

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

**Développement du modèle murin  $TyrCre:Pten^{(-/-)}Braf^{(V600E)}$ :Abcb5-IRESeGFP** pour l'étude du rôle d'ABCB5 comme marqueur des cellules souches de mélanome et mise au point d'un protocole d'immunohistochimie pour la cartographie de l'expression d'Abcb5 dans la souche murine **Abcb5-IRESeGFP**

Poncelet, Lucie

*Award date:*  
2015

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Université de Namur  
FACULTE DES SCIENCES  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

**Développement du modèle murin TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>:Abcb5-IRESseGFP pour l'étude du rôle d'ABCB5 comme marqueur des cellules souches de mélanome et mise au point d'un protocole d'immunohistochimie pour la cartographie de l'expression d'Abcb5 dans la souche murine Abcb5-IRESseGFP**

PONCELET Lucie

Résumé

ABCB5 est un transporteur ABC exprimé principalement dans les cellules pigmentées comme les mélanocytes. Plusieurs études suggèrent que cette protéine est un marqueur d'une sous-population de cellules caractérisées par des propriétés d'auto-renouvellement et de maintien tumoral. Cependant, ces cellules souches initiant le mélanome (MMIC, Malignant *Melanoma Initiating Cells*) sont très controversées. Il a été montré que les cellules de mélanome présentent une hétérogénéité phénotypique réversible et qu'elles sont capables de générer une tumeur indépendamment du marqueur qu'elles expriment. L'objectif de ce mémoire est de développer un modèle murin qui nous permettra d'étudier l'existence de cellules souches cancéreuses dans le mélanome et de vérifier l'hypothèse qu'ABCB5 est un marqueur de ces cellules. Ces souris développeront spontanément des mélanomes cutanés tout en exprimant une protéine fluorescente lors de la transcription du gène *Abcb5*. A court terme, les tumeurs seront analysées par cytométrie de flux afin d'isoler les cellules positives pour ABCB5 dont les caractéristiques de cellules souches seront évaluées. Si nous confirmons l'existence de MMIC, cette souche murine pourrait être utilisée pour tester diverses stratégies thérapeutiques. La création de ce modèle nécessite également la caractérisation des souches parentales *Abcb5-IRESseGFP* et TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup> que nous avons croisées. La cartographie du profil d'expression d'ABCB5 dans la souris *Abcb5-IRESseGFP* a été entreprise. Nous avons montré qu'ABCB5 était hautement exprimé dans le testicule. Sur base de ces données, nous avons mis au point un nouveau protocole d'immunohistochimie nécessitant une perfusion trans-cardiaque avec du paraformaldéhyde et de l'acide picrique. Nos résultats préliminaires indiquent qu'ABCB5 est exprimé au niveau de la couche basale des canaux séminifères, localisant cette protéine dans les cellules souches impliquées dans la spermatogonie. La validation de la souris TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup> a également été réalisée grâce à l'analyse et au diagnostic des tumeurs développées par cette souche.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2015

Promoteur: Jean-Pierre Gillet

# REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord, je tiens à remercier mon jury pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de mon mémoire et pour leur présence lors de ma défense.

Ensuite, je souhaiterais remercier toute l'équipe du Laboratoire de Biologie Moléculaire du Cancer (LBMC) pour leur gentillesse, leur aide et leur soutien. Plus particulièrement, je voudrais remercier le professeur Jean-Pierre Gillet pour sa disponibilité, sa confiance et ces bons conseils durant toute la durée de mon mémoire. Merci également à Jean-Martin pour ces nombreux conseils techniques et l'analyse de mes résultats. Je voudrais également remercier Caroline, Géraldine et Marie qui m'ont soutenues en répondant à toutes mes questions pour mes expériences. Merci également pour nos discussions non scientifiques et pour votre bonne humeur que vous avez insufflé durant toute la période de mon mémoire.

Je souhaiterais également remercier les membres du laboratoire de Génétique Moléculaire qui ont aussi participé à ma formation scientifique par leurs conseils, leurs explications et le matériel prêté. Un remerciement particulier à Coraline qui m'a énormément appris et qui a su m'orienter vers les bonnes personnes. Merci également à Dominique, Olivia mais aussi à Cédric, François, Maxime, Olivier et Typhanie pour tout ce qu'ils ont pu m'apporter.

J'adresse aussi un grand merci au Laboratoire Cellules et Tissus (LabCeTi) pour leur participation dans ma formation en histochimie et immunohistochimie. Plus précisément merci à Daniel Van Vlaender, Valérie Deglas et à Jérémy Malaise pour leur aide précieuse et le temps qu'ils m'ont consacré. Je tenais également à remercier le professeur Charles Nicaise et Joanna Bouchat pour leurs conseils dans la fixation trans-cardiaque des souris. Je souhaiterais également remercier Catherine Demazy pour son investissement dans mon projet, pour le temps passé au confocal et pour son optimisme.

Pour terminer, je voudrais remercier mes parents sans qui je ne serais jamais arrivée jusque-là et mon frère Damien pour son soutien. Enfin, un immense merci à Kévin qui, depuis le début de mes études, a toujours été là pour moi.

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

♂	Mâle
3'UTR	<i>Untranslated region 3' side</i>
4-HT	4-Hydroxytamoxifène
5'UTR	<i>Untranslated region 5' side</i>
AACR	Association américaine de la recherche sur le cancer
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AML	Leucémie myéloïde aigue
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CDK4/6	<i>Cyclin-dependant kinase 4/6</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependant kinase inhibitor 2A</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CL	<i>Cellules de Langerhans</i>
CSC	<i>Cancer stem cell</i>
Ct	Cycle
CTL -	Contrôle positif
CTL +	Contrôle négatif
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DPX	<i>Distyrene plasticizer and xylene</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EphA2	Ephrine-A2
ERK	<i>Extracellular signal- regulated kinase</i>
ES	Erythrosine-safran
EST	<i>Exchange sequences tags</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FBS	<i>Fœtal bovin serum</i>
GFP	<i>Green fluorescente protein</i>
GTI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
HES	<i>Hemalun-erythrosine-safran</i>
HH-GLI	<i>Hedgehog-Gli</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
ICL	Boucle intracytosolique
IF	Immunofluorescence
IgG	Immunoglobuline
IL-10	Interleukine 10

