1	0	0	MP080			
MP041				Primary tumor	0	1	0
Primary tumor	0	1	0	p1	0	1	0
p1	0	1	0	p4	0	1	0
p4	0	1	0				
p67	0	1	0	MM026			
MP042				Metastatic tumor	1	0	0
Primary tumor	0	1	1	p1	1	0	0
p1	0	1	1	p4	1	0	0
p4	0	1	1	p9	1	0	0
MP046				MM033			
Primary tumor	0	0	0	Metastatic tumor	1	0	0
p1	0	0	0	p1	1	0	0
MP047				p4	1	0	0
Primary tumor	0	1	1	MM052			
p1	0	1	1	Metastatic tumor	0	0	1
p4	UD	UD	1	p1	0	0	1
p34	0	1	0	p4	0	0	1
MP055				MM066			
Primary tumor	0	1	1	p1	0	1	0
p1	0	1	1	p4	0	1	0
p4	0	1	1	p9	0	1	0
MP065				MM074			
Primary tumor	0	1	1	Metastatic tumor	0	1	1
p1	0	1	1	p1	0	1	1
p4	0	0	1	p4	0	1	1
p70	0	1	0	p38	0	1	0

UD: undetermined

Table 4: Differentially expressed genes between patient's tumors and corresponding xenografts (P1 and P4)

FDR 1%	22517 genes (all genes)			17637 genes [°]		
	Total	Up in P	Up in X	Total	Up in P	Up in X
Pts / P1	698 (3,10%)	485 (2,15%)	213 (0,95%)	174 (0,99%)	103 (0,58%)	71 (0,40%)
Pts / P4	769 (3,42%)	436 (1,94%)	333 (1,48%)	248 (1,41%)	102 (0,58%)	146 (0,83%)
P1 / P4	0	0	0	0	0	0

[°] Genes belonging to the immune system, extracellulaire matrix and angiogenesis have been removed from the analysis.

Abbreviations: P, patients; X, xenografts.

Table 5: Enrichment analysis of genes list from differential analysis

	Comparisons		Biological process category (p < 0.01)
22517 studied genes	Patients v xenografts P1	P > X1 (485 genes)	Immune response (47/263) Inflammatory response (45/276) Cell motility (42/495) Cell matrix adhesion (16/120) Cell-cell adhesion (17/145) Blood vessel development (27/328)
		P < X1 (213 genes)	Nucleoside-triphosphate activity (21/726) Protein serine/threonine kinase activity (14/424) Kinase activity (18/765) Damage DNA binding (4/47)
	Patients v xenografts P4	P > X4 (436 genes)	Immune response (39/263) Inflammatory response (42/292) Hematopoietic or lymphoid organ development (26/339) Blood vessel development (23/328)
		P < X4 (333 genes)	M phase (24/347) Organelle fission (22/286) Cell cycle process (32/613) Mitotic cell cycle (27/456)
17637 studied genes	Patients v xenografts P1	P > X1 (103 genes)	Cell Motility (8/422)
		P < X1 (71 genes)	Cell division (12/333) Cell cycle process (14/573) Mitotic cell cycle (13/453)
	Patients v xenografts P4	P > X4 (102 genes)	Actin cytoskeleton organization (5/266)
		P < X4 (146 genes)	Cell cycle process (12/609) Chromosome organization (9/464) Transmembrane transport (10/597) Cell division (7/333) Nuclear division (6/262)

Abbreviations: P, patients; X, xenografts.

Table 6S: Primer sequences for detection of BAP1 mutations

Primer ID	Sequence	Forward / Reverse	Exon
1732	TTGTCTGTGTGTGGGACTGA	F	Exon 1-2
1683	CTGCGATGAGGAAAGGAAAG	R	Exon 1-2
1733	TCGGTAAGAGCCTTTTCTCC	F	Exon 3
1685	GGCTGCTACAAAAAGGGAAG	R	Exon 3
1734	ATCACAGCAAGGACACCTGA	F	Exon 4
1687	CCCTTCTCAGCTCCTTTCAT	R	Exon 4
1735	GCAAAGATGAAAGGAGCTGA	F	Exon 5
1689	CCGCAACTGCATCTAAAAAC	R	Exon 5
1736	CCCACCAGCCTTTTAAGAAA	F	Exon 6-7
1692	GGCAATATGGTGTAGGGTGA	R	Exon 6-7
1738	GGGTTTCACCCTACACCATATT	F	Exon 8
1696	TGGTACCTTCCAACAAGCTG	R	Exon 8
1739	TTCCAGATAGGCCCTCATA	F	Exon 9
1698	GGGCAAAGAAAAGATGTGGT	R	Exon 9
1740	TCCCTGTGAGTGAATGGGTA	F	Exon 10
1700	ACAGGTGCCTTTCTTTAGGG	R	Exon 10
1741	AGAGCTTGCTGACTCCCATT	F	Exon 11
1702	AGGATGAACACCAAGGAACC	R	Exon 11
1742	CGCTGACTCAGTCTGGAAAA	F	Exon 12
1704	CGCAGGTGCTCAACATTATC	R	Exon 12
1743	GGCTTAGCATGGCTAGTTCA	F	Exon 13a
1706	TCCTCTCCAAAAGCACCTT	R	Exon 13a
1744	TCCAGAAGGACCTCTCAAT	F	Exon 13b
1708	TGGGAAGAGAGGTCACAAGA	R	Exon 13b
1745	AAGGTGCTTTTTGGAGAGGA	F	Exon 14
1710	GAAAGTCTTCTGGCACATGG	R	Exon 14
1746	CCATGTGCCAGAAGACTTTC	F	Exon 15-16
1712	AAGAGGTAGAGACCCTTGAGCA	R	Exon 15-16
1748	CGCTGCTGTCTTAACTGGAA	F	Exon 17
1717	TCTCCAGCTGGGACTATTCA	R	Exon 17

Figure 1: Chromosomal alterations observed in our dataset of 42 samples.

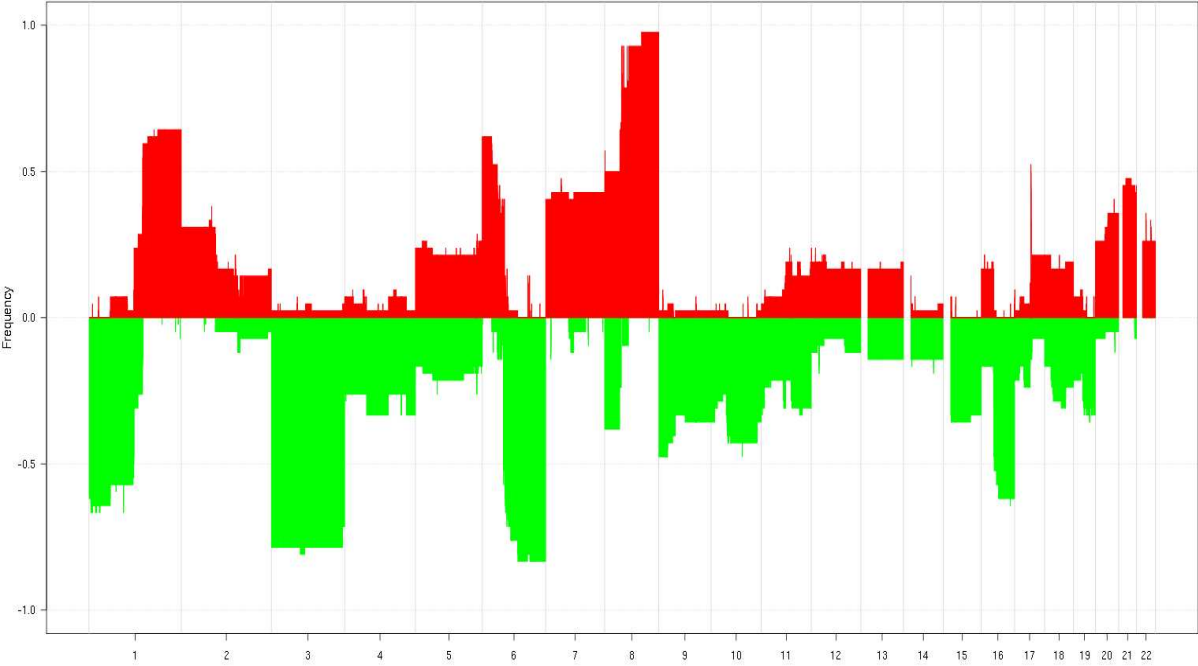


Figure 2: A. Comparison between genomic alterations observed in patients, and xenografts passage 1 and passage 4.

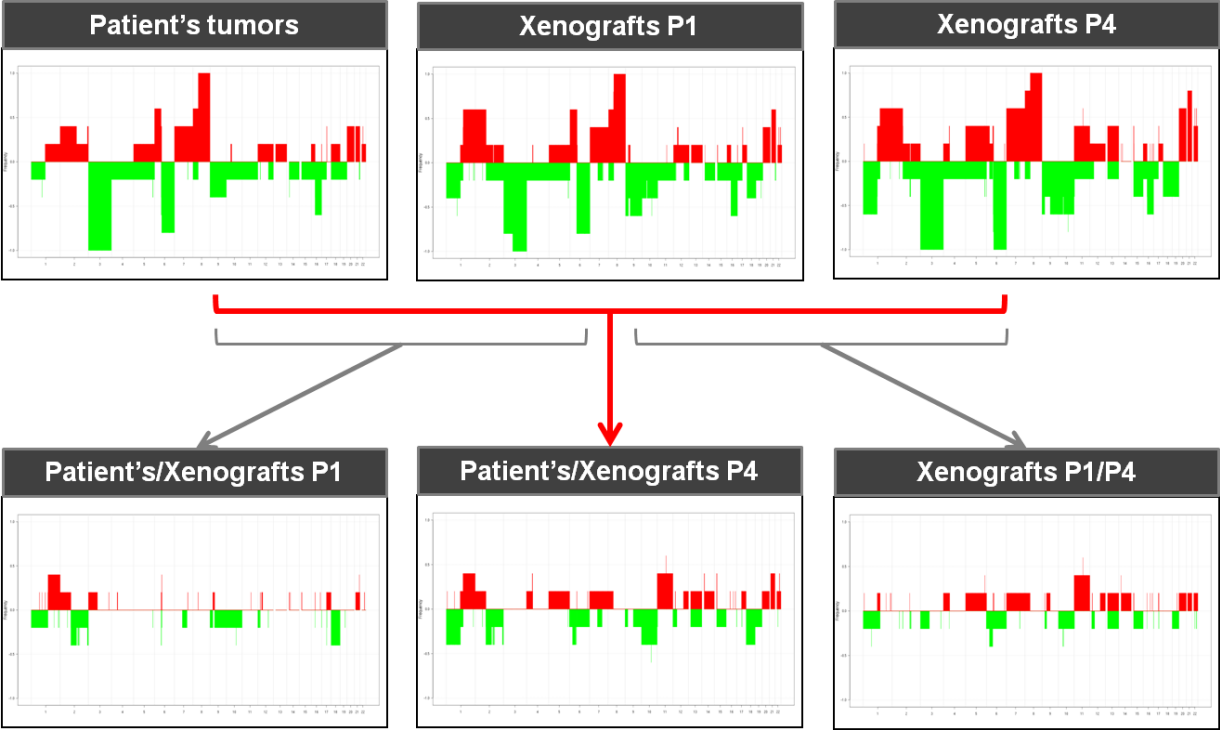


Figure 2: B. Example of the MM026 model.

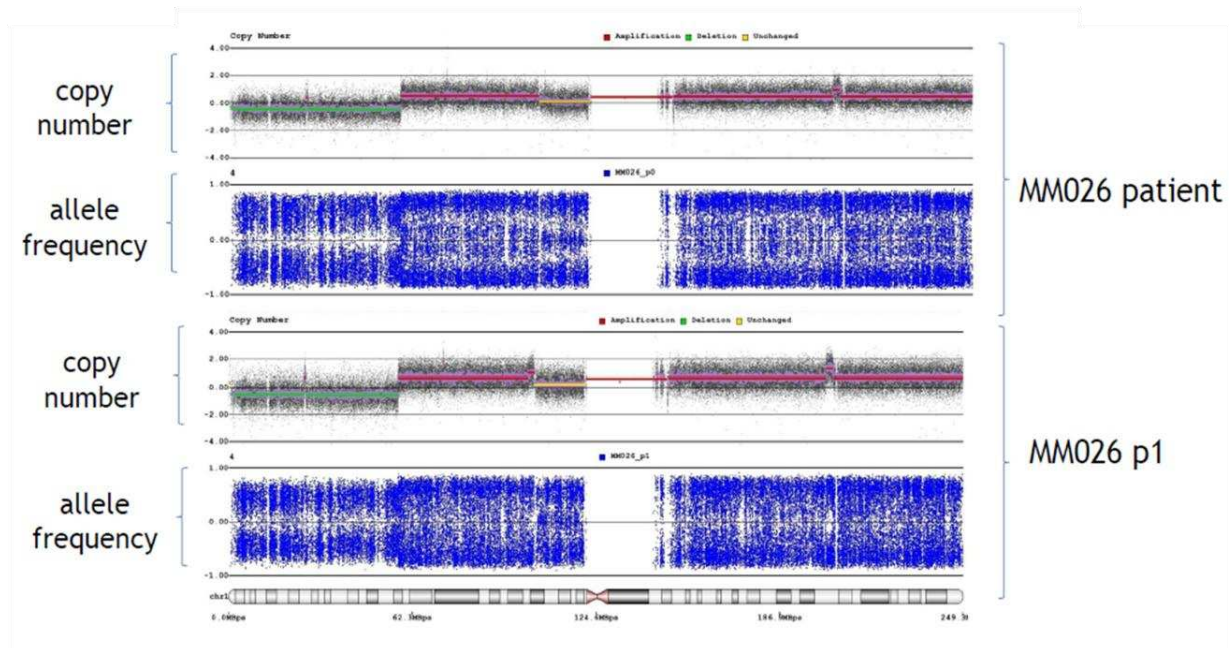


Figure 2: C. Example of the MM066 model.

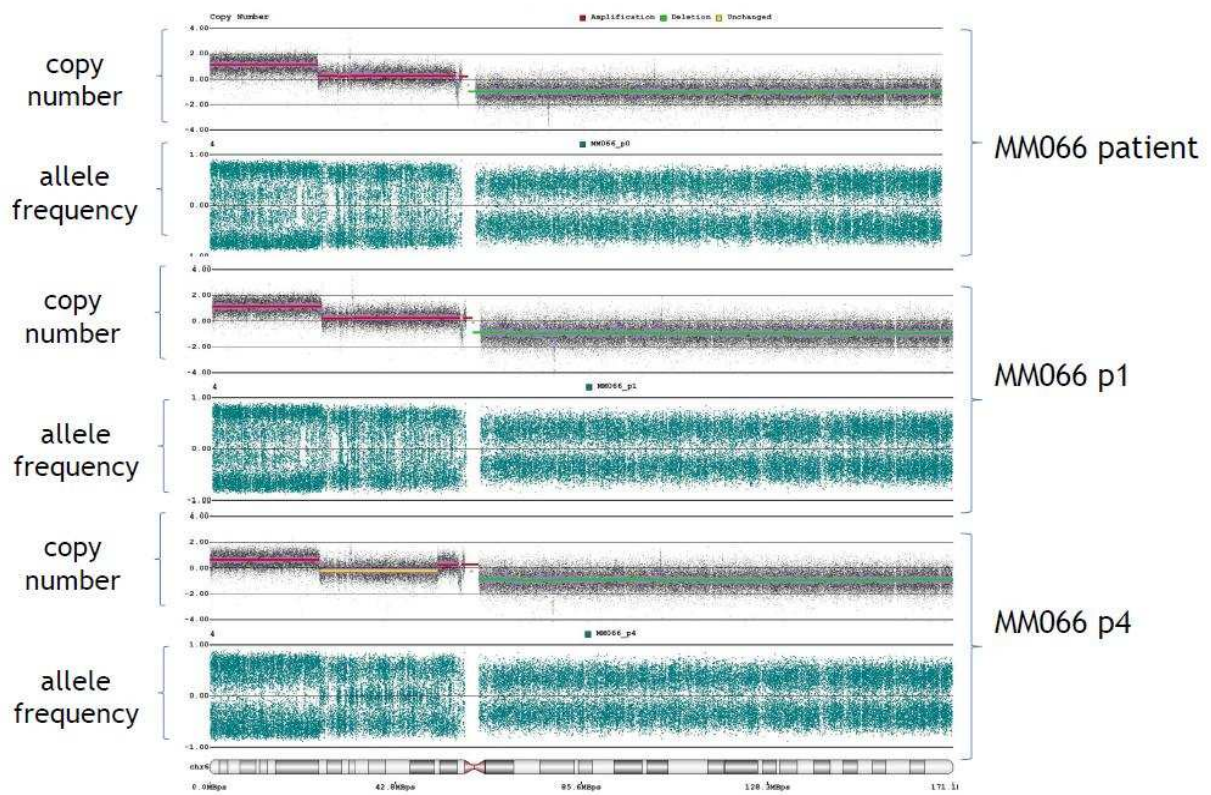


Figure 2: D. Comparison between genomic alterations observed in patient, and xenografts passage 9. Genomic alterations are observed in 4 paired models.

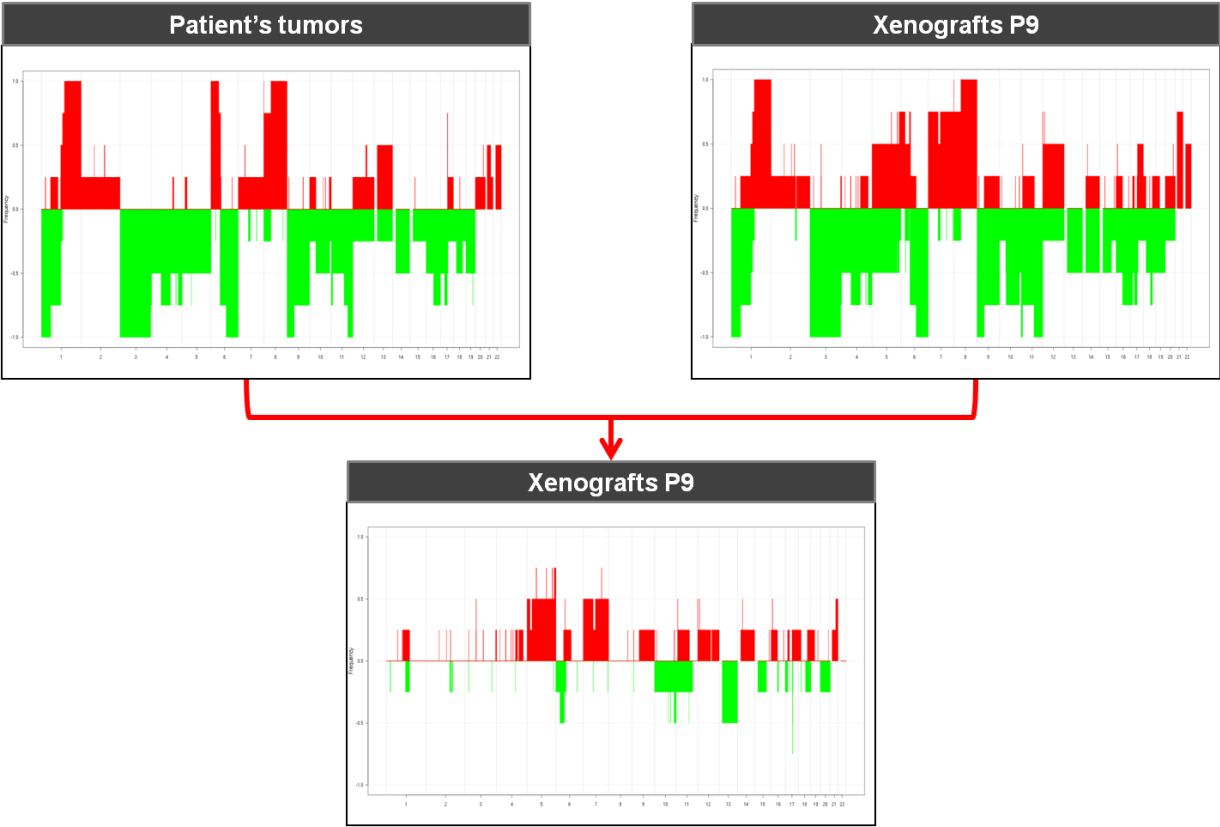


Figure 2: E. Comparison between genomic alterations observed in patients and xenograft-derived cell lines. Genomic alterations are observed in 5 paired models.