IL-2	Interleukine 2
IL-3	Interleukine 3
IL-8	Interleukine 8
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
Mart 1	<i>Melanoma antigen recognized by T cells-1</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MHC I	<i>Major histocompatibility complex class I</i>
MHC II	<i>Major histocompatibility complex class II</i>
MITF	<i>Microphthalmia transcription factor</i>
MMIC	<i>Malignant melanoma initiating cells</i>
MWT1	<i>Mâle wild-type 1</i>
MWT2	<i>Mâle wild-type 2</i>
MWT3	<i>Mâle wild-type 3</i>
NBD	<i>Nucleotide binding domain</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
PAR-2	<i>Protease-activated receptor-2</i>
Pb	<i>Paire de bases</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PC	<i>Phosphatidylcholines</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	<i>Paraformaldéhyde</i>
PGK	<i>Phosphoglycerate Kinase 1</i>
PI2K	<i>Phosphoinositol-2 kinase</i>
PI3K	<i>Phosphoinositol-3 kinase</i>
PIP3	<i>Phosphoinositol 3,4,5 triphosphate</i>
Pten	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RB	<i>Retinoblastoma</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT-PCR	<i>Real time-polymerase chain reaction</i>
SA- $\beta$ -Gal	<i>Senescence-associated acidic <math>\beta</math>-Galactosidase</i>
SOX2	<i>Sex-determining region Y-Box2</i>
SRY	<i>Sex-determining region Y</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription-3</i>
TMD	<i>Transmembrane domain</i>
Treg	<i>T régulatrice</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
VIP	<i>Vacuum infiltration processor</i>

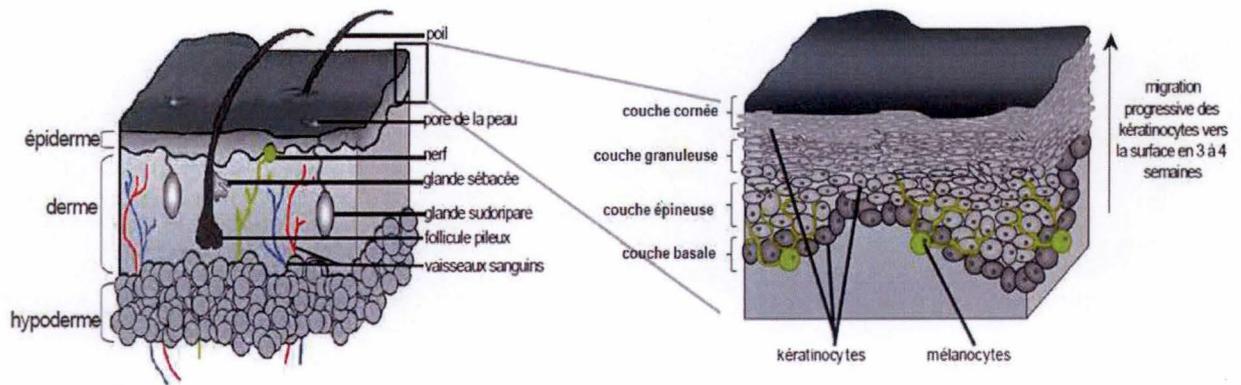
# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>6</b>
Incidence et mortalité du mélanome.....	6
Origine et fonctionnement des mélanocytes.....	7
Précurseur du mélanocyte : le mélanoblaste .....	7
Mélanocyte : la cellule pigmentée de la peau .....	7
Modèles de développement du mélanome.....	9
Modèle linéaire classique.....	9
Facteurs de risque induisant l'acquisition du phénotype malin .....	9
L'influence des rayonnements ultraviolets .....	9
Les facteurs génétiques fréquemment mutés .....	11
Modèle des cellules souches cancéreuses.....	13
Premières preuves expérimentales .....	13
Cellules souches dans le mélanome : problématique.....	14
Cellules initiatrices de mélanomes malins: un phénotype réversible .....	14
Méthodes de détection des cellules souches cancéreuses .....	15
ABC transporteurs .....	16
Super-famille des ABC transporteurs .....	16
Structure des ABC transporteurs .....	17
Modèles du cycle catalytique.....	18
Membres B des ABC transporteurs .....	18
Le transporteur ABCB5 .....	19
Rôles d'ABCB5 .....	20
Régulation de la fusion cellulaire.....	20
Implication d'ABCB5 dans les processus tumorigéniques .....	20
Production de cytokines pro-inflammatoires .....	20
Modulation de l'immunité anti-tumorale .....	21
Marqueur d'initiation de la mélanomagenèse .....	21
Résistance du mélanome aux traitements chimio-thérapeutiques.....	22
Objectifs du mémoire .....	23

<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>24</b>
Génération de souris transgéniques .....	24
La souche murine <i>Abcb5</i> -IRESeGFP .....	24
La souche murine TyrCre:Pten <sup>(-/-)</sup> Braf <sup>(V600E)</sup> .....	24
Génotypage des souris .....	24
Extraction et purification de l'ADN génomique.....	24
PCR.....	25
Souches murines génotypées .....	25
<i>Abcb5</i> -IRESeGFP.....	25
TyrCre:Pten <sup>(-/-)</sup> Braf <sup>(V600E)</sup> .....	25
Détermination du genre de la souris.....	26
Etude de la localisation de l'expression d'ABC5 .....	26
Détection du transcrit d'ABC5 dans des souris mâles <i>Wild-Type</i> .....	26
Extraction de l'ARN.....	26
Kit utilisé pour la transcription inverse .....	26
Real-time qPCR.....	26
Détection de la transcription d' <i>Abcb5</i> par la fluorescence de la eGFP sur les coupes histologiques .....	27
Séquençage de la souris <i>Abcb5</i> -IRESeGFP .....	27
Validation de l'anticorps anti-GFP <i>in vitro</i> .....	27
Culture cellulaire .....	27
Repiquage des cellules et transfection (Jour 1 et 2).....	27
Immunofluorescence (jour 3).....	28
Détection de l'expression d' <i>Abcb5</i> sur des coupes à congélation d'organes de souris par la mise en évidence de la protéine eGFP .....	28
Perfusion trans-cardiaque et prélèvement des organes.....	28
Immunohistochimie.....	29
Coupes histologiques de tumeurs générées par les souris TyrCre:Pten <sup>(-/-)</sup> Braf <sup>(V600E)</sup> .....	30
Extraction, fixation et mise en cassette des tumeurs.....	30
Déparaffinage.....	30
Coloration Hemalun – Erythrosine – Safran (HES) .....	31
Coloration Fontana-Masson.....	31
<b>RESULTATS .....</b>	<b>32</b>
Génération des modèles murins.....	32

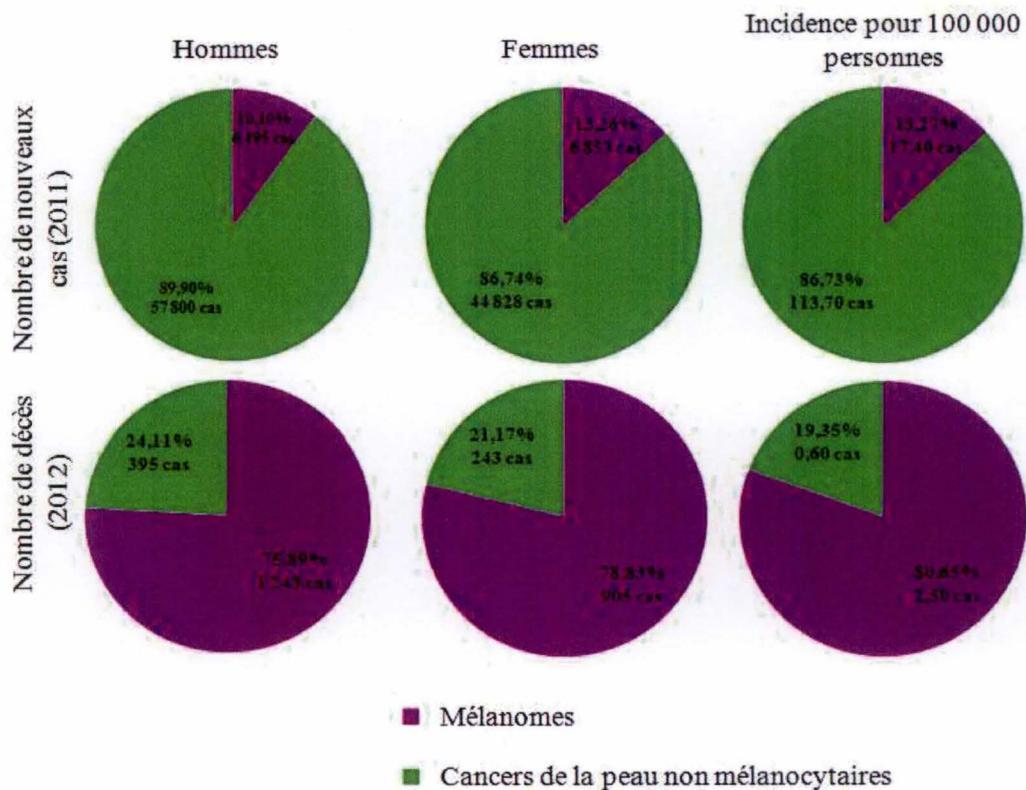
Souris <i>TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup></i> .....	32
Souris <i>Abcb5-IRESeGFP</i> .....	33
Souris <i>TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>:Abcb5-IRESeGFP</i> .....	34
Étude de la localisation d' <i>Abcb5</i> dans la souris .....	34
PCR en temps réel.....	34
Cartographie de l'expression d' <i>Abcb5</i> dans la souche murine <i>Abcb5-IRESeGFP</i> .....	35
Séquençage du transgène IRESeGFP .....	35
Validation des anticorps anti-GFP utilisés pour l'immunohistochimie .....	36
Mise au point du protocole permettant de préserver la fluorescence de l'eGFP dans des coupes à congélation de testicules.....	37
Analyses histologiques de tumeurs développées par la souche murine <i>TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup></i> .....	39
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>42</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>47</b>
<b>DONNEES SUPPLEMENTAIRES</b> .....	<b>56</b>



**Figure 1: Structure de la peau**

Le schéma de gauche représente une coupe transversale de la peau. Celle-ci est composée de trois couches successives: l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'image de droite correspond à un agrandissement de la couche épidermique qui est elle-même constituée d'une couche cornée, granuleuse, épineuse et basale. Les mélanocytes se retrouvent au niveau de la couche basale et envoient leurs prolongements dendritiques qui servent à alimenter en pigments les kératinocytes présents dans les couches supérieures.

D'après Chartrain M (2011) (122).



**Figure 2: Comparaison de l'incidence et de la mortalité des mélanomes et des cancers de la peau non mélanocytaires au Royaume-Unis**

Les graphiques en secteur de la ligne supérieure concernent le diagnostic de nouveaux cas de cancer de la peau en 2011 alors que la ligne inférieure recense le nombre de décès au Royaume-Unis en 2012 pour ces types de tumeurs. Ces chiffres correspondent aux deux grandes classes de cancers de la peau : les mélanomes (en mauve) et les cancers de la peau non mélanocytaires (en vert). Les deux premières colonnes concernent les hommes et les femmes respectivement. Pour terminer, la colonne de droite renseigne sur l'incidence du diagnostic de nouveaux cas et de la mortalité pour 100 000 personnes.

D'après les chiffres du rapport du Cancer Research UK (2014) (9).