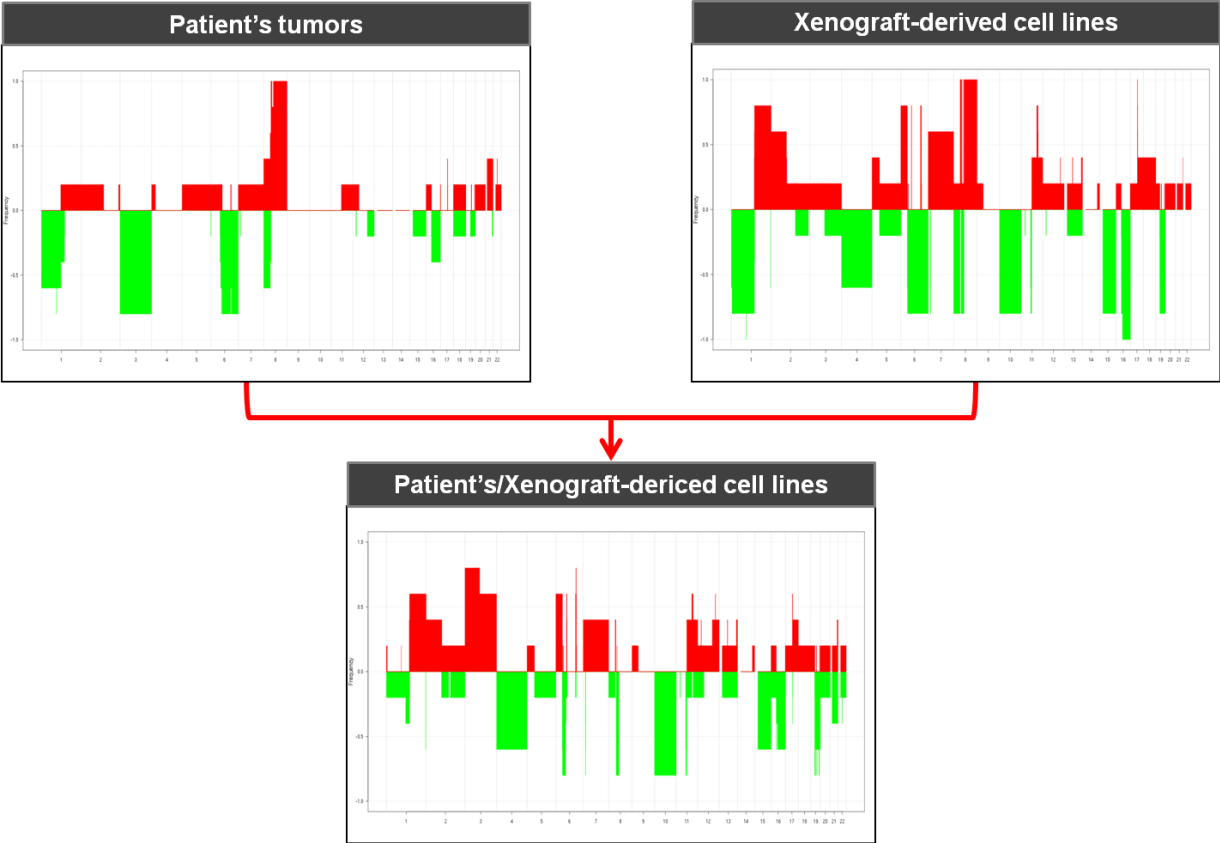


Figure 3: A. Correlation on smoothing copy number between all samples divided per models.

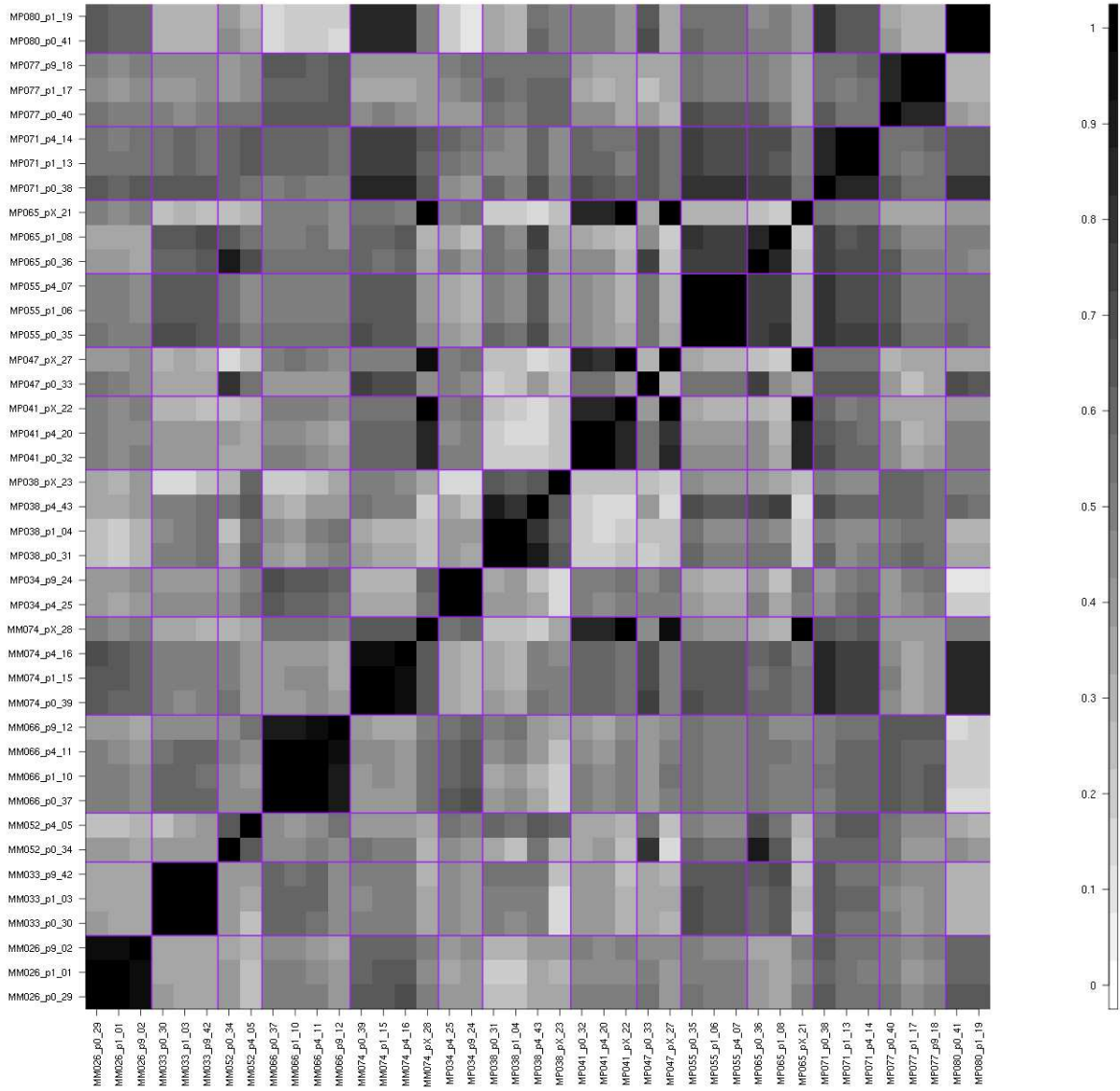


Figure 4: A. Hierarchical clustering of paired patients' tumors and passages 1 and 4 of corresponding xenografts.

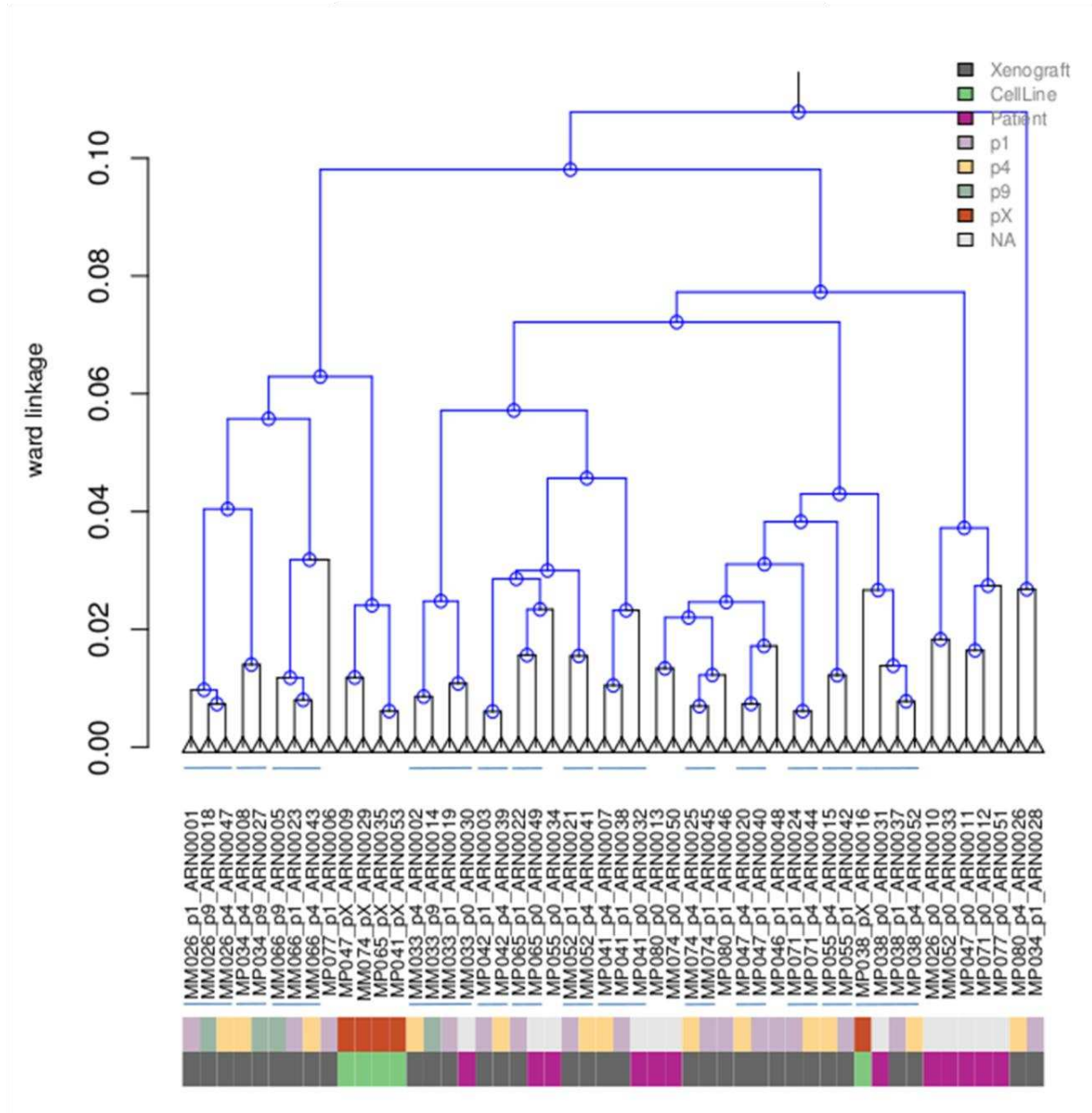


Figure 4: B. Hierarchical clustering of paired patients' tumors and passages 1 and 4 of corresponding xenografts for selected 17637 genes.

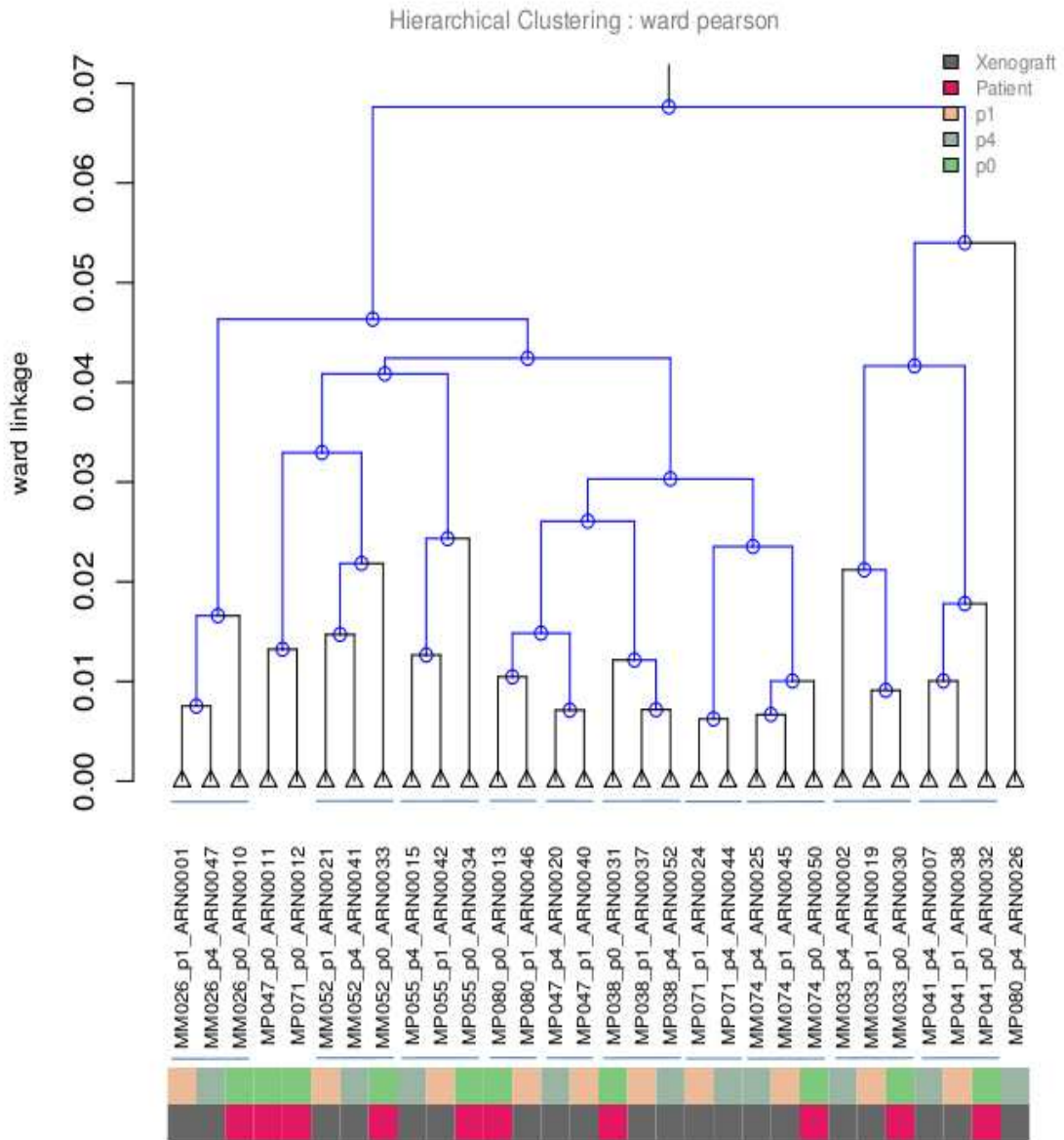


Figure 5: A. Expression of the 12 genes of the ONKEN signature (Onken 2007) in all studied tumor samples.

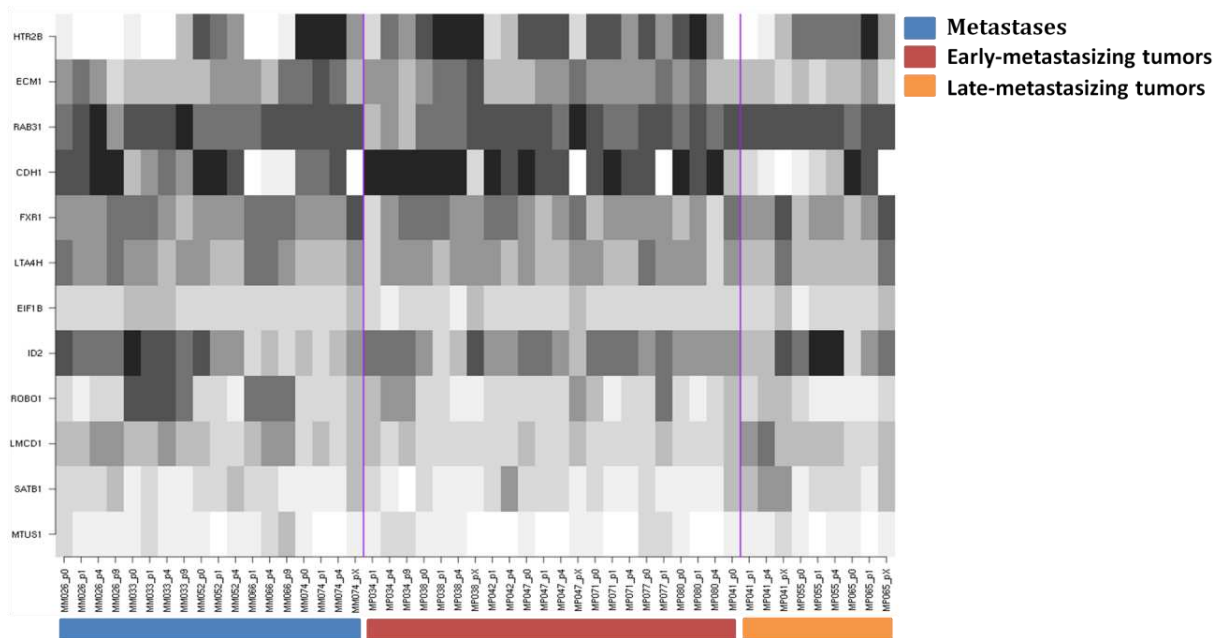


Figure 5: B. Correlation between BAP1 mutation and BAP1 gene expression.

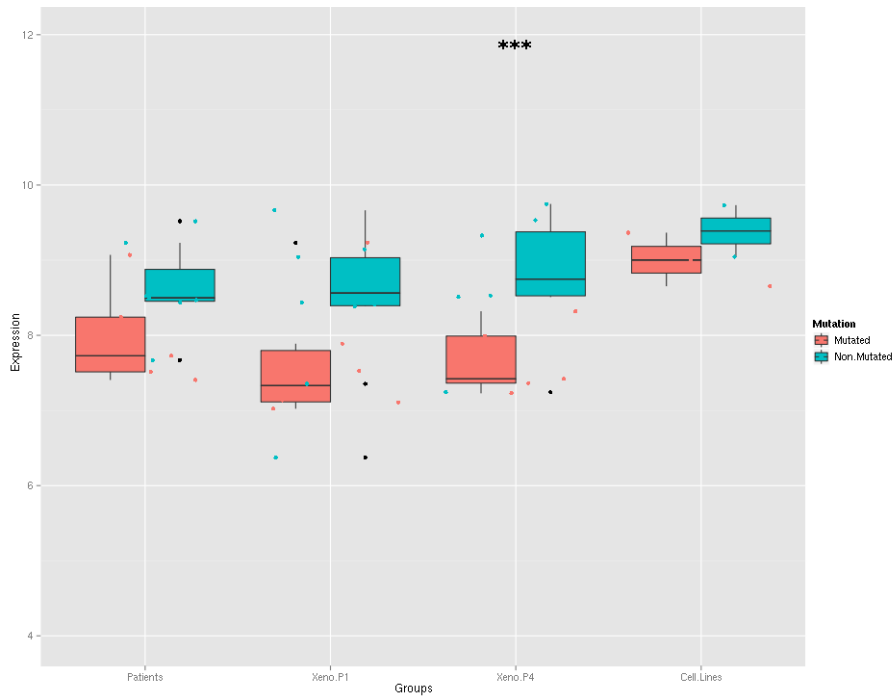


Figure 6: Differential expression of MAPK genes between patient's tumors and P4 xenografts