# INTRODUCTION

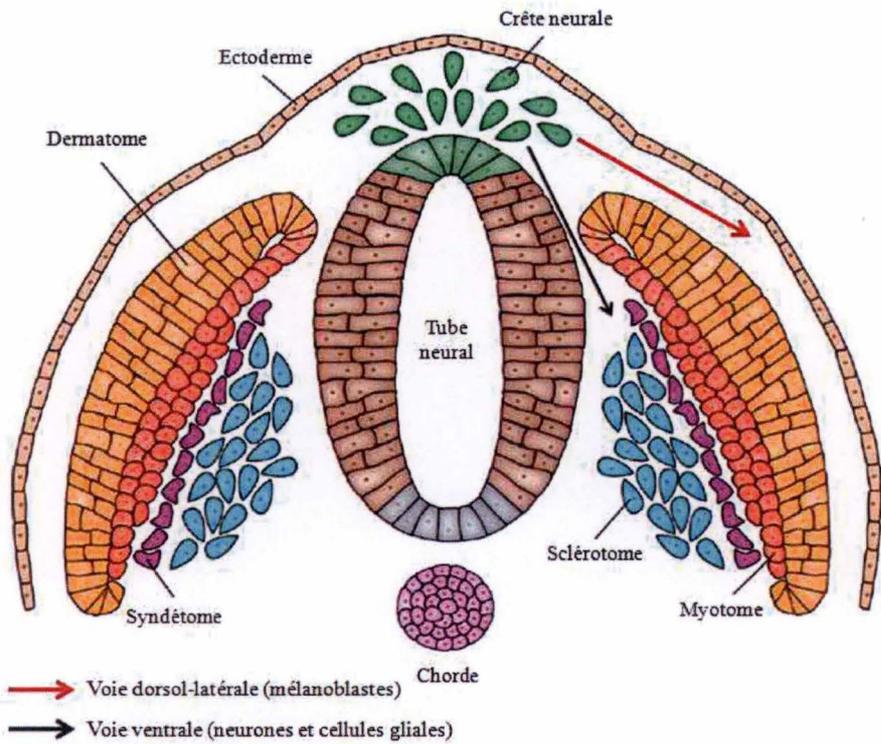
---

## Incidence et mortalité du mélanome

Le mélanome cutané est le type de cancer de la peau qui présente la plus forte augmentation d'incidence de ces trente dernières années (1, 2). Cette tumeur est très agressive avec, en Europe, 16 000 décès annoncés en 2012 (3). Il dérive d'un mélanocyte transformé, la cellule pigmentée de la peau. Deux autres types de tumeurs cutanées sont également rencontrés : les carcinomes baso- et spino-cellulaires, qui se développent à partir d'un kératinocyte. Elles constituent, à elles-seules, la majeure partie des cas de cancers de la peau non mélanocytaires. Cependant, même si elles sont caractérisées par une très forte incidence, elles ont, au contraire du mélanome cutané, une faible mortalité (4, 5). Ces trois catégories de tumeurs cutanées se développent au niveau de l'épiderme. Cependant, elles ne dérivent pas de la même couche épidermique (**Figure 1**) (5). En effet, le carcinome baso-cellulaire est localisé au niveau de la couche basale alors que le carcinome spino-cellulaire est uniquement retrouvé dans la couche épineuse de l'épiderme (5-7).

Il a été estimé, en 1991, que le mélanome représentait seulement une proportion de 3% de tous les cas de cancers de la peau mais qu'il était responsable de près de 65% des décès (8). De plus, les données épidémiologiques suggèrent que l'incidence des mélanomes a quadruplée depuis les 30 dernières années et que cette augmentation est particulièrement visible dans la tranche d'âge des plus de 65 ans (7). Selon le rapport statistique de la recherche contre le cancer au Royaume-Unis, plus de 13 300 cas de mélanomes ont été détectés en 2011 (**Figure 2**). Par conséquent, ils représentent, pour cette année, une incidence de presque 18 cas pour une population de 100 000 personnes avec une mortalité de 2.5 sur 100 000 personnes pour l'année 2012. Au total, près de 2150 personnes sont décédées suite à cette lésion. Les tumeurs cutanées non mélanocytaires ont été diagnostiquées chez plus de 100 000 britanniques en 2011 et sont responsables de près de 600 décès en 2012 (9).

Cet accroissement du nombre de cas détectés est lié, en partie, à la mise en place de nombreuses campagnes de prévention contre le cancer de la peau et à l'identification de facteurs impliqués dans le développement du mélanome (10, 11). Par exemple, la campagne belge Euromelanoma lancée pour la première fois en 1999 a pour but d'améliorer la prévention primaire et secondaire vis-à-vis de cette tumeur cutanée. Par l'information et l'explication des risques liés à l'exposition au soleil, par exemple, ainsi qu'à l'instauration de journées où les patients peuvent se faire examiner gratuitement par des dermatologues (11), elle a favorisé un diagnostic précoce de lésions cancéreuses. En effet, 95% des mélanomes peuvent être soignés lorsque ceux-ci sont rapidement détectés et excisés chirurgicalement (12). Au contraire, une détection tardive de ces lésions, lorsque celles-ci ont atteint la phase métastatique, est caractérisée par un faible taux de survie du patient. Cela s'explique, entre autre, par la faible efficacité des traitements chimio- ou radio-thérapeutiques due au développement de mécanismes de résistance de la tumeur vis-à-vis de ceux-ci (13-15).



**Figure 3: Schéma d'une coupe transversale lors de la migration des cellules de la crête neurale**

La fin de la neurulation est caractérisée par la migration des cellules de la crête neurale. Lorsque celles-ci utilisent la voie dorsale (en rouge) les cellules se différencient en mélanocytes. Si, au contraire, elles empruntent la voie ventrale (en noir), elles sont destinées à devenir des cellules neuronales et gliales.

D'après un schéma de Von Maltzahn, *Wnt signaling in myogenesis* (2012).