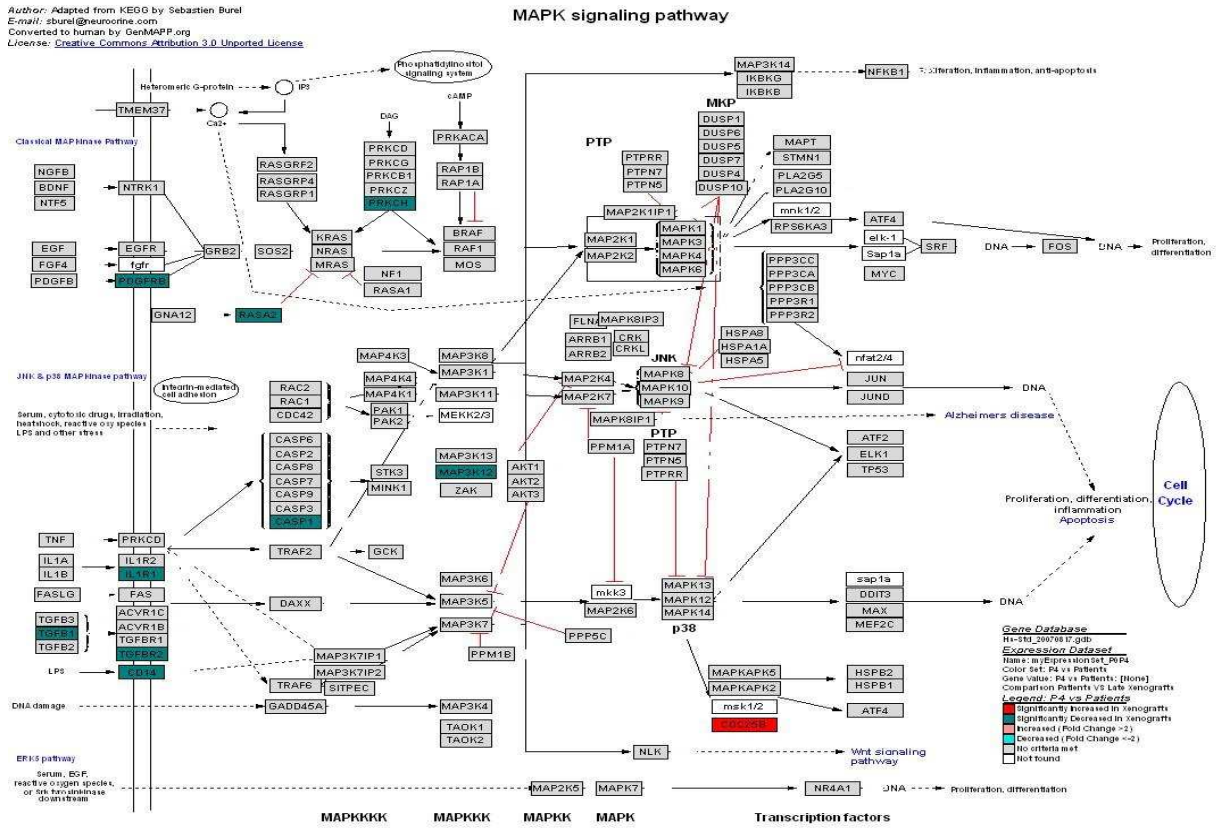
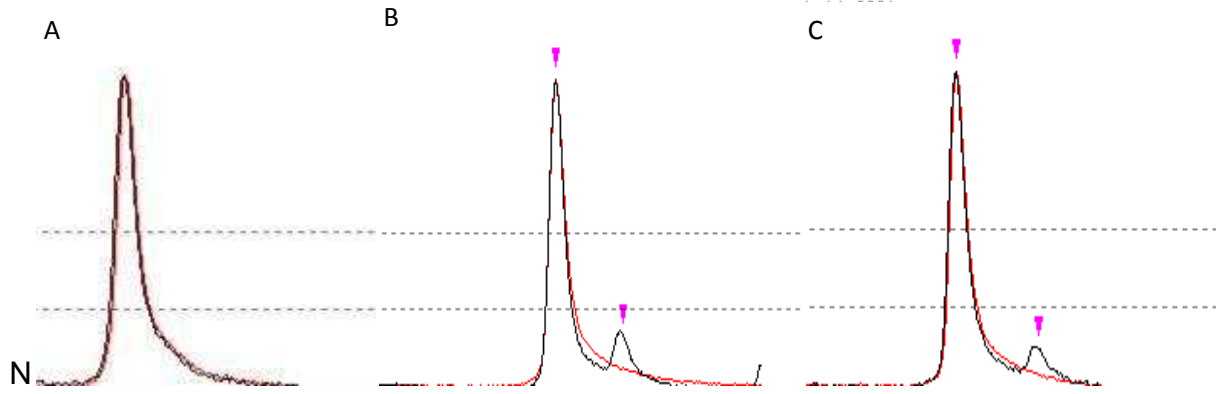


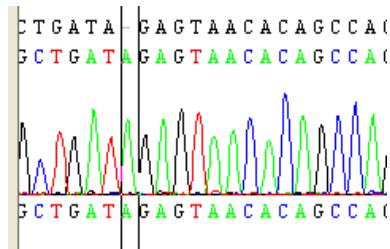
Figure 7S: Detection and validation of BAP1 mutation by EMMA method



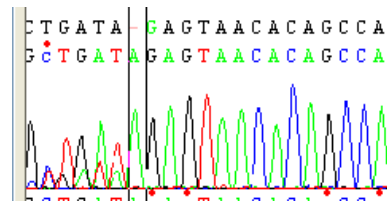
Reference sequences of BAP1 exon 10

Summary	CTGATAAGAGTAACACAGCCAC
NT Variants
Index	1 11 21
Reference	ctgataagagtaaacacagccac
Reference-AA	A D K S N T A

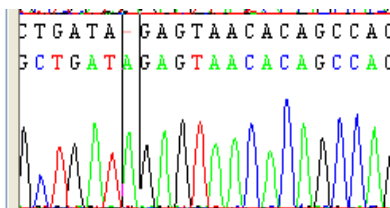
Metastatic tumor



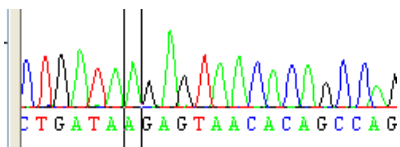
MM074, p4



MM074, p1



MM074, derived cell line (p38)



7.3 Conclusion

L'ensemble du travail réalisé sur les modèles animaux mis en place au sein du laboratoire d'investigation préclinique de l'institut Curie a permis de caractériser de manière approfondie ces données.

Ces analyses ayant pour but de comparer les tumeurs des patients et les xénogreffes associées ainsi que les différents passages d'un même modèle entre eux, ont montré une bonne concordance et une bonne stabilité.

Les résultats issus des données protéiques ne sont pas encore disponibles, cependant pour l'ensemble des autres données, les xénogreffes sont en adéquation avec les tumeurs des patients.

D'un point de vue histologique, sur les 16 modèles établis, pour 15 d'entre eux le type cellulaire observé chez les patients est conservé dans les xénogreffes. Parmi ces 15 modèles, 3 présentent une cellularité mixte chez les patients et deviennent épithélioïde chez les souris suggérant une sélection de ce type de cellules pour permettre la croissance de la tumeur (le type épithélioïde étant associé à un plus mauvais pronostic chez les patients).

La recherche d'antigènes tumoraux montre une bonne concordance de leur expression chez les xénogreffes par rapport aux patients d'origine.

Les analyses génomiques montrent une très bonne corrélation entre les profils des patients et les xénogreffes associées. Les altérations observées dans les tumeurs humaines sont retrouvées dans les différents passages chez les souris. Parmi les différences observées, pour une grande partie d'entre elles, les profils sont plus nets chez les souris par rapport aux patients reflétant une sélection d'un contingent cellulaire lors de l'établissement des modèles.

Les analyses transcriptomiques montrent que les gènes différentiellement exprimés entre les patients et les xénogreffes sont principalement des gènes du système immunitaire ou de la matrice extracellulaire humaine qui sont perdus chez les souris. Une fois ces gènes exclus, on observe une bonne concordance entre les différents échantillons dans les modèles. L'analyse de nos données ne montre aucune différence entre les passages chez les souris suggérant une très bonne stabilité des modèles.

L'analyse des données protéomiques nous permettra de valider si les voies de signalisations activées chez les patients sont également les mêmes dans les modèles murins. En effet, au niveau ARN, les niveaux d'expression de gènes clés dans la voie MAP kinases par exemple ne sont pas différents entre les patients et les xénogreffes, mais connaître leur état de phosphorylation permettra une meilleure caractérisation des modèles car l'activation de ces voies s'effectue principalement par phosphorylation / déphosphorylation.

Les xénogreffes répondent différemment aux composés chimiques testés ce qui permet d'avoir, de façon similaire aux patients, un jeu de données hétérogènes.

Le laboratoire d'investigation préclinique a donc mis en place le plus gros ensemble de modèles murins pour cette pathologie avec une caractérisation très importante des données. Cette étude permet de s'assurer que les modèles créés sont de bons modèles représentatifs de la pathologie et peuvent donc être utilisés en préclinique pour tester de nouvelles molécules dans le traitement du mélanome de la choroïde.

Chapitre 8

Analyse de données haut débit

8.1 Introduction

La reproductibilité des analyses est un problème récurrent dans le traitement des données haut débit. Le choix dans les méthodes de pré-traitement et d'analyse joue un rôle important dans les résultats obtenus ainsi que dans leur stabilité. Afin d'homogénéiser nos données et aider à la reproductibilité, il est important de définir une stratégie d'analyse.

En dehors du travail d'analyse effectué sur le mélanome de la choroïde, j'ai donc participé au travail de réflexion méthodologique mené par l'équipe de biostatistique de l'unité de bioinformatique U900. Nous avons pour cela défini parmi les différents outils disponibles pour l'analyse de données de puces à ADN, les méthodes les plus adaptées ainsi que les paramètres à appliquer.

La stratégie d'analyse présentée est la suivante : La suppression du bruit et des biais systématiques est réalisée en utilisant les techniques les plus réputées pour la normalisation des biopuces Affymetrix. Les données sont ensuite filtrées pour réduire le bruit et également augmenter la puissance des tests statistiques. Les approches exploratoires sont basées sur les méthodes classiques de classifications et sont associées à des représentations graphiques simples. Différentes approches supervisées sont également proposées pour mettre en évidence des gènes d'intérêt et pour finir l'enrichissement fonctionnel de ces données est évalué selon le package *GOSat*.

Ce travail a fait l'objet du développement d'un package R mis à disposition de la communauté scientifique dans le répertoire des packages R <http://cran.r-project.org/web/packages/EMA/index.html> et sur le site de la plateforme de bioinformatique de l'Institut Curie <http://bioinfo.curie.fr/projects/ema/>.

8.2 Résultats

PUBLICATION

« EMA - A R package for Easy Microarray data analysis »

Servant N, Gravier E, Gestraud P, **Laurent C**, Paccard C, Biton A, Brito I, Mandel J, Asselain B, Barillot E, Hupé P. (2010) *BMC Research Notes*. 3 :277-280

RESUME EN FRANÇAIS

Le nombre de méthodes et d'outils disponibles pour l'analyse de données de puces à ADN augmente régulièrement et peut être source de confusion chez les utilisateurs non spécialistes.

Basé sur l'expérience des biostatisticiens de l'Institut Curie, nous avons proposé une stratégie d'analyse et une sélection d'outils pour étudier les données de puces à ADN. Les fonctions R les plus utilisées et les plus pertinentes ont été discutées, validées et réunies dans un package R facile d'utilisation. EMA est dédié à l'analyse des données issues de puces à ADN. Les fonctions ont été développées afin d'être simple d'utilisation, afin d'améliorer la visualisation des données et aider l'interprétation des résultats.

La stratégie et les outils proposés dans le package R EMA peuvent fournir un point de départ utile pour de nombreux utilisateurs de données de puces à ADN. EMA est disponible sur le site du CRAN (Comprehensive R Archive Network) ainsi que sur le site <http://bioinfo.curie.fr/projects/ema/>.

TECHNICAL NOTE

Open Access

EMA - A R package for Easy Microarray data analysis

Nicolas Servant^{1,2,3*†}, Eleonore Gravier^{1,2,3,4†}, Pierre Gestraud^{1,2,3}, Cecile Laurent^{1,2,3,6,7,8}, Caroline Paccard^{1,2,3}, Anne Biton^{1,2,3,5}, Isabel Brito^{1,2,3}, Jonas Mandel^{1,2,3}, Bernard Asselain^{1,2,3}, Emmanuel Barillot^{1,2,3}, Philippe Hupé^{1,2,3,5}

Abstract

Background: The increasing number of methodologies and tools currently available to analyse gene expression microarray data can be confusing for non specialist users.

Findings: Based on the experience of biostatisticians of Institut Curie, we propose both a clear analysis strategy and a selection of tools to investigate microarray gene expression data. The most usual and relevant existing R functions were discussed, validated and gathered in an easy-to-use R package (EMA) devoted to gene expression microarray analysis. These functions were improved for ease of use, enhanced visualisation and better interpretation of results.

Conclusions: Strategy and tools proposed in the EMA R package could provide a useful starting point for many microarrays users. EMA is part of Comprehensive R Archive Network and is freely available at <http://bioinfo.curie.fr/projects/ema/>.

Findings

Numerous analysis methods and tools have been developed to study microarray, many of them being implemented as free R [1] and/or Bioconductor [2] packages. This abundance of methods makes choosing the best approach difficult for newcomers and non-specialist users.

Based on the experience of the biostatisticians of Institut Curie, we propose a clear analysis strategy combining a large variety of standard methodologies. The most usual and relevant R functions needed to perform these analyses were selected and gathered in the R package EMA (Easy Microarray data Analysis). EMA covers an entire analysis process including quality control, normalisation, exploratory analysis, unsupervised and supervised classification, functional analysis and censored data exploration. The package can be used for both one or two-colours gene expression micrarrays and for exon expression experiments.

Analysis strategy

Firstly, the quality of the data must be assessed in order to detect problematic raw probe-level data, such as spatial artifacts on the chip or poor quality hybridisation. Indeed, gene expression experiments suffer from many sources of technical and experimental variation. Removing noise and systematic biases is performed in order to both improve the biological signal and make all the arrays comparable. This is the so-called normalisation step. Secondly, we propose to discard the probesets with very low signal across the samples (*i.e.* genes unexpressed or below detection threshold). This filtering step leads to both a noise reduction in the data and an increase in the statistical power of the subsequent analysis.

Then, exploratory approaches are classically used to find clusters of genes (or samples) with similar profiles. Note that here, biological interpretation depends on the choice of the similarity metrics. These approaches potentially highlight outliers and/or non relevant effects (batch effect for example), which can be subsequently estimated and/or removed from the data thanks to appropriate methods.

Finally, supervised approaches aim at the identification of differentially expressed genes (DEG), or deregulated

* Correspondence: Nicolas.Servant@curie.fr

† Contributed equally

¹Institut Curie, Paris F-75248, France

Full list of author information is available at the end of the article

pathways by taking into account the multiple testing issues. The biological interpretation of the differential analysis results can be performed thanks to functional and gene set enrichment analyses. Sample class prediction (eg good vs poor clinical outcome) based on supervised classification methods can also be performed to highlight genes signatures.

Selected tools

For the data quality assessment, we recommend to use the `arrayQualityMetrics` package [3], which performs a powerful, easy-to-use and comprehensive data quality estimation as well as an automatic html report. The EMA package proposes the most famous techniques for Affymetrix GeneChip normalisation: MAS5.0 [4], RMA [5] and GCRMA [6]. We recommend to use GCRMA because it outperforms the other approaches (by ignoring the mismatch intensities and taking into account the probe sequence information) and allows an efficient filtering of irrelevant probesets thanks to its bimodal distribution of probesets expression values (Figure 1a). Other packages such as `limma` [7], `vsn` [8] or `lumi` [9] can be used to normalise non Affymetrix data. After this first step, the main EMA functions can be used for any type of expression data, using a simple data expression matrix as input.

The EMA package provides functions to perform exploratory analyses such as Principal Component Analysis (PCA, Figure 1b), hierarchical clustering (Figure 1c) or Multiple Factor Analysis. They are based on R packages such as `FactoMineR` [10], `cluster` [11], or `multclust` [12]. The use of linear model is proposed to estimate and to remove the non relevant effects potentially detected.

Various methods are proposed to perform differential analysis and their choice depends on the sample size. The `multtest` package provides standard approaches like Student or Mann-Whitney test associated with multiple testing correction methods. The Significance Analysis of Microarrays (SAM) approach [13] (`siggenes` package) is also very interesting because it both estimates the null distribution and takes into account the correlation between probesets (Figure 1d). The rank product method [14] (`RankProd` package) dedicated to small sample size dataset is also offered, as well as some linear model (ANOVA) functions. Alternatively, the user can apply the `limma` package which is a very powerful tool to assess differential expression by linear models.

The functional enrichment of the DEG list is assessed based on the GeneOntology [15], and KEGG [16] pathways annotation terms. The hyper-geometric test of the `GOstats` package is used to test the over-representation of the functional terms in the gene list.

For sample class prediction, we suggest to use the CMA package [17] including the most popular machine learning and gene selection algorithms. In the context of censored data, the EMA package supports Kaplan Meier and log-rank analyses using the survival package.

Example

The proposed analysis strategy was applied to the breast cancer gene expression dataset [18] comparing 12 Basal-like carcinomas (BLCs) and 11 HER2 positive carcinomas (HER2+). Some graphical outputs for data preprocessing, exploratory analysis and differential analysis steps are displayed in Figure 1. The RNA profiles were analysed using U133 plus 2.0 Affymetrix GeneChip. Three genes (*P-cadherin*, *v-kit*, *FOXC1*) were reported by the authors to be associated to a genes cluster over-expressed in the basal-like carcinomas and three genes (*PTEN*, *Her2* and *GRB7*) to a genes cluster over-expressed in the Her2+ carcinomas. All these genes but one (*v-kit*) were found to be differentially expressed using the EMA package. This discrepancy is easily explained because in spite of *v-kit* belongs to a basal-like expression cluster, no change in *v-kit* expression can be observed between the two groups in this clustering analysis. This is because the hierarchical clustering was performed on genes (such as *v-kit*) not necessary differentially expressed between the two populations.

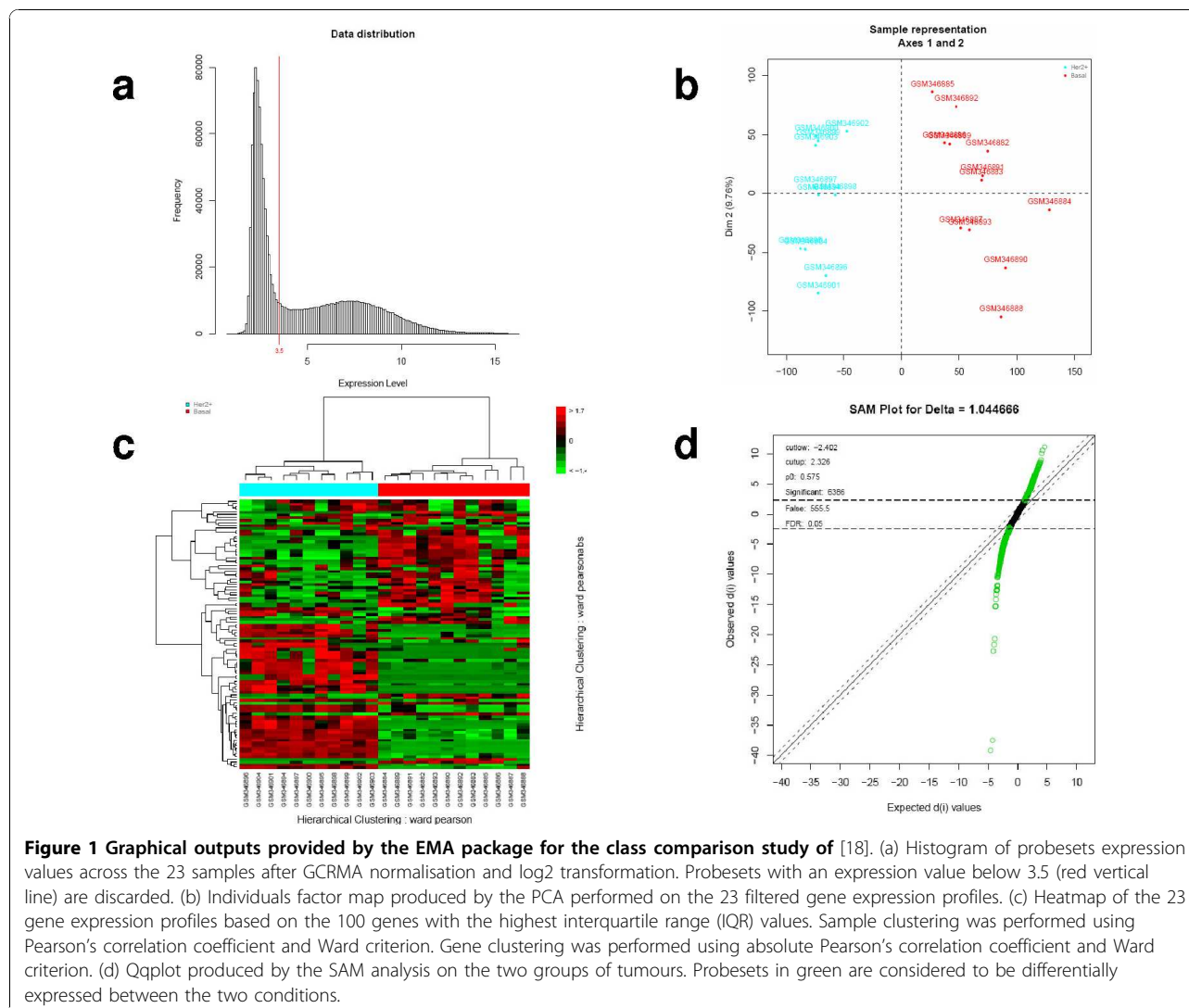
The R scripts used to analyse this gene expression dataset can be found in [Additional file 1]. Transcriptional data used in this application are publicly available at Gene Expression Omnibus (Accession number: [GSE13787]) and are part of the package.

Conclusions

EMA is a freely available R package which implements a complete strategy for expression microarray analysis. The package includes a vignette [Additional file 2] which describes the detailed biological/clinical analysis strategy used at Institut Curie. Most of the functions were improved for ease of use (fewer command lines, default parameters tested and chosen to be optimal). Relevant, enhanced and easy-to-interpret text and graphic outputs are offered. The package is available on The Comprehensive R Archive Network repository [19].

Availability and requirements

- Project Name: EMA
- Project home page:
<http://bioinfo.curie.fr/projects/ema/>
<http://cran.r-project.org/>
- Operating systems: Linux, Windows
- Programming language: R
- Other requirements: R version ≥ 2.10 . R packages: `cluster`, `Hmisc`, `heatmap.plus`, `FactoMineR`, `GOstats`,



survival, multtest, affy, gcrma, rgl, GSA, RankProd, siggenes, MASS, hgu133plus2.db, xtable, biomaRt.

- License: GNU GPL
- Any restrictions to use by non-academics: none

Additional material

Additional file 1: R scripts applied to the breast cancer gene expression dataset [18]. R script used to analyse the breast cancer gene expression data set [18].

Additional file 2: EMA vignette. The vignette discuss the detailed biological/clinical analysis strategy used at Institut Curie and presents an application to a gene expression dataset.

Acknowledgements

We thank all the persons from the ABCIS methodology group for their collaboration and fruitful discussions. This work was supported by a grant from the Institut Curie "Programmes incitatifs et coopératifs Bioinformatique

et Biostatistique". EB and PH are members of the team Systems Biology of Cancer "équipes labellisées par la Ligue Nationale Contre le Cancer".

Author details

¹Institut Curie, Paris F-75248, France. ²INSERM, U900, Paris F-75248, France. ³Ecole des Mines ParisTech, Fontainebleau, F-77300 France. ⁴Institut Curie, Departement de Transfert, Paris F-75248, France. ⁵CNRS, UMR144, Paris F-75248, France. ⁶CNRS, UMR3347, Orsay F-91405, France. ⁷INSERM, U1021, Orsay F-91405, France. ⁸Université Paris-Sud 11, Orsay F-91405, France.

Authors' contributions

NS and EG discussed the choice of the strategy and tools, participated to the development of the EMA package and wrote the paper. PG, CL, CP, AB, IB, JM discussed the choice of the strategy and tools and participated to the development of the EMA package. BA, EB and PH discussed the choice of the strategy and tools and supervised the work group. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 15 July 2010 Accepted: 3 November 2010
 Published: 3 November 2010

References

1. R Development Core Team: **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2009 [http://www.R-project.org], [ISBN 3-900051-07-0].
2. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J: **Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics**. *Genome Biol* 2004, **5**:R80.
3. Kauffmann A, Gentleman R, Huber W: **arrayQualityMetrics-a bioconductor package for quality assessment of microarray data**. *Bioinformatics* 2009, **25**:415-6.
4. **Statistical Algorithms Description Document**. [http://www.affymetrix.com/support/technical/whitepapers.affx].
5. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP: **Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data**. *Biostatistics* 2003, **4**:249-64.
6. Wu Z, Irizarry R, Gentleman R, Martinez-Murillo F, Spencer F: **A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays**. *Journal of the American Statistical Association* 2004, **99**(468):909-917.
7. K SG, P ST: **Normalization of cDNA microarray data**. *Methods* 2003, **31**:265-273.
8. A HWHASHP, M V: **Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression**. *Bioinformatics* 2002, **18**:S96-S104.
9. Du P LS, Kibbe WA: **Lumina pipeline for processing Illumina microarray**. *Bioinformatics* 2008, **24**:1547-1548.
10. Lê S, Josse J, Husson F: **FactoMineR: an R package for multivariate analysis**. *Journal of statistical software* 2008, **25**:1-18.
11. Kaufman L, Rousseeuw P: *Finding groups in data - An introduction to cluster analysis* New York: John Wiley & Sons; 1990.
12. Bertoni A, Valentini G: **Model order selection for bio-molecular data clustering**. *BMC Bioinformatics* 2007, **8**(Suppl 2):S7.
13. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: **Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:5116-21.
14. Hong F, Breitling R, McEntee CW, Wittner BS, Nemhauser JL, Chory J: **RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis**. *Bioinformatics* 2006, **22**:2825-7.
15. Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, Eilbeck K, Lewis S, Marshall B, Mungall C, Richter J, Rubin GM, Blake JA, Bult C, Dolan M, Drabkin H, Eppig JT, Hill DP, Ni L, Ringwald M, Balakrishnan R, Cherry JM, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engel S, Fisk DG, Hirschman JE, Hong EL, Nash RS, Sethuraman A, Theesfeld CL, Botstein D, Dolinski K, Feierbach B, Berardini T, Mundodi S, Rhee SY, Apweiler R, Barrell D, Camon E, Dimmer E, Lee V, Chisholm R, Gaudet P, Kibbe W, Kishore R, Schwarz EM, Sternberg P, Gwinn M, Hannick L, Wortman J, Berriman M, Wood V, de la Cruz N, Tonellato P, Jaiswal P, Seigfried T, White R: **The Gene Ontology (GO) database and informatics resource**. *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:D258-61.
16. Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M: **KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**. *Nucleic Acids Res* 1999, **27**:29-34.
17. Slawski M, Daumer M, Boulesteix AL: **CMA: a comprehensive Bioconductor package for supervised classification with high dimensional data**. *BMC Bioinformatics* 2008, **9**:439.
18. Marty B, Maire V, Gravier E, Rigault G, Vincent-Salomon A, Kappler M, Lebigot I, Djelti F, Tourdes A, Gestraud P, Hupe P, Barillot E, Cruzalegui F, Tucker GC, Stern MH, Thiery JP, Hickman JA, Dubois T: **Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells**. *Breast Cancer Res* 2008, **10**:R101.
19. **The Comprehensive R Archive Network**. [http://cran.r-project.org/].

doi:10.1186/1756-0500-3-277

Cite this article as: Servant et al.: **EMA - A R package for Easy Microarray data analysis**. *BMC Research Notes* 2010 **3**:277.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Troisième partie
Discussion

Ce travail rapporte l'analyse des profils d'expression d'échantillons de mélanome de la choroïde par des approches à haut débit. Les travaux sur cette pathologie sont peu nombreux et par cette étude, nous avons tenté d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans le processus métastatique de ce cancer. Ce travail se positionne dans un projet institutionnel de l'Institut Curie à l'interface de différents acteurs tels que des médecins et des biologistes.

Le mélanome de la choroïde est la tumeur intra-oculaire la plus fréquente. Cependant cette tumeur est une tumeur rare et beaucoup moins étudiée que le mélanome cutané. Les mélanocytes cutanés et uvéaux issus de la crête neurale, même s'ils proviennent de la même origine embryonnaire, n'ont pas les mêmes fonctions et présentent ainsi des divergences dans leurs activités. En effet, dans la peau, les mélanocytes ont pour rôle majeur de transférer la mélanine qu'ils produisent aux kératynocytes qui les entourent. Dans l'œil le rôle de ces cellules restent mal connu, mais comparé à leurs homologues cutanés, ils sont quiescents tout au long de la vie et ne fabriquent plus de mélanine.

La transformation des mélanocytes en mélanome est également bien moins étudiée dans le mélanome choroïdien que dans le mélanome cutané. Il s'agit d'une tumeur plus rare et le matériel tumoral est plus difficile à obtenir compte tenu de la localisation oculaire.

L'Institut Curie est un des centres de référence pour cette pathologie en Europe. Le nombre de patients traités est important et la tumorotheque renferme une grande quantité d'échantillons très bien décrits d'un point de vue clinique. Cette tumeur est agressive et la moitié des patients atteints développent des métastases hépatiques dans les 3 ans qui suivent le diagnostic. Á ce jour, aucun médicament n'a montré son efficacité dans le traitement des tumeurs. Depuis de nombreuses années, l'Institut Curie participe à différentes études cliniques afin d'améliorer la prise en charge des patients, cependant, aucune des stratégies thérapeutiques testées n'a permis de réduire la taille des tumeurs. Une des raisons de ce manque d'efficacité dans les traitements peut venir du choix des patients, en effet une meilleure stratification en sous-groupe de patients homogènes permettrait éventuellement d'identifier des thérapies fonctionnelles. Le but de cette thèse était donc de rechercher dans les données disponibles, différents marqueurs qui pourraient avoir un rôle aussi bien diagnostique que thérapeutique afin d'améliorer la prise en charge des patients.

L'analyse de ces données a été réalisée en utilisant des outils et méthodes bioinformatiques et biostatistiques déjà disponibles. Le choix des outils et méthodes utilisés à chaque étape doit dépendre de la nature des données ainsi que de la question biologique posée et constitue une part importante du travail de bioanalyse. Les résultats obtenus doivent pouvoir être validés, reproduits et justifiés. Dans ce cadre, j'ai participé à un groupe de travail dont le but était de définir les meilleures stratégies d'analyse pour, entre autre, les données transcriptome. Nous discuterons de certains points méthodologiques et technologiques à la fin de cette partie.

Parmi les différentes questions posées sur l'ensemble des données disponibles, la plus étudiée a été d'analyser nos échantillons de tumeurs primaires afin de mettre en évidence des marqueurs associés au développement métastatique. Les profils génomiques de ces tumeurs ont été fortement étudiés depuis ces dernières années [Sandinha et al., 2004; Kilic et al., 2005; Onken et al., 2007; Schoenfield et al., 2009; Trolet et al., 2009;

Lake et al., 2010] par différentes techniques. Cette tumeur, comparée par exemple au cancer du sein, présente un nombre plus limité d'altérations et ces altérations touchent des grandes portions de chromosomes. En effet, il s'agit la plupart du temps, de perte ou du gain de bras de chromosome voire même de chromosome entier. La monosomie du chromosome 3 et l'amplification du 8q sont les deux principales altérations de mauvais pronostic liées au développement métastatique et à la survie. Les analyses des profils d'expression des tumeurs primaires sont moins nombreuses et le nombre de collections publiées est très faible. L'étude de référence est celle réalisée par l'équipe de Harbour aux Etats-Unis [Onken et al., 2004]. Dans leur étude, ils proposent le découpage des tumeurs en deux classes présentant des niveaux d'agressivité différents et des caractéristiques de différenciation différentes [Onken et al., 2004, 2006].

Dans notre étude, la collection de tumeurs primaires de l'Institut Curie ne présente pas ces mêmes caractéristiques de séparation par classe. Le but principal étant de rechercher des marqueurs associés au développement de métastases, nous nous sommes basés sur les informations cliniques disponibles. Le choix de découpage à 36 mois des tumeurs primaires métastatiques et non métastatiques peut être critiqué sachant que dans les informations cliniques, nous savons que certaines tumeurs classées meta0 ont développé des métastases après 36 mois. Cependant, il est important de figer les informations au début des analyses pour une bonne reproductibilité des données et 36 mois est un délai assez long qui permet de séparer les tumeurs agressives des autres. Le résultat le plus étudié dans cette analyse a été l'implication de PTP4A3 car en plus d'être parmi les gènes les plus variés entre nos deux groupes, ce gène est significativement associé au développement métastatique dans les analyses de survie même en ajustant ces modèles sur les variables cliniques utilisées pour déterminer l'agressivité des tumeurs. Cela en fait donc un marqueur d'agressivité intéressant dans le diagnostic des mélanomes uvéaux car son niveau d'expression apporte de l'information aux variables cliniques (type cellulaire, décollement rétine) communément utilisées dans la classification des tumeurs. De plus, cette différence d'expression est observable dans deux autres jeux de données [Onken et al., 2004; Petrusch et al., 2008]. En plus des validations fonctionnelles de PTP4A3 dans le phénomène métastatique effectuées au laboratoire, beaucoup de travail de bioanalyse a été réalisé autour de cette phosphatase. En effet, étant donné que le gène est localisé en 8q24.3, il était important de montrer que la sur-expression dans les tumeurs métastatiques n'était pas seulement une conséquence d'une augmentation du nombre de copie d'ADN. De plus, toujours à cause de la localisation sur le chromosome 8, nous avons vérifié que le gène n'était pas dans un train de gènes co-régulés et qu'ainsi la sur-expression observée dans les tumeurs métastatiques était bien la conséquence d'une régulation spécifique.

Ce travail a donc mis en évidence un nouveau marqueur dans la caractérisation des mélanomes choroïdiens permettant d'améliorer la classification des patients.

L'implication de cette phosphatase n'a jamais été décrite dans le mélanome de la choroïde. Cependant, de nombreuses études décrivent son rôle dans les mécanismes métastatiques et elle se positionne dans de nombreuses voies de régulation. PTP4A3 favorise la migration et l'invasion cellulaire *in vitro* et *in vivo* [Miskad et al., 2004; Wu et al., 2004a; Liang et al., 2007; Wang et al., 2007] en inhibant CSK un inhibiteur de SRC. PTP4A3 favorise également l'angiogénèse [Guo et al., 2006]. Basak *et al.* ont montré que PTP4A3 était une cible de p53 impliquée dans la régulation du cycle cellulaire [Basak et al., 2008]. Il faudra maintenant trouver son rôle dans les mélanomes uvéaux. Pour notre étude, de nombreuses questions restent encore sans réponse autour du gène et de

la protéine comme sa régulation transcriptionnelle ou ses cibles afin de pouvoir s'intéresser aux voies biochimiques impliquées. Nous avons essayé de trouver des régulateurs transcriptionnels de PTP4A3. Pour cela, nous avons recherché en parallèle l'ensemble des facteurs de transcription corrélés dans notre ensemble de données transcriptome et nous avons recherché des motifs de régulation présent dans la séquence promotrice du gène. Le facteur de transcription TFAP2, localisé en 6p24, semblait être un facteur intéressant dans cette régulation cependant les validations biologiques n'ont pas permis pour le moment d'affirmer cette hypothèse. Nous continuons donc la recherche. Concernant les cibles, l'analyse des lignées cellulaires utilisées dans l'étude de cette phosphatase a permis d'identifier des variations d'expression dans des metalloprotéases (MMP). Au niveau biologique, les MMP étant impliquées dans l'adhésion cellulaire, il sera intéressant de poursuivre les investigations pour rechercher un lien entre ces protéines.

Un autre point intéressant dans l'analyse de ces données est la corrélation spécifique entre PTP4A3 et PRKDC, protéine clé dans le système de réparation de l'ADN par religation non homologue (NHEJ). La sur-expression de PRKDC dans les tumeurs primaires métastatiques et donc l'activation du NHEJ permet de réfléchir à des options thérapeutiques nouvelles. Ainsi, à l'Institut Curie, l'équipe « Recombinaison, réparation et Cancer : De la Molécule au Patient » qui a développé une molécule permettant la dérégulation du NHEJ pour empêcher la résistance de certaines cellules cancéreuses aux chimiothérapies [Quanz et al., 2009], en collaboration avec le LIP ont mis en place un protocole d'étude dans le mélanome de la choroïde.

En parallèle de ces études autour de PTP4A3, des expériences de gels 2 Dimensions sur les lignées cellulaires OCM-1 utilisées dans cette étude ont été réalisées pour trouver des cibles. De cette analyse, CRMP2 (DPYSL2), impliqué dans la croissance neuronale et le remodelage du cytosquelette a été identifié. Les analyses sont toujours en cours au laboratoire pour montrer un lien direct ou non avec PTP4A3.

Par ailleurs, nous nous sommes bien entendu intéressés à d'autres gènes, impliqués dans l'adhésion focale ou encore le remodelage du cytosquelette mais il reste encore beaucoup de travail pour les intégrer ensemble afin de comprendre les mécanismes impliqués. L'émergence de la biologie des systèmes et de la modélisation des réseaux sera une voie d'étude à poursuivre pour intégrer l'ensemble de nos données.

Enfin, d'autres éléments sont à approfondir comme l'importance des gènes situés sur les chromosomes d'intérêts. De nombreux oncogènes sont par exemple localisés sur le bras long du chromosome 8. La monosomie du chromosome 3 est un facteur de risque chez les patients, or MITF, facteur essentiel pour la prolifération des cellules pigmentées est localisé sur ce chromosome. Il est fortement exprimé dans les mélanomes cutanés et est lié à leur agressivité. Son rôle dans les mélanomes uvéaux n'est pas défini. Il est également exprimé dans ces cellules et ne présente pas de variation d'expression entre nos différents groupes de tumeurs. Il sera intéressant de comprendre la régulation de ce gène, central dans les mélanocytes, alors qu'il se trouve sur un chromosome qui présente une monosomie dans les tumeurs agressives. Des études préliminaires au laboratoire sembleraient indiquées de PTP4A3 augmenterait la localisation nucléaire de MITF.

Finalement d'un point de vue critique, l'ensemble des résultats obtenus sur les tumeurs primaires ne peuvent sans doute pas être admis pour l'ensemble des mélanomes uvéaux car notre jeu de données est composé uniquement de grosses tumeurs (toutes proviennent d'énucléation) et elles ne présentent donc certainement une cohorte de tu-

meurs plus agressives que l'ensemble de la population.

Dans une seconde partie de mon travail, j'ai travaillé sur l'analyse de la collection de métastases hépatiques de l'Institut Curie dans le but de comparer les profils d'expression de ces métastases aux tumeurs primaires. La contamination foie présente dans ces données est un problème dans les analyses. Le seul moyen pour supprimer proprement cette information dans les données aurait été de disposer de foie sain et de les analyser en même temps que les métastases hépatiques afin d'en extraire l'information tumorale et de la comparer aux tumeurs primaires. N'ayant pas cette information il est difficile de distinguer si les gènes ressortent plus ou moins exprimés dans les métastases par rapport aux tumeurs oculaires à cause d'une contamination de cellules hépatiques ou à cause de réelles différences entre les deux groupes d'échantillons. Lors de la préparation des ARN, le pourcentage de cellules tumorales est vérifié et l'ensemble des tumeurs hépatiques présente un pourcentage correct de cellules.

La différence de résultats obtenus dans la comparaison de la totalité des tumeurs primaires et des métastases et des couples rend difficile l'interprétation des résultats. En effet, en se plaçant dans les mêmes conditions expérimentales (normalisation et fichiers d'annotation), on obtient dans un cas une quantité très importante de gènes dont le niveau d'expression varie entre les tumeurs primaires et les métastases et dans l'autre cas aucun gène. Il semblerait donc que ces méthodes classiques ne permettent pas de répondre aisément à cette question.

Cependant, les analyses réalisées suggèrent que comme pour les tumeurs primaires, il existerait deux classes de métastases hépatiques, une première avec un profil moins agressif que l'autre. Ainsi, la recherche de gènes liés à l'apparition de métastases résulterait d'une comparaison des tumeurs primaires et des métastases par classe de tumeurs et ces deux classes pourraient emprunter des voies différentes pour leur développement métastatique. Nous ne sommes pour l'instant qu'au début de cette analyse, mais nous espérons de cette manière identifier de nouveaux marqueurs moléculaires intéressants.

En parallèle, les analyses de survie sur la collection des métastases ont permis d'identifier deux gènes stables associés dans le décès des patients. HJURP serait de mauvais pronostic et associé à une survie limitée et AKIRIN2 serait plus protecteur. Peu de travaux ont été réalisés sur ces gènes pour aider à comprendre leur rôle biologique possible dans nos données. Des expériences sont en train d'être mises en place au laboratoire afin d'évaluer l'implication d'AKIRIN2 dans la prolifération cellulaire.

Finalement deux problèmes principaux se posent dans l'analyse de ces données. Tout d'abord le biais résultant de la contamination des gènes du foie. Il serait intéressant d'utiliser des méthodes telles que l'analyse en composante indépendante (ACI) pour extraire les différents signaux présents dans les données et ainsi séparer la composante foie des autres. Cette méthode a déjà présenté son intérêt dans l'analyse de données de puces [Lee and Batzoglou, 2003; Frigyesi et al., 2006; Teschendorff et al., 2007] et nécessiterait un travail à part entière afin d'extraire et d'interpréter au mieux les signaux. Le second problème est plutôt un problème de validation. En effet, cette collection est unique pour cette pathologie et les résultats extraits pourront difficilement être validés d'un point de vue bioinformatique. Le jeu de données étant important il est possible de le diviser en un jeu d'apprentissage et un jeu test comme effectué dans les analyses de survie, mais cela reste une validation interne. D'un point de vue biologique, nous ne disposons pas de lignée cellulaire de métastases mais uniquement des lignées issues de

tumeur primaire.

La dernière partie de mon travail d'analyse a été de caractériser au niveau des profils transcriptomiques et génomiques, les modèles murins de xénogreffes établis à l'Institut Curie. Ce travail avait pour but à la fois de comparer les xénogreffes avec les patients d'origine et de comparer les différents passages des xénogreffes entre eux.