# Origine et fonctionnement des mélanocytes

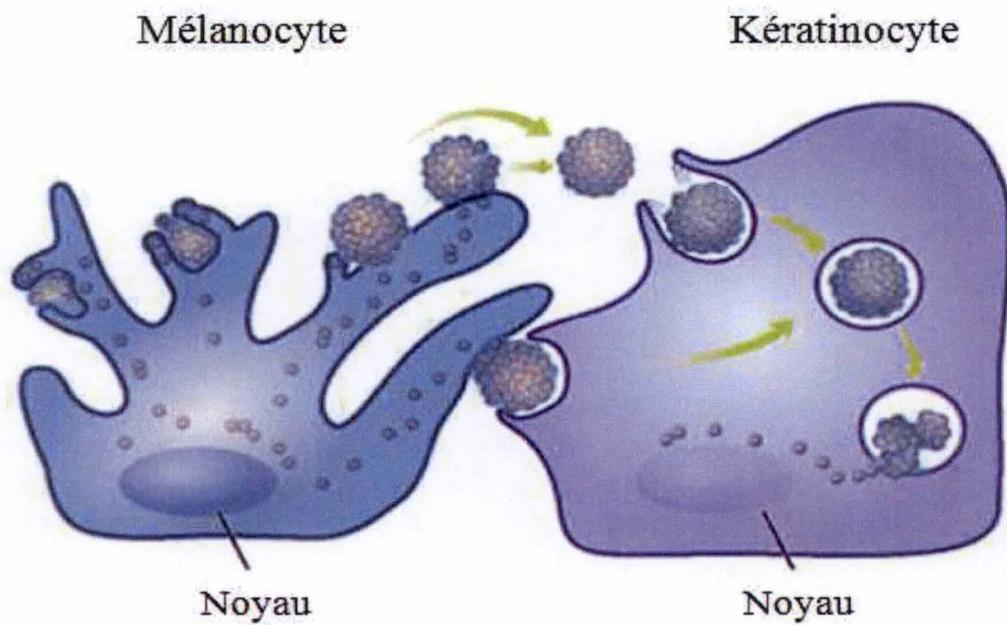
## Précurseur du mélanocyte : le mélanoblaste

Le mélanoblaste est une cellule indifférenciée ayant une origine commune avec les cellules gliales ou neuronales. En effet, ces types cellulaires dérivent tous du toit du tube neural (**Figure 3**) (16–18). Lors de l'embryogenèse, c'est l'utilisation de voies de migration particulières qui va déterminer leur destin : les cellules suivant la voie ventrale (entre les somites et le tube neural) donnent naissance aux cellules gliales et neuronales alors que les cellules empruntant la voie dorso-latérale (entre les somites et l'ectoderme) se différencient en cellules pigmentées (19). Plus précisément, les précurseurs des mélanocytes migrent entre le dermatome et l'ectoderme. Ils entrent ensuite dans une phase de prolifération importante qui se termine par le franchissement de la lame basale afin de permettre la colonisation de l'épiderme. Ce passage de la zone dermique vers la zone épidermique est suivi par la différenciation des mélanoblastes en mélanocytes. Il permet, par conséquent, d'évoluer d'un phénotype non-pigmenté à pigmenté (16, 19, 20). La différenciation terminale de ces cellules pluripotentes est, en quelque sorte, une conséquence de la localisation anatomique de celles-ci lors des différentes étapes de migration. En effet, de nombreuses voies signalétiques et protéines créent, par l'émission de signaux spatio-temporels, un environnement propice pour une migration et une différenciation normale. Par conséquent, leur mutation peut induire des problèmes dans certaines étapes. Par exemple, l'absence d'activité de MITF (*microphthalmia transcription factor*) induit un nombre limité en mélanocytes. D'autre part, des défauts de pigmentation peuvent également survenir suite à des mutations dans la voie signalétique de la  $\beta$ -CATENINE/WNT (20).

Cependant, toutes les cellules pigmentées ne dérivent pas de ce tissu embryonnaire. En effet, même si les cellules épidermiques ainsi que la couche choroïde de l'œil proviennent de la crête neurale, l'épithélium pigmenté rétinale a pour origine l'épithélium neural du calice optique (16, 21).

## Mélanocyte : la cellule pigmentée de la peau

La peau étant l'un des premiers organes en contact avec l'environnement extérieur, elle constitue une barrière de protection contre les agressions exogènes. Le dommage généralement rencontré est l'apparition de mutations dans l'ADN des cellules de l'épiderme soumises à une exposition prolongée aux rayons ultraviolets (5). Il existe donc, au niveau de la couche basale, un type cellulaire spécialisé qui permet de limiter ces altérations : le mélanocyte. Grâce à la production de mélanine, ces cellules fournissent non seulement une protection contre les dommages liés aux UVs mais ont également un effet thermorégulateur (22). Il existe 2 types de mélanines : l'eumélanine et la pheomélanine. L'eumélanine est un polymère insoluble noir qui donne une pigmentation foncée à l'épiderme alors que la pheomélanine est un polymère soluble rouge-jaune qui est caractéristique d'une peau claire, fortement sujette au développement de tumeur cutanée. Ces deux types de mélanine sont responsables de la diversité phénotypique en pigmentation de la population (20, 23–25). En effet, même si elles dérivent toutes les deux de la tyrosine, elles diffèrent selon leur couleur,



**Figure 4: Image schématisant le transfert de mélanosomes du mélanocyte vers le kératinocyte**

Les mélanosomes sont produits par les mélanocytes. Afin d'être transférés vers les kératinocytes voisins ces organites forment des superstructures au niveau de la membrane plasmique des mélanocytes. Ils vont ensuite être relâchés dans l'espace extracellulaire séparant les deux types cellulaires. Pour terminer, les kératinocytes vont les phagocyter et les mélanosomes vont se distribuer autour de la zone péri-nucléaire.

D'après Ando H (2012) (22).

leur taille, leur forme ou de la manière dont elles sont rassemblées dans les granules (20). Par conséquent, la grande variété de pigmentation dans la population n'est pas due à un nombre différent en mélanocytes, ni à une taille ou à un nombre de mélanosomes mais plutôt à la quantité et à la distribution d'une mélanine différente (20, 23–25).

La synthèse de l'eumélanine ou de la pheomélanine se produit au niveau d'un même mélanocyte. Plus précisément, elles sont générées dans le mélanosome, un organite semblable au compartiment lysosomal (20). Après leur synthèse, celles-ci sont transférées vers les kératinocytes. En moyenne, un seul mélanocyte alimente en pigments 36 kératinocytes voisins. Cependant, le transfert entre ces deux types cellulaires n'est pas bien caractérisé (26). Ando H. *et al.* ont proposé un modèle d'échange des mélanosomes : l'hypothèse de rassemblement, de libération, d'absorption et de dispersion (**Figure 4**) (22). Les organites contenant la mélanine synthétisée ont une structure similaire à celle des microvésicules d'excrétion. Avant d'être libérées dans l'espace extra-membranaire, elles bourgeonnent au niveau de la membrane plasmique des dendrites du mélanocyte. Elles sont ensuite phagocytées par les kératinocytes lors de leurs libérations dans le milieu extracellulaire. Cette étape est minutieusement contrôlée par la protéine PAR-2 (*Protease-Activated Receptor-2*). En effet, l'activation de ce récepteur uniquement présent sur les kératinocytes induit une importante polymérisation de l'actine au niveau de la région qui se trouve à proximité de la membrane plasmique du mélanocyte (26). Une fois dans le cytosol de cette cellule, les vésicules vont se dégrader progressivement dans le but de libérer la mélanine au niveau de la zone périnucléaire (22).

La mélanine constitue la photo-protection naturelle de la peau. En effet, ce pigment est capable de limiter les dommages de l'ADN grâce à ses propriétés d'absorption spécifique aux UVs. De plus, ce potentiel d'absorption diminue de manière exponentielle plus la longueur d'onde des rayonnements ultraviolets se rapproche de la lumière visible (27). Par sa capacité de transformer une énergie en une autre, la mélanine agit non seulement comme un filtre UV mais est également capable de détoxifier des xénobiotiques toxiques pour la cellule (27). Cependant, ce pigment peut également être responsable du phénomène de sensibilité face à la lumière (20, 27). En effet, plusieurs processus peuvent se produire lorsque la mélanine est soumise à la lumière. Elle peut être dégradée, se photo-ioniser ou produire des radicaux libres (27). Ces fonctions opposées sont en lien avec le fait que ce pigment peut être de deux natures différentes. En effet, l'eumélanine et la pheomélanine sont de structures chimiques différentes et n'ont donc pas les mêmes propriétés photochimiques et photobiologiques. De plus, l'indice de photo-protection pour ces deux types de mélanines est différent. Face aux UVs, les personnes ayant une peau très foncée sont mieux protégées par rapport à celles ayant une peau plus claire (27). En effet, par sa tendance à être photo-labile, la pheomélanine est généralement responsable d'une production d'espèces réactives en oxygène plus importante, au contraire de l'eumélanine. Par conséquent, les personnes de type Caucasiens sont plus susceptibles de développer des tumeurs cutanées par rapport au type Africain (20).

# Modèles de développement du mélanome

## Modèle linéaire classique

L'apparition d'un mélanome cutané fait suite à une série de transformations subies par le mélanocyte. Chacune de ces étapes est caractérisée par une identité phénotypique et architecturale (12, 28, 29). Le modèle linéaire de développement du mélanome rapporte que l'initiation de cette tumeur débute lors de la prolifération aberrante de mélanocytes suite à une mutation oncogénique. Cette multiplication clonale aboutit à la formation d'un nævus bénin. Cependant, cette lésion évolue rarement vers un stade malin (29) car ces mélanocytes hyperplasiques sont plongés dans une phase de sénescence cellulaire. Ils ont, par conséquent, perdu leur capacité de division (30). Toutefois, cette barrière peut être transgressée menant à la progression d'un nævus normal à un nævus dysplasique. L'étape suivante est la phase de croissance radiale. Ce stade est caractérisé par un accroissement latéral de la colonie mélanocytaire suite à l'activation de la télomérase. Cette phase possède une faible agressivité et un phénotype non-tumorigénique même si le nævus est constitué de cellules devenues immortelles. Son maintien nécessite, de plus, une interaction avec les kératinocytes. Le dernier stade de la mélanomagenèse est la croissance verticale. Celui-ci nécessite une mutation qui altère la fonction d'acteurs spécifiquement impliqués dans l'induction de l'apoptose. Il est caractérisé par un phénotype métastatique, une indépendance des kératinocytes et un faible taux de survie pour le patient. En effet, les mélanocytes mutés ont, alors, la capacité d'envahir le derme leur permettant de créer des foyers secondaires. Cette phase de croissance verticale peut être divisée en deux étapes. Dans les premiers temps, mêmes si des cellules isolées s'échappent de la masse tumorale, la majorité des mélanocytes reste agglutinés entre eux. La phase plus tardive de cette croissance est, au contraire, beaucoup plus agressive car le mélanome possède un potentiel de vascularisation et d'invasion très important (12, 28-30).