Ce travail dans la comparaison du nombre de copies d'ADN a montré qu'il y avait une très bonne corrélation entre les patients et les xénogreffes associées, ainsi que dans les différents passages des xénogreffes. Les différences observées semblent souvent être de la sélection clonale, par exemple un signal bruité chez le patient sera plus nette dans la xénogreffe. En effet à chaque passage seulement une partie de la tumeur est greffée dans les souris. Au niveau des profils d'expression, les différents passages d'un même modèle ne présentent pas de différence, par contre il y a des variations d'expression entre les profils des patients et ceux des xénogreffes. Ces variations semblent principalement être la conséquence du changement d'hôte. En effet, les gènes différentiellement exprimés sont des gènes du système immunitaire ou de la matrice extra-cellulaire pour une grande partie d'entre eux. L'ensemble de ces résultats, associés aux caractérisations histologiques et d'expression de gènes clés, semblent donc indiquer que ces xénogreffes sont de bons modèles représentatifs des tumeurs oculaires primaires d'origine.

Certains points dans cette analyse peuvent être discutés. La prise des xénogreffes dans les souris est significativement associée au développement métastatique. Ces modèles sont donc représentatifs de la classe de tumeurs agressives et ne représentent pas l'ensemble des tumeurs primaires. Cependant, les modèles ne présentent pas tous la même réponse au temozolomide et à la fotemustine, ce qui permet d'avoir tout de même un ensemble de modèles hétérogènes représentatifs des tumeurs agressives chez les patients. Les analyses du protéome, en cours pour le moment, pourraient permettre de distinguer les voies biochimiques actives dans ces tumeurs afin d'expliquer les différences de réponses observées.

Ces modèles murins ne développent pas de métastases. Le tropisme hépatique présent dans ce cancer ne peut donc pas être étudié via ces modèles. Les implants sont greffés par voie sous-cutanée, il n'est donc pas possible pour le moment de définir si ce tropisme est dû à la localisation oculaire des tumeurs primaires ou si les tumeurs greffées ne sont plus capable de métastaser. Des greffes de tumeurs dans la choroïde des souris sont en cours d'élaboration au LIP. Il sera alors intéressant de comparer ces modèles une fois établis, s'ils présentent la capacité de développer des métastases.

D'un point de vue technique, les données de transcriptome ont été analysées sur des puces exons. Ces puces permettent donc de comparer des variations au niveau exonique. Nous avons restreint l'analyse au niveau des gènes car une seule puce était disponible par échantillon. Les différentes tumeurs d'origine utilisées pour développer les modèles doivent certainement présenter chacune un profil d'expression propre. Il n'est donc pas judicieux de comparer les variations exoniques entre les tumeurs des patients et les xénogreffes sans répliquat par échantillon analysé. Le dessin expérimental n'est pas vraiment adapté pour traiter cette question.

L'analyse des données génomes peut être améliorée. Les fréquences alléliques disponibles avec la technologie SNP6.0 utilisée, n'ont pas été étudiées en profondeur. L'ensemble des profils, nombre de copie et fréquence allélique, ont bien entendu été com-

parés pour chaque modèle mais il serait intéressant de prendre plus en compte cette information, notamment pour la segmentation des données.

Par ailleurs, la recherche de régions récurrentes dans les xénogreffes n'a pas permis pour le moment d'identifier des régions d'intérêt. Il faudrait poursuivre ces analyses afin de s'assurer qu'une région n'est pas toujours altérée chez les souris afin de permettre la croissance tumorale.

Pour finir, différents points sur les méthodologies utilisées sont importants à soulever. Les techniques à haut débit permettent de rechercher des modifications entre différents groupes dans l'ensemble des gènes. Cependant la fouille de données en aval n'est pas toujours évidente pour interpréter correctement les résultats. D'autant plus que le choix dans les méthodes utilisées peut modifier fortement les résultats obtenus. Les méthodes de normalisation ne reposent pas sur les mêmes hypothèses et ne donnent pas la même distribution des intensités, ce qui modifie les résultats des analyses comparatives. Les tests statistiques reposent également sur des hypothèses différentes comme nous avons pu le voir dans l'introduction et ne prennent pas en compte les mêmes paramètres ne mettant ainsi pas en évidence les mêmes gènes d'intérêts. L'importance du travail de bioanalyse réalisé ici repose donc également dans le choix des méthodologies utilisées.

Nous avons vu que le changement de fichiers CDF pour l'annotation des puces peut engendrer des différences importantes dans les résultats observés. Dans l'ensemble des analyses, nous avons toujours utilisé les deux fichiers en parallèle. Les fichiers CDF présentant une seule valeur par gène sont mieux annotés que les fichiers Affymetrix. Cependant, comme les valeurs d'intensité obtenues sont une moyenne de l'ensemble des sondes validées pour chacun des gènes, le signal obtenu peut ainsi provenir de 3 sondes différentes ou beaucoup plus (plus de 20) en fonction de la quantité conservée après validation. Les intensités sont donc dans ce cas là bien spécifique au gène d'intérêt mais pas forcément estimées de la même façon en fonction des gènes. Concernant les annotations Affymetrix, l'ensemble des probesets ne sont pas de bonne qualité, car l'ensemble des sondes sont utilisées et bon nombre d'entre elles ne sont pas spécifique ou ne ciblent pas le gène auquel elles ont été rattachées. Dans ce cas là, les probesets d'intérêts sont filtrés à posteriori en fonction de la qualité des sondes qui le compose. Les gènes d'intérêts que nous avons abordés plus spécifiquement dans cette étude ont été mis en évidence en utilisant les deux fichiers CDF, permettant ainsi de s'assurer de leur intérêt. Des validations biologiques sont toutefois indispensables en aval des études à haut débit.

Par ailleurs, concernant la sur-représentation des voies biochimiques dans les listes de gènes d'intérêt, les résultats ne sont pas toujours très révélateurs. Ces analyses sont basées sur les informations disponibles dans la littérature et les ensembles de gènes définis ne sont pas toujours biologiquement pertinents. Il est donc important de prendre en compte les informations issues des différentes bases de données (vérifiées manuellement de préférence) et de contrôler les gènes renseignés dans ces différents ensembles.

Quatrième partie
Conclusion

Ce travail d'analyse sur la collection de tumeurs de mélanome choroïdiens ou de métastases associées de l'Institut Curie a permis d'ajouter des connaissances dans la compréhension des voies et des marqueurs impliqués dans ce mélanome encore peu étudié.

Des altérations dans le nombre de copie d'ADN et dans les profils d'expression ont été effectivement associées au pronostic, cependant l'implication précise de voies de signalisation dans le développement métastatique n'est encore qu'à ses débuts.

Les modulations transcriptionnelles sont loin d'être les seules modifications possibles à l'origine des dérégulations des voies de signalisation. Des études récentes ont montré la présence de mutations fréquentes dans les mélanomes choroïdiens, avec par exemple des mutations inactivatrices de BAP1, impliqué dans réparation de l'ADN, identifiées dans 84% des tumeurs de classe 2 coïncidant ainsi avec le comportement métastatique. Des mutations dans les sous-unités α des protéines G, GNAQ et GNA11 ont été décrites dans 50% des mélanomes uvéaux et entraînent l'activation constitutive de la voie des MAP kinases. Cette voie est également activée dans les mélanomes cutanés avec à l'origine une mutation BRAF décrite dans 60% des mélanomes cutanés [Davies et al., 2002] et dans seulement 13% des mélanomes uvéaux [Maat et al., 2008] (et seulement dans des sous-clones). Les mélanomes uvéaux et cutanés présentent ainsi chacun une activation de la voie MAP kinases en passant par des voies différentes. Cependant, même si ces mutations GNAQ et GNA11 apparaissent comme des acteurs majeurs du développement des mélanomes uvéaux, il s'agirait d'événements précoces dans la maladie et ne elles ne semblent pas liées au développement métastatique [Bauer et al., 2009].

L'activation de la voie des MAP kinases présente, comme dans beaucoup de cancer, un intérêt dans le mélanome uvéal. Des études protéomiques à haut débit pour connaître le statut de phosphorylation des différents acteurs impliqués dans cette voie permettra certainement d'aider à la compréhension des mécanismes impliqués dans la tumorigénèse de ce mélanome.

L'ensemble de ces études de données à haut-débit en collaboration avec des médecins et chercheurs s'inscrit directement dans des programmes de recherche translationnelle. La caractérisation précise de tumeurs et de modèles animaux permet par exemple de cibler des voies d'intérêt pour lesquelles il existe déjà des molécules disponibles dans l'industrie pharmaceutique et ainsi étudier leur potentiel dans le traitement de la pathologie. Basé sur les différentes données disponibles, les médecins de l'Institut Curie vont par exemple mettre en place un programme thérapeutique basé autour d'inhibiteurs du récepteur cMET qui fait partie des gènes significativement plus exprimés dans les tumeurs qui développent des métastases et qui est, en outre, en amont de la voie MEK/ERK.

On peut s'attendre à ce que le séquençage de nouvelle génération réalisé sur la tumeur primaire, la métastase, et l'ADN constitutionnel d'un même patient mettra en évidence de nouveaux gènes essentiels et mutés, permettant de comprendre précisément les mécanismes de la tumorigénèse et le développement métastatique, ouvrant ainsi la voie à des thérapies ciblées. En effet, mettre en évidence la ou les mutations centrales dans le mélanome de la choroïde permettra éventuellement de développer des inhibiteurs spécifiques de la même façon que le travail réalisé sur BRAF dans le mélanome cutané [Niculescu-Duvaz et al., 2009]. Une étude récente sur la comparaison de profils d'expression de lignées issues de mélanomes uvéaux et de mélanocytes normaux par séquençage SOLID a montré l'importance des voies MAP kinases, p53, l'apoptose, le cycle cellulaire et la mélanogénèse dans la transformation de ces cellules

[An et al., 2011]. Cette étude, novatrice dans cette pathologie, permet ainsi d'orienter les recherches dans les voies à étudier plus précisément pour y rechercher de nouveaux marqueurs et cibles pouvant améliorer le diagnostic et le traitement de ce cancer.

Cinquième partie
Bibliographie

Bibliographie

- Abdel-Rahman, M. H., Boru, G., Massengill, J., Salem, M. M., and Davidorf, F. H. (2010). Met oncogene inhibition as a potential target of therapy for uveal melanomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(7) :3333–3339.
- Abdel-Rahman, M. H., Craig, E. L., Davidorf, F. H., and Eng, C. (2005). Expression of vascular endothelial growth factor in uveal melanoma is independent of 6p21-region copy number. *Clin Cancer Res*, 11(1) :73–78.
- Abdel-Rahman, M. H., Yang, Y., Zhou, X.-P., Craig, E. L., Davidorf, F. H., and Eng, C. (2006). High frequency of submicroscopic hemizygous deletion is a major mechanism of loss of expression of pten in uveal melanoma. *J Clin Oncol*, 24(2) :288–295.
- Abi-Ayad, N., Couturier, J., Devouassoux-Shisheboran, M., Grange, J.-D., Kodjikian, L., and Calender, A. (2011). Genomic profiling by comparative genomic hybridization : analysis of ten enucleated uveal melanoma cases. *J Fr Ophthalmol*, 34(1) :17–23.
- Adler, R. and Canto-Soler, M. V. (2007). Molecular mechanisms of optic vesicle development : complexities, ambiguities and controversies. *Dev Biol*, 305(1) :1–13.
- Al-Jamal, R. T., Mäkitie, T., and Kivelä, T. (2003). Nucleolar diameter and microvascular factors as independent predictors of mortality from malignant melanoma of the choroid and ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(6) :2381–2389.
- Albertson, D. G. (2003). Profiling breast cancer by array cgh. *Breast Cancer Res Treat*, 78(3) :289–298.
- Albertson, D. G., Ylstra, B., Seagraves, R., Collins, C., Dairkee, S. H., Kowbel, D., Kuo, W. L., Gray, J. W., and Pinkel, D. (2000). Quantitative mapping of amplicon structure by array cgh identifies cyp24 as a candidate oncogene. *Nat Genet*, 25(2) :144–146.
- Alexa, A. and Rahnenfuhrer, J. (2009). *topGO : topGO : Enrichment analysis for Gene Ontology*. R package version 1.16.2.
- Ali, L., Helm, T., Cheney, R., Conroy, J., Sait, S., Guitart, J., and Gerami, P. (2010). Correlating array comparative genomic hybridization findings with histology and outcome in spitzoid melanocytic neoplasms. *Int J Clin Exp Pathol*, 3(6) :593–599.
- All-Ericsson, C., Girnita, L., Müller-Brunotte, A., Brodin, B., Seregard, S., Ostman, A., and Larsson, O. (2004). c-kit-dependent growth of uveal melanoma cells : a potential therapeutic target ? *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(7) :2075–2082.

- All-Ericsson, C., Girnita, L., Seregard, S., Bartolazzi, A., Jager, M. J., and Larsson, O. (2002). Insulin-like growth factor-1 receptor in uveal melanoma : a predictor for metastatic disease and a potential therapeutic target. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(1) :1–8.
- An, J., Wan, H., Zhou, X., Hu, D.-N., Wang, L., Hao, L., Yan, D., Shi, F., Zhou, Z., Wang, J., Hu, S., Yu, J., and Qu, J. (2011). A comparative transcriptomic analysis of uveal melanoma and normal uveal melanocyte. *PLoS One*, 6(1) :e16516.
- Angeloni, D. (2007). Molecular analysis of deletions in human chromosome 3p21 and the role of resident cancer genes in disease. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 6(1) :19–39.
- Babchia, N., Calipel, A., Mouriaux, F., Faussat, A.-M., and Mascarelli, F. (2010). The pi3k/akt and mtor/p70s6k signaling pathways in human uveal melanoma cells : interaction with b-raf/erk. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(1) :421–429.
- Baggetto, L. G., Gambrelle, J., Dayan, G., Labialle, S., Barakat, S., Michaud, M., Grange, J.-D., and Gayet, L. (2005). Major cytogenetic aberrations and typical multidrug resistance phenotype of uveal melanoma : current views and new therapeutic prospects. *Cancer Treat Rev*, 31(5) :361–379.
- Basak, S., Jacobs, S. B. R., Krieg, A. J., Pathak, N., Zeng, Q., Kaldis, P., Giaccia, A. J., and Attardi, L. D. (2008). The metastasis-associated gene prl-3 is a p53 target involved in cell-cycle regulation. *Mol Cell*, 30(3) :303–314.
- Bauer, J. and Bastian, B. C. (2007). Dna copy number changes in the diagnosis of melanocytic tumors. *Pathologie*, 28(6) :464–473.
- Bauer, J., Kilic, E., Vaarwater, J., Bastian, B. C., Garbe, C., and de Klein, A. (2009). Oncogenic gnaq mutations are not correlated with disease-free survival in uveal melanoma. *Br J Cancer*, 101(5) :813–815.
- Ben-Yaacov, E. and Eldar, Y. C. (2008). A fast and flexible method for the segmentation of acgh data. *Bioinformatics*, 24(16) :i139–i145.
- Bengtsson, H., Wirapati, P., and Speed, T. P. (2009). A single-array preprocessing method for estimating full-resolution raw copy numbers from all affymetrix genotyping arrays including genomewidesnp 5 & 6. *Bioinformatics*, 25(17) :2149–2156.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate : a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser., B* 57 no. 1 :289–300.
- Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T. J., Bille, K., Fisher, D. E., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. (1998a). Microphthalmia gene product as a signal transducer in camp-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol*, 142(3) :827–835.
- Bertolotto, C., Buscà, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. (1998b). Different cis-acting elements are involved in the regulation of trp1 and trp2 promoter activities by cyclic amp : pivotal role of m boxes (gtcatgtgct) and of microphthalmia. *Mol Cell Biol*, 18(2) :694–702.
- Bibikova, M. and Fan, J.-B. (2010). Genome-wide dna methylation profiling. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2(2) :210–223.

- Bibikova, M., Lin, Z., Zhou, L., Chudin, E., Garcia, E. W., Wu, B., Doucet, D., Thomas, N. J., Wang, Y., Vollmer, E., Goldmann, T., Seifart, C., Jiang, W., Barker, D. L., Chee, M. S., Floros, J., and Fan, J.-B. (2006). High-throughput dna methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res*, 16(3) :383–393.
- Bild, A. H., Potti, A., and Nevins, J. R. (2006). Linking oncogenic pathways with therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 6(9) :735–741.
- Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M., and Speed, T. P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19(2) :185–193.
- Boyle, P. and Levin, B. (2008). *World Cancer Report 2008*. IARC.
- Brantley, M. A. and Harbour, J. W. (2000). Deregulation of the rb and p53 pathways in uveal melanoma. *Am J Pathol*, 157(6) :1795–1801.
- Broët, P. and Richardson, S. (2006). Detection of gene copy number changes in cgh microarrays using a spatially correlated mixture model. *Bioinformatics*, 22(8) :911–918.
- Buchhagen, D. L., Qiu, L., and Etkind, P. (1994). Homozygous deletion, rearrangement and hypermethylation implicate chromosome region 3p14.3-3p21.3 in sporadic breast-cancer development. *Int J Cancer*, 57(4) :473–479.
- Buscà, R., Berra, E., Gaggioli, C., Khaled, M., Bille, K., Marchetti, B., Thyss, R., Fitsialos, G., Larribère, L., Bertolotto, C., Virolle, T., Barbry, P., Pouysségur, J., Ponzio, G., and Ballotti, R. (2005). Hypoxia-inducible factor 1alpha is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (mitf) in melanoma cells. *J Cell Biol*, 170(1) :49–59.
- Calipel, A., Lefevre, G., Pouponnot, C., Mouriaux, F., Eychène, A., and Mascarelli, F. (2003). Mutation of b-raf in human choroidal melanoma cells mediates cell proliferation and transformation through the mek/erk pathway. *J Biol Chem*, 278(43) :42409–42418.
- Calipel, A., Mouriaux, F., Glotin, A.-L., Malecaze, F., Faussat, A.-M., and Mascarelli, F. (2006). Extracellular signal-regulated kinase-dependent proliferation is mediated through the protein kinase a/b-raf pathway in human uveal melanoma cells. *J Biol Chem*, 281(14) :9238–9250.
- Calzone, L., Gelay, A., Zinovyev, A., Radvanyi, F., and Barillot, E. (2008). A comprehensive modular map of molecular interactions in rb/e2f pathway. *Mol Syst Biol*, 4 :173.
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Shaw, N., Lane, C. R., Lim, E. P., Kalyanaraman, N., Nemesh, J., Ziaugra, L., Friedland, L., Rolfe, A., Warrington, J., Lipshutz, R., Daley, G. Q., and Lander, E. S. (1999). Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet*, 22(3) :231–238.
- Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K. S., Testori, A., Larue, L., and Goding, C. R. (2006). Mitf regulation of dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev*, 20(24) :3426–3439.