## **Facteurs de risque induisant l'acquisition du phénotype malin**

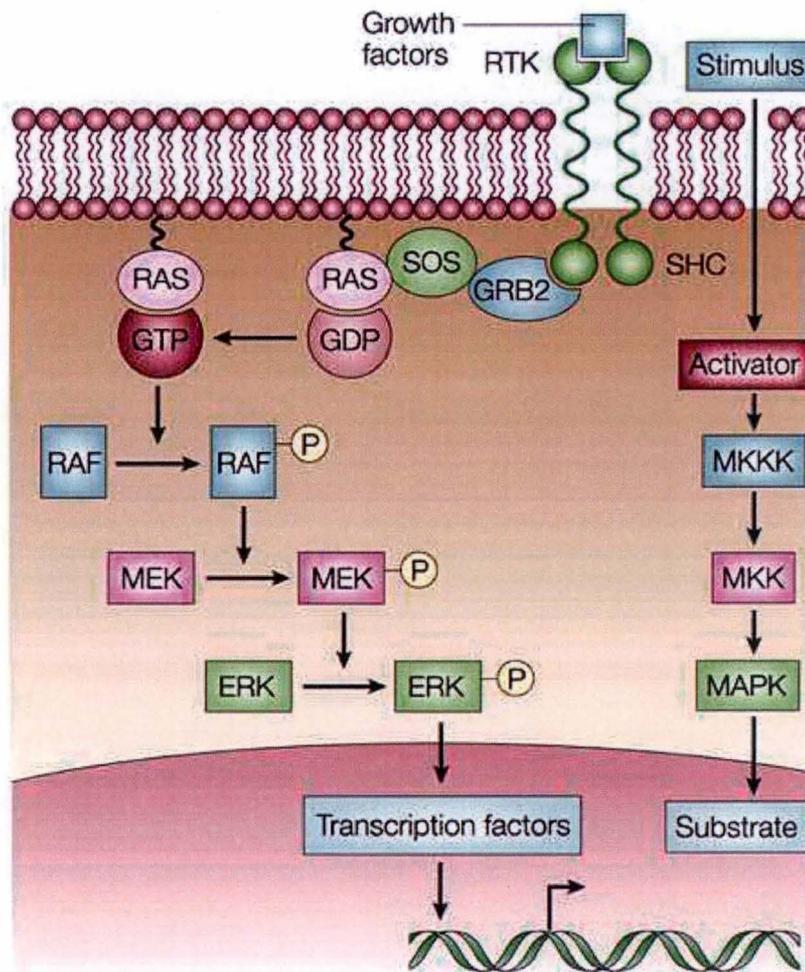
### *L'influence des rayonnements ultraviolets*

Les rayonnements ultraviolets (UVs) constituent un des risques étiologiques majeurs dans le développement des mélanomes. En effet, des études épidémiologiques ont, par exemple, montrées qu'une exposition importante aux rayons UVs durant l'enfance induit une augmentation de la probabilité de générer des tumeurs cutanées chez l'adulte. Le risque est d'autant plus grand lors d'importants coups de soleil (12). Ces ondes électromagnétiques sont divisées en trois groupes: les UVs-A (320-400 nm), les UVs-B (280-320 nm) et les UVs-C (200-280 nm). Seuls les rayonnements ayant une longueur d'ondes supérieures à 280 nm sont capables de traverser la couche d'ozone et d'atteindre la surface de la Terre. Cette particularité ne permet donc pas aux UVs-C d'accéder à l'atmosphère terrestre. Par contre, 95% des rayons sont, en fait, des UVs-A, alors que les 5% restant sont des UVs-B (23, 31). Les rayons ultraviolets de type A et de type B sont caractérisés par une pénétration de la peau et des effets biologiques qui leur sont spécifiques. Les UVs-A sont, par exemple, faiblement énergétiques mais sont capables de traverser plus profondément la peau. Ils vont, par conséquent, aller interagir avec les kératinocytes, les mélanocytes ainsi que les fibroblastes

situés dans le derme. Au contraire, les UVs-B fortement énergétiques vont être directement arrêtés par les couches supérieures de l'épiderme (31). Les dommages cellulaires sont également différents en fonction du type de rayonnement. Par exemple, les UVs-A sont responsables de l'induction de stress oxydatifs au sein de la cellule. En effet, ceux-ci génèrent de manière indirecte la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme des peroxydes d'hydrogène, des anions superoxydes, ou des radicaux libres hydroxyles. Ces ROS sont alors capables de réagir avec des lipides et des protéines menant à des dommages de l'ADN. De plus, les UVs-A pénétrant profondément dans l'épiderme, sont capables d'atteindre la couche basale épidermique où sont localisés les mélanocytes. A l'inverse, suite aux propriétés chromophores de l'ADN, les UVs-B vont directement interagir avec celui-ci, induisant la formation de dimères cyclobutaniques de pyrimidines ou des pyrimidones de pyrimidines (31).

Les dommages à l'ADN sont donc des conséquences bien connues de l'exposition cutanée aux rayons UVs. Cependant, les ultraviolets peuvent également être impliqués dans la dérégulation de certaines voies ou protéines. Il a, par exemple, été montré que ces rayonnements induisent une augmentation de l'expression de l'éphrine-A2 (EphA2) dans les mélanocytes (32). En conditions physiologiques, cette protéine coordonne la signalisation entre cellules par un ligand lipidique soit glycosylphosphatidylinositol (GTI) (éphrine-A) ou soit transmembranaire (éphrine-B) (33). Elle est également capable d'induire une mort cellulaire programmée chez les cellules ayant subies des altérations génomiques. L'activation de cette voie pro-apoptotique se fait de manière dépendante à la voie impliquant MEK mais de façon indépendante à p53. Celui-ci est un facteur de transcription impliqué dans la réponse aux dommages de l'ADN suite à l'exposition aux UVs de la classe B. Toutefois, Margaryan et son équipe ont montré que la surexpression de l'éphrine-A2 est impliquée dans les mécanismes tumorigéniques du mélanome. En effet, elle favorise les processus d'invasion, de prolifération ou de néo-vascularisation. De plus, l'inhibition de son activité *in-vitro* par un ARN interférant mène à une diminution de tous ces phénotypes métastatiques (28, 32). Par conséquent, ce récepteur tyrosine kinase a un rôle très contradictoire : en conditions physiologiques, il constitue une voie alternative à la mort cellulaire programmée induite par p53 alors que lorsqu'il est surexprimé, il favorise les processus métastatiques au sein du mélanome (33, 34).