-
- Cheli, Y., Ohanna, M., Ballotti, R., and Bertolotto, C. (2010). Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res*, 23(1) :27–40.
- Chen, Z., McGee, M., Liu, Q., and Scheuermann, R. H. (2007). A distribution free summarization method for affymetrix genechip arrays. *Bioinformatics*, 23(3) :321–327.
- Chiaverini, C., Beuret, L., Flori, E., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Bahadoran, P., Ortonne, J.-P., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2008). Microphthalmia-associated transcription factor regulates rab27a gene expression and controls melanosome transport. *J Biol Chem*, 283(18) :12635–12642.
- Chow, R. L. and Lang, R. A. (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17 :255–296.
- Churchill, G. A. (2004). Using anova to analyze microarray data. *Biotechniques*, 37(2) :173–5, 177.
- Cobos, I., Shimamura, K., Rubenstein, J. L., Martínez, S., and Puelles, L. (2001). Fate map of the avian anterior forebrain at the four-somite stage, based on the analysis of quail-chick chimeras. *Dev Biol*, 239(1) :46–67.
- Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G. W., Clifford, S. C., Maher, E. R., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Maxwell, P. H. (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von hippel-lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, 275(33) :25733–25741.
- Cole, A. R., Causeret, F., Yadirgi, G., Hastie, C. J., McLauchlan, H., McManus, E. J., Hernández, F., Eickholt, B. J., Nikolic, M., and Sutherland, C. (2006). Distinct priming kinases contribute to differential regulation of collapsin response mediator proteins by glycogen synthase kinase-3 in vivo. *J Biol Chem*, 281(24) :16591–16598.
- Consortium, I. H. (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437(7063) :1299–1320.
- Consortium., T. G. O., Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., and Sherlock, G. (2000). Gene ontology : tool for the unification of biology. the gene ontology consortium. *Nat Genet*, 25(1) :25–29.
- Costin, G.-E. and Hearing, V. J. (2007). Human skin pigmentation : melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*, 21(4) :976–994.
- Coupland, S. E., Anastassiou, G., Stang, A., Schilling, H., Anagnostopoulos, I., Bornfeld, N., and Stein, H. (2000). The prognostic value of cyclin d1, p53, and mdm2 protein expression in uveal melanoma. *J Pathol*, 191(2) :120–126.
- Cox, D. R. (1972). Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 34 (2) :187–220.
-

- Cross, N. A., Ganesh, A., Parpia, M., Murray, A. K., Rennie, I. G., and Sisley, K. (2006). Multiple locations on chromosome 3 are the targets of specific deletions in uveal melanoma. *Eye (Lond)*, 20(4) :476–481.
- Curtin, J. A., Busam, K., Pinkel, D., and Bastian, B. C. (2006). Somatic activation of kit in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*, 24(26) :4340–4346.
- Dai, M., Wang, P., Boyd, A. D., Kostov, G., Athey, B., Jones, E. G., Bunney, W. E., Myers, R. M., Speed, T. P., Akil, H., Watson, S. J., and Meng, F. (2005). Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of genechip data. *Nucleic Acids Res*, 33(20) :e175.
- Damato, B. (2010). Does ocular treatment of uveal melanoma influence survival? *Br J Cancer*, 103(3) :285–290.
- Damato, B., Dopierala, J., Klaasen, A., van Dijk, M., Sibbring, J., and Coupland, S. E. (2009). Multiplex ligation-dependent probe amplification of uveal melanoma : correlation with metastatic death. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(7) :3048–3055.
- Damato, B., Duke, C., Coupland, S. E., Hiscott, P., Smith, P. A., Campbell, I., Douglas, A., and Howard, P. (2007). Cytogenetics of uveal melanoma : a 7-year clinical experience. *Ophthalmology*, 114(10) :1925–1931.
- Das, P. M. and Singal, R. (2004). Dna methylation and cancer. *J Clin Oncol*, 22(22) :4632–4642.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W. C., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C. J., Wooster, R., Stratton, M. R., and Futreal, P. A. (2002). Mutations of the braf gene in human cancer. *Nature*, 417(6892) :949–954.
- Davies, M. A. and Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*, 29(41) :5545–5555.
- de Ayala Alonso, A. G., Gutiérrez, L., Fritsch, C., Papp, B., Beuchle, D., and Müller, J. (2007). A genetic screen identifies novel polycomb group genes in drosophila. *Genetics*, 176(4) :2099–2108.
- Delston, R. B. and Harbour, J. W. (2006). Rb at the interface between cell cycle and apoptotic decisions. *Curr Mol Med*, 6(7) :713–718.
- DeNardo, D. G., Andreu, P., and Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev*, 29(2) :309–316.
- Desjardins, L. (2010). Choroidal nevi. *J Fr Ophtalmol*, 33(2) :136–141.

- Desjardins, L., Levy-Gabriel, C., Lumbroso-Lerouic, L., Sastre, X., Dendale, R., Couturier, J., Piperno-Neumann, S., Dorval, T., Mariani, P., Salmon, R., Plancher, C., and Asselain, B. (2006). Prognostic factors for malignant uveal melanoma. retrospective study on 2,241 patients and recent contribution of monosomy-3 research. *J Fr Ophthalmol*, 29(7) :741–749.
- Deverman, B. E., Cook, B. L., Manson, S. R., Niederhoff, R. A., Langer, E. M., Rosová, I., Kulans, L. A., Fu, X., Weinberg, J. S., Heinecke, J. W., Roth, K. A., and Weintraub, S. J. (2002). Bcl-xl deamidation is a critical switch in the regulation of the response to dna damage. *Cell*, 111(1) :51–62.
- Dick, J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 112(13) :4793–4807.
- Douarin, N. M. L., Dupin, E., Baroffio, A., and Dulac, C. (1992). New insights into the development of neural crest derivatives. *Int Rev Cytol*, 138 :269–314.
- Du, J., Miller, A. J., Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Ramaswamy, S., and Fisher, D. E. (2003). Mlana/mart1 and silv/pmel17/gp100 are transcriptionally regulated by mitf in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol*, 163(1) :333–343.
- Economou, M. A., All-Ericsson, C., Bykov, V., Girnita, L., Bartolazzi, A., Larsson, O., and Seregard, S. (2005). Receptors for the liver synthesized growth factors igf-1 and hgf/sf in uveal melanoma : intercorrelation and prognostic implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(12) :4372–4375.
- Edmunds, S. C., Cree, I. A., Nicolantonio, F. D., Hungerford, J. L., Hurren, J. S., and Kelsell, D. P. (2003). Absence of braf gene mutations in uveal melanomas in contrast to cutaneous melanomas. *Br J Cancer*, 88(9) :1403–1405.
- Efron, B. and Tibshirani, R. (2002). Empirical bayes methods and false discovery rates for microarrays. *Genet Epidemiol*, 23(1) :70–86.
- Ehlers, J. P. and Harbour, J. W. (2006). Molecular pathobiology of uveal melanoma. *Int Ophthalmol Clin*, 46(1) :167–180.
- Ehlers, J. P., Worley, L., Onken, M. D., and Harbour, J. W. (2005). Ddef1 is located in an amplified region of chromosome 8q and is overexpressed in uveal melanoma. *Clin Cancer Res*, 11(10) :3609–3613.
- Ehlers, J. P., Worley, L., Onken, M. D., and Harbour, J. W. (2008). Integrative genomic analysis of aneuploidy in uveal melanoma. *Clin Cancer Res*, 14(1) :115–122.
- Eilers, P. H. C. and de Menezes, R. X. (2005). Quantile smoothing of array cgh data. *Bioinformatics*, 21(7) :1146–1153.
- Eng, C., Leone, G., Orloff, M. S., and Ostrowski, M. C. (2009). Genomic alterations in tumor stroma. *Cancer Res*, 69(17) :6759–6764.
- Engler, D. A., Mohapatra, G., Louis, D. N., and Betensky, R. A. (2006). A pseudolikelihood approach for simultaneous analysis of array comparative genomic hybridizations. *Biostatistics*, 7(3) :399–421.

-
- Eskelin, S., Pyrhönen, S., Summanen, P., Hahka-Kemppinen, M., and Kivelä, T. (2000). Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea : tumor progression before and after treatment. *Ophthalmology*, 107(8) :1443–1449.
- Eskelin, S., Pyrhönen, S., Summanen, P., Prause, J. U., and Kivelä, T. (1999). Screening for metastatic malignant melanoma of the uvea revisited. *Cancer*, 85(5) :1151–1159.
- Falcon, S. and Gentleman, R. (2007). Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics*, 23(2) :257–8.
- Fitzpatrick, T. B. and Breathnach, A. S. (1963). [the epidermal melanin unit system]. *Dermatol Wochenschr*, 147 :481–489.
- Fridlyand, J., Snijders, A. M., Pinkel, D., Albertson, D. G., and Jain (2004). Hidden markov models approach to the analysis of array cgh data. *Journal of Multivariate Analysis*, 90(1) :132–153.
- Frigyesi, A., Veerla, S., Lindgren, D., and Höglund, M. (2006). Independent component analysis reveals new and biologically significant structures in micro array data. *BMC Bioinformatics*, 7 :290.
- Galluzzi, L. and Kroemer, G. (2008). Necroptosis : a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135(7) :1161–1163.
- Gambrelle, J., Kodjikian, L., Rouberol, F., Donate, D., Duquesne, N., Jean-Louis, B., Chauvel, P., Gérard, J.-P., Romestaing, P., and Grange, J.-D. (2004). Ciliary body melanomas. survival and prognostic aspects after brachytherapy or proton therapy. *J Fr Ophthalmol*, 27(1) :40–47.
- Ganley, J. P. and Comstock, G. W. (1973). Benign nevi and malignant melanomas of the choroid. *Am J Ophthalmol*, 76(1) :19–25.
- Garcia, M. J., Pole, J. C. M., Chin, S.-F., Teschendorff, A., Naderi, A., Ozdag, H., Vias, M., Kranjac, T., Subkhankulova, T., Paish, C., Ellis, I., Brenton, J. D., Edwards, P. A. W., and Caldas, C. (2005). A 1 mb minimal amplicon at 8p11-12 in breast cancer identifies new candidate oncogenes. *Oncogene*, 24(33) :5235–5245.
- Garraway, L. A., Widlund, H. R., Rubin, M. A., Getz, G., Berger, A. J., Ramaswamy, S., Beroukhi, R., Milner, D. A., Granter, S. R., Du, J., Lee, C., Wagner, S. N., Li, C., Golub, T. R., Rimm, D. L., Meyerson, M. L., Fisher, D. E., and Sellers, W. R. (2005). Integrative genomic analyses identify mitf as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*, 436(7047) :117–122.
- Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Iuliano, R., Cimmino, A., Aqeilan, R., Volinia, S., Bhatt, D., Alder, H., Marcucci, G., Calin, G. A., Liu, C.-G., Bloomfield, C. D., Andreeff, M., and Croce, C. M. (2006). MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(13) :5078–5083.
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. M., and Irizarry, R. A. (2004). affy—analysis of affymetrix genechip data at the probe level. *Bioinformatics*, 20(3) :307–315.
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., et al. (2004). Bioconductor : Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*, 5 :R80.
-

-
- Gire, V. (2005). La sénescence. une barrière télomérique à l'immortalité ou une réponse cellulaire aux stress physiologiques ? *M/S : médecine sciences*, 21(5) :491–497.
- Girnita, A., All-Ericsson, C., Economou, M. A., Aström, K., Axelson, M., Seregard, S., Larsson, O., and Girnita, L. (2008). The insulin-like growth factor-i receptor inhibitor picropodophyllin causes tumor regression and attenuates mechanisms involved in invasion of uveal melanoma cells. *Acta Ophthalmol*, 86 Thesis 4 :26–34.
- Girnita, A., Girnita, L., del Prete, F., Bartolazzi, A., Larsson, O., and Axelson, M. (2004). Cyclolignans as inhibitors of the insulin-like growth factor-1 receptor and malignant cell growth. *Cancer Res*, 64(1) :236–242.
- Giuliano, S., Cheli, Y., Ohanna, M., Bonet, C., Beuret, L., Bille, K., Loubat, A., Hofman, V., Hofman, P., Ponzio, G., Bahadoran, P., Ballotti, R., and Bertolotto, C. (2010). Microphthalmia-associated transcription factor controls the dna damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer Res*, 70(9) :3813–3822.
- Goding, C. R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma : signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev*, 14(14) :1712–1728.
- Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2008). Mitochondria in cancer cells : what is so special about them ? *Trends Cell Biol*, 18(4) :165–173.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., and Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, 445(7130) :851–857.
- Guha, Subharup, Li, Yi, Neuberg, and Donna (2008). Bayesian hidden markov modeling of array cgh data. *Journal of the American Statistical Association*, 103(482) :485–497.
- Guo, K., Li, J., Wang, H., Osato, M., Tang, J. P., Quah, S. Y., Gan, B. Q., and Zeng, Q. (2006). Prl-3 initiates tumor angiogenesis by recruiting endothelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 66(19) :9625–9635.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3) :353–364.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1) :57–70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer : the next generation. *Cell*, 144(5) :646–674.
- Harbour, J. W. (2009). Molecular prognostic testing and individualized patient care in uveal melanoma. *Am J Ophthalmol*, 148(6) :823–9.e1.
- Harbour, J. W., Onken, M. D., Roberson, E. D. O., Duan, S., Cao, L., Worley, L. A., Council, M. L., Matatall, K. A., Helms, C., and Bowcock, A. M. (2010). Frequent mutation of bap1 in metastasizing uveal melanomas. *Science*, 330(6009) :1410–1413.
- Harbour, J. W., Worley, L., Ma, D., and Cohen, M. (2002). Transducible peptide therapy for uveal melanoma and retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, 120(10) :1341–1346.
- Harris, C. C. (1996). p53 tumor suppressor gene : from the basic research laboratory to the clinic—an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 17(6) :1187–1198.
-

- Hatfield, G. W., Hung, S.-P., and Baldi, P. (2003). Differential analysis of dna microarray gene expression data. *Mol Microbiol*, 47(4) :871–877.
- Healy, E., Belgaid, C., Takata, M., Harrison, D., Zhu, N. W., Burd, D. A., Rigby, H. S., Matthews, J. N., and Rees, J. L. (1998). Prognostic significance of allelic losses in primary melanoma. *Oncogene*, 16(17) :2213–2218.
- Heiden, M. G. V., Cantley, L. C., and Thompson, C. B. (2009). Understanding the warburg effect : the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930) :1029–1033.
- Herbst, R. A., Weiss, J., Ehnis, A., Cavenee, W. K., and Arden, K. C. (1994). Loss of heterozygosity for 10q22-10qter in malignant melanoma progression. *Cancer Res*, 54(12) :3111–3114.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 67 :425–479.
- Hochberg, Y. and Tamhane, A. C. (1987). *Multiple comparison procedures*.
- Hochreiter, S., Clevert, D.-A., and Obermayer, K. (2006). A new summarization method for affymetrix probe level data. *Bioinformatics*, 22(8) :943–949.
- Hofmann, U. B., Kauczok-Vetter, C. S., Houben, R., and Becker, J. C. (2009). Overexpression of the kit/scf in uveal melanoma does not translate into clinical efficacy of imatinib mesylate. *Clin Cancer Res*, 15(1) :324–329.
- Hoheisel, J. D. (2006). Microarray technology : beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet*, 7(3) :200–210.
- Hotelling, H. (1933). Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology*, 24 (6 & 7) :417–441 & 498–520.
- Hsu, L., Self, S. G., Grove, D., Randolph, T., Wang, K., Delrow, J. J., Loo, L., and Porter, P. (2005). Denoising array-based comparative genomic hybridization data using wavelets. *Biostatistics*, 6(2) :211–226.
- Hughes, S., Damato, B. E., Giddings, I., Hiscott, P. S., Humphreys, J., and Houlston, R. S. (2005). Microarray comparative genomic hybridisation analysis of intraocular uveal melanomas identifies distinctive imbalances associated with loss of chromosome 3. *Br J Cancer*, 93(10) :1191–1196.
- Hui, A. B.-Y., Lo, K.-W., Teo, P. M. L., To, K.-F., and Huang, D. P. (2002). Genome wide detection of oncogene amplifications in nasopharyngeal carcinoma by array based comparative genomic hybridization. *Int J Oncol*, 20(3) :467–473.
- Hunt, G., Kyne, S., Ito, S., Wakamatsu, K., Todd, C., and Thody, A. (1995). Eumelanin and phaeomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes. *Pigment Cell Res*, 8(4) :202–208.
- Hupé, P., Stransky, N., Thiery, J.-P., Radvanyi, F., and Barillot, E. (2004). Analysis of array cgh data : from signal ratio to gain and loss of dna regions. *Bioinformatics*, 20(18) :3413–3422.

- Höglund, M., Gisselsson, D., Hansen, G. B., White, V. A., Säll, T., Mitelman, F., and Horsman, D. (2004). Dissecting karyotypic patterns in malignant melanomas : temporal clustering of losses and gains in melanoma karyotypic evolution. *Int J Cancer*, 108(1) :57–65.
- ichi Yasumoto, K., Takeda, K., Saito, H., ichi Watanabe, K., Takahashi, K., and Shibahara, S. (2002). Microphthalmia-associated transcription factor interacts with lef-1, a mediator of wnt signaling. *EMBO J*, 21(11) :2703–2714.
- Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B., and Speed, T. P. (2003). Summaries of affymetrix genechip probe level data. *Nucleic Acids Res*, 31(4) :e15.
- Ishizuka, T., Tanabe, C., Sakamoto, H., Aoyagi, K., Maekawa, M., Matsukura, N., Tokunaga, A., Tajiri, T., Yoshida, T., Terada, M., and Sasaki, H. (2002). Gene amplification profiling of esophageal squamous cell carcinomas by dna array cgh. *Biochem Biophys Res Commun*, 296(1) :152–155.
- Iwakawa, R., Kohno, T., Kato, M., Shiraiishi, K., Tsuta, K., Noguchi, M., Ogawa, S., and Yokota, J. (2011). Myc amplification as a prognostic marker of early-stage lung adenocarcinoma identified by whole genome copy number analysis. *Clin Cancer Res*, 17(6) :1481–1489.
- Jalava, S. E., Porkka, K. P., Rauhala, H. E., Isotalo, J., Tammela, T. L., and Visakorpi, T. (2009). Tceb1 promotes invasion of prostate cancer cells. *Int J Cancer*, 124(1) :95–102.
- Janssen, C. S., Sibbett, R., Henriquez, F. L., McKay, I. C., Kemp, E. G., and Roberts, F. (2008). The t1799a point mutation is present in posterior uveal melanoma. *Br J Cancer*, 99(10) :1673–1677.
- Jeanmougin, M., de Reynies, A., Marisa, L., Paccard, C., Nuel, G., and Guedj, M. (2010). Should we abandon the t-test in the analysis of gene expression microarray data : a comparison of variance modeling strategies. *PLoS One*, 5(9) :e12336.
- Jeffery, I. B., Higgins, D. G., and Culhane, A. C. (2006). Comparison and evaluation of methods for generating differentially expressed gene lists from microarray data. *BMC Bioinformatics*, 7 :359.
- Jensen, D. E., Proctor, M., Marquis, S. T., Gardner, H. P., Ha, S. I., Chodosh, L. A., Ishov, A. M., Tommerup, N., Vissing, H., Sekido, Y., Minna, J., Borodovsky, A., Schultz, D. C., Wilkinson, K. D., Maul, G. G., Barlev, N., Berger, S. L., Prendergast, G. C., and Rauscher, F. J. (1998). Bap1 : a novel ubiquitin hydrolase which binds to the brca1 ring finger and enhances brca1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*, 16(9) :1097–1112.
- Jiang, B.-H. and Liu, L.-Z. (2009). Pi3k/pten signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res*, 102 :19–65.
- Jong, K., Marchiori, E., Meijer, G., Vaart, A. V. D., and Ylstra, B. (2004). Breakpoint identification and smoothing of array comparative genomic hybridization data. *Bioinformatics*, 20(18) :3636–3637.

- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., and Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258(5083) :818–821.
- Kanter-Lewensohn, L., Dricu, A., Girnita, L., Wejde, J., and Larsson, O. (2000). Expression of insulin-like growth factor-1 receptor (igf-1r) and p27kip1 in melanocytic tumors : a potential regulatory role of igf-1 pathway in distribution of p27kip1 between different cyclins. *Growth Factors*, 17(3) :193–202.
- Kaplan, E. and Meier, P. (1958). Non parametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53 :457–481.
- Kauffmann, A., Rosselli, F., Lazar, V., Winnepeninckx, V., Mansuet-Lupo, A., Dessen, P., van den Oord, J. J., Spatz, A., and Sarasin, A. (2008). High expression of dna repair pathways is associated with metastasis in melanoma patients. *Oncogene*, 27(5) :565–573.
- Kauraniemi, P., Bärlund, M., Monni, O., and Kallioniemi, A. (2001). New amplified and highly expressed genes discovered in the erbb2 amplicon in breast cancer by cdna microarrays. *Cancer Res*, 61(22) :8235–8240.
- Kerr, M. K., Martin, M., and Churchill, G. A. (2000). Analysis of variance for gene expression microarray data. *J Comput Biol*, 7(6) :819–837.
- Kilic, E., Naus, N. C., van Gils, W., Klaver, C. C., van Til, M. E., Verbiest, M. M., Stijnen, T., Mooy, C. M., Paridaens, D., Beverloo, H. B., Luyten, G. P., and de Klein, A. (2005). Concurrent loss of chromosome arm 1p and chromosome 3 predicts a decreased disease-free survival in uveal melanoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(7) :2253–2257.
- Kilic, E., van Gils, W., Lodder, E., Beverloo, H. B., van Til, M. E., Mooy, C. M., Paridaens, D., de Klein, A., and Luyten, G. P. M. (2006). Clinical and cytogenetic analyses in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(9) :3703–3707.
- Kiliç, E., Brüggewirth, H. T., Verbiest, M. M. P. J., Zwarthoff, E. C., Mooy, N. M., Luyten, G. P. M., and de Klein, A. (2004). The ras-braf kinase pathway is not involved in uveal melanoma. *Melanoma Res*, 14(3) :203–205.
- Kim, S., Kaminker, P., and Campisi, J. (2002). Telomeres, aging and cancer : in search of a happy ending. *Oncogene*, 21(4) :503–511.
- Kodjikian, L., Roy, P., Rouberol, F., Garweg, J. G., Chauvel, P., Manon, L., Jean-Louis, B., Little, R. E., Sasco, A. J., and Grange, J. D. (2004). Survival after proton-beam irradiation of uveal melanomas. *Am J Ophthalmol*, 137(6) :1002–1010.
- Komiya, Y., Kurabe, N., Katagiri, K., Ogawa, M., Sugiyama, A., Kawasaki, Y., and Tashiro, F. (2008). A novel binding factor of 14-3-3beta functions as a transcriptional repressor and promotes anchorage-independent growth, tumorigenicity, and metastasis. *J Biol Chem*, 283(27) :18753–18764.
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Bärlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M. J., Sauter, G., and Kallioniemi, O. P. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4(7) :844–847.

- Koren, A., Tirosh, I., and Barkai, N. (2007). Autocorrelation analysis reveals widespread spatial biases in microarray experiments. *BMC Genomics*, 8 :164.
- Kouzarides, T. (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev*, 9(1) :40–48.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed rnas. *Science*, 294(5543) :853–858.
- Lai, K., Conway, R. M., Crouch, R., Jager, M. J., and Madigan, M. C. (2008). Expression and distribution of mmgs and tmgs in human uveal melanoma. *Exp Eye Res*, 86(6) :936–941.
- Lai, W. R., Johnson, M. D., Kucherlapati, R., and Park, P. J. (2005). Comparative analysis of algorithms for identifying amplifications and deletions in array cgh data. *Bioinformatics*, 21(19) :3763–3770.
- Lake, S. L., Coupland, S. E., Taktak, A. F. G., and Damato, B. E. (2010). Whole-genome microarray detects deletions and loss of heterozygosity of chromosome 3 occurring exclusively in metastasizing uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(10) :4884–4891.
- Lassmann, S., Weis, R., Makowiec, F., Roth, J., Danciu, M., Hopt, U., and Werner, M. (2007). Array cgh identifies distinct dna copy number profiles of oncogenes and tumor suppressor genes in chromosomal- and microsatellite-unstable sporadic colorectal carcinomas. *J Mol Med*, 85(3) :293–304.
- Laurent, C., Valet, F., Planque, N., Silveri, L., Maacha, S., Anezo, O., Hupe, P., Plancher, C., Reyes, C., Alband, B., Rapinat, A., Gentien, D., Couturier, J., Sastre-Garau, X., Desjardins, L., Thiery, J.-P., Roman-Roman, S., Asselain, B., Barillot, E., Piperno-Neumann, S., and Saule, S. (2011). High ptp4a3 phosphatase expression correlates with metastatic risk in uveal melanoma patients. *Cancer Res*, 71(3) :666–674.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *c. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small rnas with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5) :843–854.
- Lee, S. B., Schramme, A., Doberstein, K., Dummer, R., Abdel-Bakky, M. S., Keller, S., Altevogt, P., Oh, S. T., Reichrath, J., Oxmann, D., Pfeilschifter, J., Mihic-Probst, D., and Gutwein, P. (2010). Adam10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma. *J Invest Dermatol*, 130(3) :763–773.
- Lee, S.-I. and Batzoglou, S. (2003). Application of independent component analysis to microarrays. *Genome Biol*, 4(11) :R76.
- Lefevre, G., Glotin, A.-L., Calipel, A., Mouriaux, F., Tran, T., Kherrouche, Z., Maurage, C.-A., Auclair, C., and Mascarelli, F. (2004). Roles of stem cell factor/c-kit and effects of glivec/sti571 in human uveal melanoma cell tumorigenesis. *J Biol Chem*, 279(30) :31769–31779.
- Leventhal, P. S. and Feldman, E. L. (1997). Insulin-like growth factors as regulators of cell motility signaling mechanisms. *Trends Endocrinol Metab*, 8(1) :1–6.

-
- Li, A., Omura, N., Hong, S.-M., and Goggins, M. (2010). Pancreatic cancer dnmt1 expression and sensitivity to dnmt1 inhibitors. *Cancer Biol Ther*, 9(4).
- Li, C. and Wong, W. H. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays : expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(1) :31–36.
- Li, G., Schaidler, H., Satyamoorthy, K., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., and Herlyn, M. (2001). Downregulation of e-cadherin and desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene*, 20(56) :8125–8135.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., and Parsons, R. (1997). Pten, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275(5308) :1943–1947.
- Liang, F., Liang, J., Wang, W.-Q., Sun, J.-P., Udho, E., and Zhang, Z.-Y. (2007). Prl3 promotes cell invasion and proliferation by down-regulation of csk leading to src activation. *J Biol Chem*, 282(8) :5413–5419.
- Lindblad-Toh, K., Tanenbaum, D. M., Daly, M. J., Winchester, E., Lui, W. O., Villapakkam, A., Stanton, S. E., Larsson, C., Hudson, T. J., Johnson, B. E., Lander, E. S., and Meyerson, M. (2000). Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nat Biotechnol*, 18(9) :1001–1005.
- Liu, H., Zeeberg, B. R., Qu, G., Koru, A. G., Ferrucci, A., Kahn, A., Ryan, M. C., Nuhonovic, A., Munson, P. J., Reinhold, W. C., Kane, D. W., and Weinstein, J. N. (2007). Affyprobeminer : a web resource for computing or retrieving accurately redefined affymetrix probe sets. *Bioinformatics*, 23(18) :2385–2390.
- Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., and Brown, E. L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 14(13) :1675–1680.
- Loercher, A. E., Tank, E. M. H., Delston, R. B., and Harbour, J. W. (2005). Mitf links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of ink4a. *J Cell Biol*, 168(1) :35–40.
- Loo, P. V., Nordgard, S. H., Lingjærde, O. C., Russnes, H. G., Rye, I. H., Sun, W., Weigman, V. J., Marynen, P., Zetterberg, A., Naume, B., Perou, C. M., Børresen-Dale, A.-L., and Kristensen, V. N. (2010). Allele-specific copy number analysis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(39) :16910–16915.
- Ludwig, A., Rehberg, S., and Wegner, M. (2004). Melanocyte-specific expression of dopachrome tautomerase is dependent on synergistic gene activation by the sox10 and mitf transcription factors. *FEBS Lett*, 556(1-3) :236–244.
- Lönnstedt, I. and Speed, T. P. (2002). Replicated microarray data. *Statistica Sinica*, 12 :31–46.
-

- Lüke, J., Wegner, J., Wegner, R., Nassar, K., Tatar, O., Rohrbach, J. M., Hilgers, R.-D., Lüke, M., and Grisanti, S. (2011). Expression of c-kit and its ligand scf in primary uveal melanoma. *Eur J Ophthalmol*.
- Maat, W., Kilic, E., Luyten, G. P. M., de Klein, A., Jager, M. J., Gruis, N. A., and der Velden, P. A. V. (2008). Pyrophosphorolysis detects b-raf mutations in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(1) :23–27.
- Machida, Y. J., Machida, Y., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., and Dutta, A. (2009). The deubiquitinating enzyme bap1 regulates cell growth via interaction with hcf-1. *J Biol Chem*, 284(49) :34179–34188.
- Mallery, D. L., Vandenberg, C. J., and Hiom, K. (2002). Activation of the e3 ligase function of the brca1/bard1 complex by polyubiquitin chains. *EMBO J*, 21(24) :6755–6762.
- Mallikarjuna, K., Pushparaj, V., Biswas, J., and Krishnakumar, S. (2007). Expression of epidermal growth factor receptor, ezrin, hepatocyte growth factor, and c-met in uveal melanoma : an immunohistochemical study. *Curr Eye Res*, 32(3) :281–290.
- Mantel, N. (1966). Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep*, 50(3) :163–170.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203) :436–444.
- Marks, M. S. and Seabra, M. C. (2001). The melanosome : membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(10) :738–748.
- McAvoy, J. W. (1978). Cell division, cell elongation and distribution of alpha-, beta- and gamma-crystallins in the rat lens. *J Embryol Exp Morphol*, 44 :149–165.
- McCannel, T. A., Burgess, B. L., Rao, N. P., Nelson, S. F., and Straatsma, B. R. (2010). Identification of candidate tumor oncogenes by integrative molecular analysis of choroidal melanoma fine-needle aspiration biopsy specimens. *Arch Ophthalmol*, 128(9) :1170–1177.
- McGill, G. G., Horstmann, M., Widlund, H. R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E. K., Lin, Y.-L., Ramaswamy, S., Avery, W., Ding, H.-F., Jordan, S. A., Jackson, I. J., Korsmeyer, S. J., Golub, T. R., and Fisher, D. E. (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell*, 109(6) :707–718.
- McHam, M. L. and Fulton, A. (1992). Albinism. *Int Ophthalmol Clin*, 32(1) :185–200.
- McLean, I. W., Foster, W. D., Zimmerman, L. E., and Gamel, J. W. (1983). Modifications of callender's classification of uveal melanoma at the armed forces institute of pathology. *Am J Ophthalmol*, 96(4) :502–509.
- Mei, R., Galipeau, P. C., Prass, C., Berno, A., Ghandour, G., Patil, N., Wolff, R. K., Chee, M. S., Reid, B. J., and Lockhart, D. J. (2000). Genome-wide detection of allelic imbalance using human snps and high-density dna arrays. *Genome Res*, 10(8) :1126–1137.

- Meir, T., Dror, R., Yu, X., Qian, J., Simon, I., Pe'er, J., and Chowers, I. (2007). Molecular characteristics of liver metastases from uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(11) :4890–4896.
- Miskad, U. A., Semba, S., Kato, H., and Yokozaki, H. (2004). Expression of p130 cas in human gastric carcinomas : close correlation with invasion and metastasis. *Pathobiology*, 71(4) :176–184.
- Mouriaux, F., Casagrande, F., Pillaire, M. J., Manenti, S., Malecaze, F., and Darbon, J. M. (1998). Differential expression of g1 cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in normal and transformed melanocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(6) :876–884.
- Mouriaux, F., Hamedani, M., Hurbli, T., Uteza, Y., Oubaaz, A., and Morax, S. (1999). Waardenburg's syndrome. *J Fr Ophtalmol*, 22(7) :799–809.
- Mouriaux, F., Saule, S., Desjardins, L., and Mascarelli, F. (2005). Normal and malignant choroidal melanocytes : from cell to clinical approach. *J Fr Ophtalmol*, 28(7) :781–793.
- Mouriaux, F., Vincent, S., Kherrouche, Z., Maurage, C. A., Planque, N., Monté, D., Labalette, P., and Saule, S. (2003). Microphthalmia transcription factor analysis in posterior uveal melanomas. *Exp Eye Res*, 76(6) :653–661.
- Mudhar, H. S., Parsons, M. A., Sisley, K., Rundle, P., Singh, A., and Rennie, I. G. (2004). A critical appraisal of the prognostic and predictive factors for uveal malignant melanoma. *Histopathology*, 45(1) :1–12.
- Murie, C., Woody, O., Lee, A. Y., and Nadon, R. (2009). Comparison of small n statistical tests of differential expression applied to microarrays. *BMC Bioinformatics*, 10 :45.
- Nancarrow, D. J., Handoko, H. Y., Stark, M. S., Whiteman, D. C., and Hayward, N. K. (2007). Sidcon : a tool to aid scoring of dna copy number changes in snp chip data. *PLoS One*, 2(10) :e1093.
- Naus, N. C., Zuidervaart, W., Rayman, N., Slater, R., van Drunen, E., Ksander, B., Luyten, G. P., and Klein, A. (2000). Mutation analysis of the pten gene in uveal melanoma cell lines. *Int J Cancer*, 87(1) :151–153.
- Neuviel, P., Hupé, P., Brito, I., Liva, S., Manié, E., Brennetot, C., Radvanyi, F., Aurias, A., and Barillot, E. (2006). Spatial normalization of array-cgh data. *BMC Bioinformatics*, 7 :264.
- Niculescu-Duvaz, D., Gaulon, C., Dijkstra, H. P., Niculescu-Duvaz, I., Zambon, A., Ménard, D., Suijkerbuijk, B. M. J. M., Nourry, A., Davies, L., Manne, H., Friedlos, F., Ogilvie, L., Hedley, D., Whittaker, S., Kirk, R., Gill, A., Taylor, R. D., Raynaud, F. I., Moreno-Farre, J., Marais, R., and Springer, C. J. (2009). Pyridoimidazolones as novel potent inhibitors of v-raf murine sarcoma viral oncogene homologue b1 (braf). *J Med Chem*, 52(8) :2255–2264.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260) :23–28.

- Nyström-Lahti, M., Kristo, P., Nicolaidis, N. C., Chang, S. Y., Aaltonen, L. A., Moisio, A. L., Järvinen, H. J., Mecklin, J. P., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1995). Founding mutations and alu-mediated recombination in hereditary colon cancer. *Nat Med*, 1(11) :1203–1206.
- Némati, F., Sastre-Garau, X., Laurent, C., Couturier, J., Mariani, P., Desjardins, L., Piperno-Neumann, S., Lantz, O., Asselain, B., Plancher, C., Robert, D., Péguillet, I., Donnadiou, M.-H., Dahmani, A., Bessard, M.-A., Gentien, D., Reyes, C., Saule, S., Barillot, E., Roman-Roman, S., and Decaudin, D. (2010). Establishment and characterization of a panel of human uveal melanoma xenografts derived from primary and/or metastatic tumors. *Clin Cancer Res*, 16(8) :2352–2362.
- Ochsenbein, A. F. (2005). Immunological ignorance of solid tumors. *Springer Semin Immunopathol*, 27(1) :19–35.
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., and Kanehisa, M. (1999). Kegg : Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 27(1) :29–34.
- Okada, T. S. (1980). Cellular metaplasia or transdifferentiation as a model for retinal cell differentiation. *Curr Top Dev Biol*, 16 :349–380.
- O’Keefe, C., McDevitt, M. A., and Maciejewski, J. P. (2010). Copy neutral loss of heterozygosity : a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood*, 115(14) :2731–2739.
- Olshen, A. B., Venkatraman, E. S., Lucito, R., and Wigler, M. (2004). Circular binary segmentation for the analysis of array-based dna copy number data. *Biostatistics*, 5(4) :557–572.
- Onken, M. D., Ehlers, J. P., Worley, L. A., Makita, J., Yokota, Y., and Harbour, J. W. (2006). Functional gene expression analysis uncovers phenotypic switch in aggressive uveal melanomas. *Cancer Res*, 66(9) :4602–4609.
- Onken, M. D., Lin, A. Y., Worley, L. A., Folberg, R., and Harbour, J. W. (2005). Association between microarray gene expression signature and extravascular matrix patterns in primary uveal melanomas. *Am J Ophthalmol*, 140(4) :748–749.
- Onken, M. D., Worley, L. A., Ehlers, J. P., and Harbour, J. W. (2004). Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res*, 64(20) :7205–7209.
- Onken, M. D., Worley, L. A., and Harbour, J. W. (2010). Association between gene expression profile, proliferation and metastasis in uveal melanoma. *Curr Eye Res*, 35(9) :857–863.
- Onken, M. D., Worley, L. A., Long, M. D., Duan, S., Council, M. L., Bowcock, A. M., and Harbour, J. W. (2008). Oncogenic mutations in gnaq occur early in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(12) :5230–5234.
- Onken, M. D., Worley, L. A., Person, E., Char, D. H., Bowcock, A. M., and Harbour, J. W. (2007). Loss of heterozygosity of chromosome 3 detected with single nucleotide polymorphisms is superior to monosomy 3 for predicting metastasis in uveal melanoma. *Clin Cancer Res*, 13(10) :2923–2927.

- Ortiz-Estevez, M., Bengtsson, H., and Rubio, A. (2010). Acne : a summarization method to estimate allele-specific copy numbers for affymetrix snp arrays. *Bioinformatics*, 26(15) :1827–1833.
- Pache, M., Glatz, K., Bösch, D., Dirnhofer, S., Mirlacher, M., Simon, R., Schraml, P., Rufle, A., Flammer, J., Sauter, G., and Meyer, P. (2003). Sequence analysis and high-throughput immunohistochemical profiling of kit (cd 117) expression in uveal melanoma using tissue microarrays. *Virchows Arch*, 443(6) :741–744.
- Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.-C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C., and Fridman, W.-H. (2010). Immune infiltration in human tumors : a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29(8) :1093–1102.
- Palmieri, G., Capone, M., Ascierto, M. L., Gentilcore, G., Stroncek, D. F., Casula, M., Sini, M. C., Palla, M., Mozzillo, N., and Ascierto, P. A. (2009). Main roads to melanoma. *J Transl Med*, 7 :86.
- Park, C. M. and Hollenberg, M. J. (1993). Growth factor-induced retinal regeneration in vivo. *Int Rev Cytol*, 146 :49–74.
- Park, S., Albert, D. M., and Bolognia, J. L. (1992). Ocular manifestations of pigmentary disorders. *Dermatol Clin*, 10(3) :609–622.
- Parkin, B., Erba, H., Ouillette, P., Roulston, D., Purkayastha, A., Karp, J., Talpaz, M., Kujawski, L., Shakhani, S., Li, C., Shedden, K., and Malek, S. N. (2010). Acquired genomic copy number aberrations and survival in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*, 116(23) :4958–4967.
- Parrella, P., Sidransky, D., and Merbs, S. L. (1999). Allelotype of posterior uveal melanoma : implications for a bifurcated tumor progression pathway. *Cancer Res*, 59(13) :3032–3037.
- Patel, M., Smyth, E., Chapman, P. B., Wolchok, J. D., Schwartz, G. K., Abramson, D. H., and Carvajal, R. D. (2011). Therapeutic implications of the emerging molecular biology of uveal melanoma. *Clin Cancer Res*, 17(8) :2087–2100.
- Pavlidis, P. (2003). Using anova for gene selection from microarray studies of the nervous system. *Methods*, 31(4) :282–289.
- Pearson, K. (1901). On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine, Series 6*, 2(11) :559–572.
- Pereira, P. R., Odashiro, A. N., Marshall, J. C., Correa, Z. M., Belfort, R., and Burnier, M. N. (2005). The role of c-kit and imatinib mesylate in uveal melanoma. *J Carcinog*, 4 :19.
- Petrausch, U., Martus, P., Tönnies, H., Bechrakis, N. E., Lenze, D., Wansel, S., Hummel, M., Bornfeld, N., Thiel, E., Foerster, M. H., and Keilholz, U. (2008). Significance of gene expression analysis in uveal melanoma in comparison to standard risk factors for risk assessment of subsequent metastases. *Eye (Lond)*, 22(8) :997–1007.
- Picard, F., Robin, S., Lavielle, M., Vaisse, C., and Daudin, J.-J. (2005). A statistical approach for array cgh data analysis. *BMC Bioinformatics*, 6 :27.

- Pingault, V., Ente, D., Moal, F. D.-L., Goossens, M., Marlin, S., and Bondurand, N. (2010). Review and update of mutations causing waardenburg syndrome. *Hum Mutat*, 31(4) :391–406.
- Pinkel, D., Seagraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W. L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S. H., Ljung, B. M., Gray, J. W., and Albertson, D. G. (1998). High resolution analysis of dna copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*, 20(2) :207–211.
- Piper, M. D. W., Daran-Lapujade, P., Bro, C., Regenber, B., Knudsen, S., Nielsen, J., and Pronk, J. T. (2002). Reproducibility of oligonucleotide microarray transcriptome analyses. an interlaboratory comparison using chemostat cultures of *saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 277(40) :37001–37008.
- Pollack, J. R., Perou, C. M., Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Pergamenschikov, A., Williams, C. F., Jeffrey, S. S., Botstein, D., and Brown, P. O. (1999). Genome-wide analysis of dna copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*, 23(1) :41–46.
- Polzehl, J. and Spokoiny, V. G. (2000). Adaptive weights smoothing with applications to image restoration. *Journal of the Royal Statistical Society : Series B (Statistical Methodology)*, 62(2) :335–354.
- Popova, T., Manié, E., Stoppa-Lyonnet, D., Rigail, G., Barillot, E., and Stern, M. H. (2009). Genome alteration print (gap) : a tool to visualize and mine complex cancer genomic profiles obtained by snp arrays. *Genome Biol*, 10(11) :R128.
- Pounds, S. B. (2006). Estimation and control of multiple testing error rates for microarray studies. *Brief Bioinform*, 7(1) :25–36.
- Pyrhönen, S. (1998). The treatment of metastatic uveal melanoma. *Eur J Cancer*, 34 Suppl 3 :S27–S30.
- Qian, B.-Z. and Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1) :39–51.
- Quackenbush, J. (2001). Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet*, 2(6) :418–427.
- Quackenbush, J. (2003). Genomics. microarrays—guilt by association. *Science*, 302(5643) :240–241.
- Quanz, M., Chassoux, D., Berthault, N., Agrario, C., Sun, J.-S., and Dutreix, M. (2009). Hyperactivation of dna-pk by double-strand break mimicking molecules disorganizes dna damage response. *PLoS One*, 4(7) :e6298.
- Raamsdonk, C. D. V., Bezrookove, V., Green, G., Bauer, J., Gaugler, L., O'Brien, J. M., Simpson, E. M., Barsh, G. S., and Bastian, B. C. (2009). Frequent somatic mutations of gnaq in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*, 457(7229) :599–602.
- Raamsdonk, C. D. V., Griewank, K. G., Crosby, M. B., Garrido, M. C., Vemula, S., Wiesner, T., Obenaus, A. C., Wackernagel, W., Green, G., Bouvier, N., Sozen, M. M., Baimukanova, G., Roy, R., Heguy, A., Dolgalev, I., Khanin, R., Busam, K., Speicher, M. R., O'Brien, J., and Bastian, B. C. (2010). Mutations in gna11 in uveal melanoma. *N Engl J Med*, 363(23) :2191–2199.

- Raposo, G. and Marks, M. S. (2007). Melanosomes—dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(10) :786–797.
- Raychaudhuri, S., Stuart, J. M., and Altman, R. B. (2000). Principal components analysis to summarize microarray experiments : application to sporulation time series. *Pac Symp Biocomput*, pages 455–466.
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D., Fiegler, H., Shapero, M. H., Carson, A. R., Chen, W., Cho, E. K., Dallaire, S., Freeman, J. L., González, J. R., Gratacòs, M., Huang, J., Kalaitzopoulos, D., Komura, D., MacDonald, J. R., Marshall, C. R., Mei, R., Montgomery, L., Nishimura, K., Okamura, K., Shen, F., Somerville, M. J., Tchinda, J., Valsesia, A., Woodwark, C., Yang, F., Zhang, J., Zerjal, T., Zhang, J., Armengol, L., Conrad, D. F., Estivill, X., Tyler-Smith, C., Carter, N. P., Aburatani, H., Lee, C., Jones, K. W., Scherer, S. W., and Hurles, M. E. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444(7118) :444–454.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J. J., Aparicio, O., Jennings, E. G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., Volkert, T. L., Wilson, C. J., Bell, S. P., and Young, R. A. (2000). Genome-wide location and function of dna binding proteins. *Science*, 290(5500) :2306–2309.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859) :105–111.
- Rigaill, G. (2010a). Pruned dynamic programming for optimal multiple change-point detection. *ArXiv e-prints*.
- Rigaill, G. (2010b). *Statistical and algorithmic developments for the analysis of Triple Negative Breast Cancers*. PhD thesis, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech).
- Rimoldi, D., Salvi, S., Liénard, D., Lejeune, F. J., Speiser, D., Zografos, L., and Cerottini, J.-C. (2003). Lack of braf mutations in uveal melanoma. *Cancer Res*, 63(18) :5712–5715.
- Robertson, K. D. and Wolffe, A. P. (2000). Dna methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*, 1(1) :11–19.
- Rodeck, U., Melber, K., Kath, R., Menssen, H. D., Varello, M., Atkinson, B., and Herlyn, M. (1991). Constitutive expression of multiple growth factor genes by melanoma cells but not normal melanocytes. *J Invest Dermatol*, 97(1) :20–26.
- Rodolfo, M., Daniotti, M., and Vallacchi, V. (2004). Genetic progression of metastatic melanoma. *Cancer Lett*, 214(2) :133–147.
- Rouberol, F., Roy, P., Kodjikian, L., Gérard, J. P., Jean-Louis, B., and Grange, J. D. (2004). Survival, anatomic, and functional long-term results in choroidal and ciliary body melanoma after ruthenium brachytherapy (15 years' experience with beta-rays). *Am J Ophthalmol*, 137(5) :893–900.
- Roussel, M., Saule, S., Lagrou, C., Rommens, C., Beug, H., Graf, T., and Stehelin, D. (1979). Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature*, 281(5731) :452–455.

-
- Roy, R., Wewer, U. M., Zurakowski, D., Pories, S. E., and Moses, M. A. (2004). Adam 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. *J Biol Chem*, 279(49) :51323–51330.
- Saldanha, G., Purnell, D., Fletcher, A., Potter, L., Gillies, A., and Pringle, J. H. (2004). High braf mutation frequency does not characterize all melanocytic tumor types. *Int J Cancer*, 111(5) :705–710.
- Salmon, R. J., Levy, C., Plancher, C., Dorval, T., Desjardins, L., Leyvraz, S., Pouillart, P., Schlienger, P., Servois, V., and Asselain, B. (1998). Treatment of liver metastases from uveal melanoma by combined surgery-chemotherapy. *Eur J Surg Oncol*, 24(2) :127–130.
- Sandinha, M. T., Farquharson, M. A., and Roberts, F. (2004). Identification of monosomy 3 in choroidal melanoma by chromosome in situ hybridisation. *Br J Ophthalmol*, 88(12) :1527–1532.
- Saornil, M. A. (2004). Iris colour and uveal melanoma. *Can J Ophthalmol*, 39(4) :448–452.
- Scheuermann, J. C., de Ayala Alonso, A. G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R. K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T. W., and Müller, J. (2010). Histone h2a deubiquitinase activity of the polycomb repressive complex pr-dub. *Nature*, 465(7295) :243–247.
- Schmittel, A., Bechrakis, N. E., Martus, P., Mutlu, D., Scheibenbogen, C., Bornfeld, N., Foerster, M. H., Thiel, E., and Keilholz, U. (2004). Independent prognostic factors for distant metastases and survival in patients with primary uveal melanoma. *Eur J Cancer*, 40(16) :2389–2395.
- Schoenfield, L., Pettay, J., Tubbs, R. R., and Singh, A. D. (2009). Variation of monosomy 3 status within uveal melanoma. *Arch Pathol Lab Med*, 133(8) :1219–1222.
- Schwender, H. (2009). *siggenes : Multiple testing using SAM and Efron's empirical Bayes approaches*. R package version 1.22.0.
- Servant, N., Gravier, E., Gestraud, P., Laurent, C., Paccard, C., Biton, A., Brito, I., Mandel, J., Asselain, B., Barillot, E., and Hupé, P. (2010). Ema - a r package for easy microarray data analysis. *BMC Res Notes*, 3 :277.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R., and Morrison, S. J. (2009). Heterogeneity in cancer : cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 138(5) :822–829.
- Shay, J. W. and Roninson, I. B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*, 23(16) :2919–2933.
- Sherry, S. T., Ward, M. H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E. M., and Sirotkin, K. (2001). dbsnp : the ncbi database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 29(1) :308–311.
- Shibahara, S., Yasumoto, K., Amae, S., Usono, T., Watanabe, K., Saito, H., and Takeda, K. (2000). Regulation of pigment cell-specific gene expression by mitf. *Pigment Cell Res*, 13 Suppl 8 :98–102.
-

-
- Shields, C. L. and Shields, J. A. (2009). Ocular melanoma : relatively rare but requiring respect. *Clin Dermatol*, 27(1) :122–133.
- Shields, J. A., Shields, C. L., Eagle, R. C., Santos, C., and Singh, A. D. (2000). Malignant melanoma arising from a large uveal melanocytoma in a patient with oculodermal melanocytosis. *Arch Ophthalmol*, 118(7) :990–993.
- Shildkrot, Y. and Wilson, M. W. (2009). Update on posterior uveal melanoma : treatment of the eye and emerging strategies in the prognosis and treatment of metastatic disease. *Curr Opin Ophthalmol*, 20(6) :504–510.
- Singh, A. D., Kalyani, P., and Topham, A. (2005). Estimating the risk of malignant transformation of a choroidal nevus. *Ophthalmology*, 112(10) :1784–1789.
- Singh, A. D., Rennie, I. G., Seregard, S., Giblin, M., and McKenzie, J. (2004). Sunlight exposure and pathogenesis of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol*, 49(4) :419–428.
- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 3 :Article3.
- Smyth, G. K. (2005). Limma : linear models for microarray data. In Gentleman, R., Carey, V., Dudoit, S., and R. Irizarry, W. H., editors, *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, pages 397–420. Springer, New York.
- Snijders, A. M., Nowak, N., Segreaves, R., Blackwood, S., Brown, N., Conroy, J., Hamilton, G., Hindle, A. K., Huey, B., Kimura, K., Law, S., Myambo, K., Palmer, J., Ylstra, B., Yue, J. P., Gray, J. W., Jain, A. N., Pinkel, D., and Albertson, D. G. (2001). Assembly of microarrays for genome-wide measurement of dna copy number. *Nat Genet*, 29(3) :263–264.
- Sonveaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M. C., Verrax, J., Rabbani, Z. N., Saedeleer, C. J. D., Kennedy, K. M., Diepart, C., Jordan, B. F., Kelley, M. J., Gallez, B., Wahl, M. L., Feron, O., and Dewhirst, M. W. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest*, 118(12) :3930–3942.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among dna fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98(3) :503–517.
- Staaf, J., Vallon-Christersson, J., Lindgren, D., Juliusson, G., Rosenquist, R., Höglund, M., Borg, A., and Ringnér, M. (2008). Normalization of illumina infinium whole-genome snp data improves copy number estimates and allelic intensity ratios. *BMC Bioinformatics*, 9 :409.
- Stang, A., Parkin, D. M., Ferlay, J., and Jöckel, K.-H. (2005). International uveal melanoma incidence trends in view of a decreasing proportion of morphological verification. *Int J Cancer*, 114(1) :114–123.
- Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yung, W. K., Lin, H., Ligon, A. H., Langford, L. A., Baumgard, M. L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D. H., and Tavtigian, S. V. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, *mmac1*, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*, 15(4) :356–362.
-

- Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., and Vogt, P. K. (1976). Dna related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian dna. *Nature*, 260(5547) :170–173.
- Steingrímsson, E., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (2004). Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet*, 38 :365–411.
- Storey, J. D. and Tibshirani, R. (2003). Statistical methods for identifying differentially expressed genes in dna microarrays. *Methods Mol Biol*, 224 :149–157.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis : a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(43) :15545–15550.
- Sumich, P., Mitchell, P., and Wang, J. J. (1998). Choroidal nevi in a white population : the blue mountains eye study. *Arch Ophthalmol*, 116(5) :645–650.
- Sun, Y., Tran, B. N., Worley, L. A., Delston, R. B., and Harbour, J. W. (2005). Functional analysis of the p53 pathway in response to ionizing radiation in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(5) :1561–1564.
- Tachibana, M., Perez-Jurado, L. A., Nakayama, A., Hodgkinson, C. A., Li, X., Schneider, M., Miki, T., Fex, J., Francke, U., and Arnheiter, H. (1994). Cloning of mitf, the human homolog of the mouse microphthalmia gene and assignment to chromosome 3p14.1-1p12.3. *Hum Mol Genet*, 3(4) :553–557.
- Tang, T., François, N., Glatigny, A., Agier, N., Mucchielli, M.-H., Aggerbeck, L., and Delacroix, H. (2007). Expression ratio evaluation in two-colour microarray experiments is significantly improved by correcting image misalignment. *Bioinformatics*, 23(20) :2686–2691.
- Tenenhaus, M. (1998). *La régression PLS - Théorie et pratique*.
- Teschendorff, A. E., Journée, M., Absil, P. A., Sepulchre, R., and Caldas, C. (2007). Elucidating the altered transcriptional programs in breast cancer using independent component analysis. *PLoS Comput Biol*, 3(8) :e161.
- Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2008). Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ*, 15(1) :3–12.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2(6) :442–454.
- Théveneau, E., Duband, J.-L., and Altabef, M. (2007). Ets-1 confers cranial features on neural crest delamination. *PLoS One*, 2(11) :e1142.
- Tibshirani, R., Chu, G., Hastie, T., and Narasimhan, B. (2010). *samr : SAM : Significance Analysis of Microarrays*. R package version 1.28.

- Trolet, J., Hupé, P., Huon, I., Lebigot, I., Decraene, C., Delattre, O., Sastre-Garau, X., Saule, S., Thiéry, J.-P., Plancher, C., Asselain, B., Desjardins, L., Mariani, P., Piperno-Neumann, S., Barillot, E., and Couturier, J. (2009). Genomic profiling and identification of high-risk uveal melanoma by array cgh analysis of primary tumors and liver metastases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(6) :2572–2580.
- Tschentscher, F., Hüsing, J., Hölter, T., Kruse, E., Dresen, I. G., Jöckel, K.-H., Anastassiou, G., Schilling, H., Bornfeld, N., Horsthemke, B., Lohmann, D. R., and Zeschnigk, M. (2003). Tumor classification based on gene expression profiling shows that uveal melanomas with and without monosomy 3 represent two distinct entities. *Cancer Res*, 63(10) :2578–2584.
- Tschentscher, F., Prescher, G., Horsman, D. E., White, V. A., Rieder, H., Anastassiou, G., Schilling, H., Bornfeld, N., Bartz-Schmidt, K. U., Horsthemke, B., Lohmann, D. R., and Zeschnigk, M. (2001). Partial deletions of the long and short arm of chromosome 3 point to two tumor suppressor genes in uveal melanoma. *Cancer Res*, 61(8) :3439–3442.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(9) :5116–5121.
- van der Velden, P. A., Metzelaar-Blok, J. A., Bergman, W., Monique, H., Hurks, H., Frants, R. R., Gruis, N. A., and Jager, M. J. (2001). Promoter hypermethylation : a common cause of reduced p16(ink4a) expression in uveal melanoma. *Cancer Res*, 61(13) :5303–5306.
- van Gils, W., Kilic, E., Brüggewirth, H. T., Vaarwater, J., Verbiest, M. M., Beverloo, B., van Til-Berg, M. E., Paridaens, D., Luyten, G. P., and de Klein, A. (2008). Regional deletion and amplification on chromosome 6 in a uveal melanoma case without abnormalities on chromosomes 1p, 3 and 8. *Melanoma Res*, 18(1) :10–15.
- van Houdt, I. S., Sluijter, B. J. R., Moesbergen, L. M., Vos, W. M., de Gruijl, T. D., Molenkamp, B. G., van den Eertwegh, A. J. M., Hooijberg, E., van Leeuwen, P. A. M., Meijer, C. J. L. M., and Oudejans, J. J. (2008). Favorable outcome in clinically stage ii melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating t-lymphocytes and preserved mhc class i antigen expression. *Int J Cancer*, 123(3) :609–615.
- Varrin-Doyer, M., Vincent, P., Cavagna, S., Auvergnon, N., Noraz, N., Rogemond, V., Honorat, J., Moradi-Améli, M., and Giraudon, P. (2009). Phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 on tyr-479 regulates cxcl12-induced t lymphocyte migration. *J Biol Chem*, 284(19) :13265–13276.
- Venables, J. P. (2004). Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res*, 64(21) :7647–7654.
- Venkatraman, E. S. and Olshen, A. B. (2007). A faster circular binary segmentation algorithm for the analysis of array cgh data. *Bioinformatics*, 23(6) :657–663.
- Ventii, K. H., Devi, N. S., Friedrich, K. L., Chernova, T. A., Tighiouart, M., Meir, E. G. V., and Wilkinson, K. D. (2008). Brca1-associated protein-1 is a tumor suppressor that

- requires deubiquitinating activity and nuclear localization. *Cancer Res*, 68(17) :6953–6962.
- Vermeulen, L., Sprick, M. R., Kemper, K., Stassi, G., and Medema, J. P. (2008). Cancer stem cells—old concepts, new insights. *Cell Death Differ*, 15(6) :947–958.
- Vetrini, F., Auricchio, A., Du, J., Angeletti, B., Fisher, D. E., Ballabio, A., and Marigo, V. (2004). The microphthalmia transcription factor (mitf) controls expression of the ocular albinism type 1 gene : link between melanin synthesis and melanosome biogenesis. *Mol Cell Biol*, 24(15) :6550–6559.
- Vidal, J. L., Bacin, F., Albuissou, E., Rozan, R., Desjardins, L., D’Hermies, F., Grange, J. D., Chauvel, P., Caujolle, J. P., and Sahel, J. (1995). "melanoma 92". epidemiological study of uveal melanoma in france. *J Fr Ophtalmol*, 18(8-9) :520–528.
- Waardenburg, P. J. (1951). A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. *Am J Hum Genet*, 3(3) :195–253.
- Waldman, F. M., DeVries, S., Chew, K. L., Moore, D. H., Kerlikowske, K., and Ljung, B. M. (2000). Chromosomal alterations in ductal carcinomas in situ and their in situ recurrences. *J Natl Cancer Inst*, 92(4) :313–320.
- Wang, H., Quah, S. Y., Dong, J. M., Manser, E., Tang, J. P., and Zeng, Q. (2007). Prl-3 down-regulates pten expression and signals through pi3k to promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 67(7) :2922–2926.
- Wang, P., Kim, Y., Pollack, J., Narasimhan, B., and Tibshirani, R. (2005). A method for calling gains and losses in array cgh data. *Biostatistics*, 6(1) :45–58.
- Warburg, O., Posener, K., and Negelein, E. (1924). Ueber den stoffwechsel der tumoren. *Biochemische Zeitschrift*, Vol. 152 :pp. 319–344.
- Weber, A., Hengge, U. R., Urbanik, D., Markwart, A., Mirmohammadsaegh, A., Reichel, M. B., Wittekind, C., Wiedemann, P., and Tannapfel, A. (2003). Absence of mutations of the braf gene and constitutive activation of extracellular-regulated kinase in malignant melanomas of the uvea. *Lab Invest*, 83(12) :1771–1776.
- Wehrle-Haller, B. (2003). The role of kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis. *Pigment Cell Res*, 16(3) :287–296.
- Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., Brummelkamp, T., and Marais, R. (2008). Oncogenic braf regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor mitf. *PLoS One*, 3(7) :e2734.
- White, V. A., McNeil, B. K., and Horsman, D. E. (1998). Acquired homozygosity (isodisomy) of chromosome 3 in uveal melanoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 102(1) :40–45.
- Wilhelm, M., Veltman, J. A., Olshen, A. B., Jain, A. N., Moore, D. H., Presti, J. C., Kovacs, G., and Waldman, F. M. (2002). Array-based comparative genomic hybridization for the differential diagnosis of renal cell cancer. *Cancer Res*, 62(4) :957–960.

- Wilkinson, K. D. (2000). Ubiquitination and deubiquitination : targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol*, 11(3) :141–148.
- Willenbrock, H. and Fridlyand, J. (2005). A comparison study : applying segmentation to array cgh data for downstream analyses. *Bioinformatics*, 21(22) :4084–4091.
- Worley, L. A., Onken, M. D., Person, E., Robirds, D., Branson, J., Char, D. H., Perry, A., and Harbour, J. W. (2007). Transcriptomic versus chromosomal prognostic markers and clinical outcome in uveal melanoma. *Clin Cancer Res*, 13(5) :1466–1471.
- Wu, X., Zeng, H., Zhang, X., Zhao, Y., Sha, H., Ge, X., Zhang, M., Gao, X., and Xu, Q. (2004a). Phosphatase of regenerating liver-3 promotes motility and metastasis of mouse melanoma cells. *Am J Pathol*, 164(6) :2039–2054.
- Wu, Z., Irizarry, R. A., Gentleman, R., Martinez-Murillo, F., and Spencer, F. (2004b). A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *Journal of the American Statistical Association*, 99(468) :909–917.
- Yang, J. and Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition : at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, 14(6) :818–829.
- Yarden, Y. and Ullrich, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, 57 :443–478.
- Yeung, K. Y. and Ruzzo, W. L. (2001). Principal component analysis for clustering gene expression data. *Bioinformatics*, 17(9) :763–774.
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. (2005). Gsk-3beta regulates phosphorylation of crmp-2 and neuronal polarity. *Cell*, 120(1) :137–149.
- Young, T. A., Burgess, B. L., Rao, N. P., Gorin, M. B., and Straatsma, B. R. (2007). High-density genome array is superior to fluorescence in-situ hybridization analysis of monosomy 3 in choroidal melanoma fine needle aspiration biopsy. *Mol Vis*, 13 :2328–2333.
- Yu, H., Mashtalir, N., Daou, S., Hammond-Martel, I., Ross, J., Sui, G., Hart, G. W., Rauscher, F. J., Drobetsky, E., Milot, E., Shi, Y., and Affar, E. B. (2010). The ubiquitin carboxyl hydrolase bap1 forms a ternary complex with yy1 and hcf-1 and is a critical regulator of gene expression. *Mol Cell Biol*, 30(21) :5071–5085.
- Zhang, D., Bar-Eli, M., Meloche, S., and Brodt, P. (2004). Dual regulation of mmp-2 expression by the type 1 insulin-like growth factor receptor : the phosphatidylinositol 3-kinase/akt and raf/erk pathways transmit opposing signals. *J Biol Chem*, 279(19) :19683–19690.
- Zhou, X., Rao, N. P., Cole, S. W., Mok, S. C., Chen, Z., and Wong, D. T. (2005). Progress in concurrent analysis of loss of heterozygosity and comparative genomic hybridization utilizing high density single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Genet Cytogenet*, 159(1) :53–57.
- Zuidervaart, W., van Nieuwpoort, F., Stark, M., Dijkman, R., Packer, L., Borgstein, A.-M., Pavey, S., van der Velden, P., Out, C., Jager, M. J., Hayward, N. K., and Gruis, N. A. (2005). Activation of the mapk pathway is a common event in uveal melanomas

although it rarely occurs through mutation of braf or ras. *Br J Cancer*, 92(11) :2032–2038.