L'exposition prolongée de la peau aux rayonnements ultraviolets peuvent induire un autre phénomène : la réduction des réponses immunes de manière locale ou systémique (35). En effet, par son interaction avec les mécanismes guidant la reconnaissance des antigènes, les rayons UVs-B induisent un phénomène d'immunosuppression : une exposition prolongée aux ultraviolets induit une augmentation de la génération de cellules T de type régulatrices qui expriment les marqueurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (35-37). Ces cellules ont pour fonction de réguler les réponses d'hypersensibilités et sont essentielles pour la tolérance aux antigènes du soi. Cette augmentation du nombre de cellules T régulatrices est étroitement liée aux interactions avec les cellules de Langerhans (CL). Il avait été, au départ, proposé qu'un contact prolongé des CL avec les UVs-B aboutissait à leur destruction. Cependant, Schwarz *et al.* ont fourni les preuves expérimentales qui s'opposent à cette hypothèse. Ils ont mis en évidence que les



**Figure 5: Activation de la voie RAS-RAF-MEK-ERK par la liaison d'un facteur de croissance au récepteur tyrosine kinase**

La liaison d'un facteur de croissance sur son récepteur tyrosine kinase induit la dimérisation de celui-ci et lui permet d'auto-phosphoryler ses résidus tyrosines intracellulaires. Grâce à la protéine adaptatrice GRB2, ce récepteur RK est capable de se lier avec un SOS cytosolique. La protéine SOS va, alors, se fixer à GTPase RAS qui va passer dans sa conformation active car celle-ci est liée à une molécule de GTP. RAS va alors enclencher une cascade de phosphorylation : RAF, MEK et ERK sont respectivement phosphorylés. ERK va alors migrer vers le noyau, se lier avec des facteurs de transcription et d'induire l'expression de gènes cibles. D'après Chin L. (2003) (51).

dommages de l'ADN des cellules de Langerhans peuvent être induits par les UVs. Celles-ci ne sont pas détruites mais migrent de l'épiderme vers les ganglions lymphatiques (35, 38). La nouvelle hypothèse proposée est que ces cellules endommagées sont toujours capables de présenter les antigènes mais de manière aberrante aboutissant à une induction plus importante en cellules T régulatrices (35).

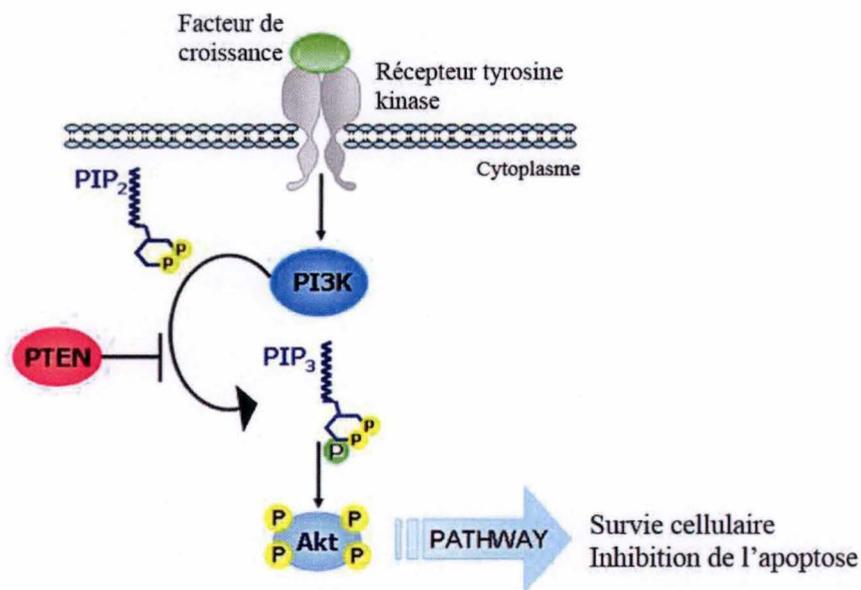
### ***Les facteurs génétiques fréquemment mutés***

#### *BRAF : activation*

Le récepteur tyrosine kinase BRAF constitue l'une des trois isoformes connues de la protéine RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*). Cette sérine/thréonine kinase joue un rôle clé dans l'activation de la voie signalétique Ras-Raf-MEK-ERK (39). En effet, la régulation de l'activité de la protéine ERK se fait principalement par celle-ci. En conformation inactive, BRAF est liée à la protéine dimérique 14-3-3, dans le cytoplasme. L'activation de cette isoforme B est induite grâce aux protéines activées situées en amont (**Figure 5**). La première étape est la liaison d'un facteur de croissance à un récepteur tyrosine kinase membranaire. Celui-ci va aller activer la protéine RAS. Cette GTPase, ancrée dans la membrane plasmique de la cellule, se lie à BRAF, induit sa phosphorylation ainsi que la libération de la protéine 14-3-3. Étant active, elle va alors phosphoryler MEK qui, lui-même, va activer ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) (40). Cette dernière migre vers le noyau, se lie aux facteurs de transcription et conduit à l'expression de gènes impliqués dans la survie ou la croissance cellulaire (41). BRAF et les protéines de la voie signalétique MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) participent à diverses fonctions physiologiques. En effet, elles sont impliquées dans le métabolisme ou la mort cellulaire, la progression du cycle cellulaire et régulent des fonctions neurologiques (39). Par exemple, des souris *knock-out* pour BRAF souffrent d'anomalies neuronales sévères (42).

L'altération fréquemment observée au sein du mélanome est la substitution d'une valine par un acide glutamique au niveau du codon 600 (BRAF<sup>V600E</sup>). En effet, cette mutation est retrouvée chez plus de 50% des patients souffrant de cette tumeur cutanée (43, 44). Cette modification mène à une augmentation de l'activité de cette sérine/thréonine kinase de plus de 480 fois. Par conséquent, elle induit une activation de la voie signalétique MEK 1 et MEK 2, ERK 1 et 2 (15, 45). Cette mutation va, d'une part, mener à la transcription intensive de gènes cibles et va, d'autre part, aboutir à un phénomène de résistance face aux signaux impliqués dans le *feed-back* négatif de ERK (41).

La mutation BRAF<sup>V600E</sup> est généralement rencontrée au sein de *nævi*. Ceux-ci sont maintenus dans une phase de croissance arrêtée, caractérisée par l'arrêt de leur cycle cellulaire. Placé dans un état de sénescence, ce type de tumeurs évolue rarement vers un stade malin (46). Dans des conditions physiologiques, ce phénomène est généralement induit lorsque les cellules ont subi un raccourcissement trop important de leurs télomères. L'arrêt de leur cycle cellulaire permet donc d'éviter une réplication aberrante qui pourrait alors produire des cellules tumorales. Or, les télomères des mélanocytes constituant le *nævus* bénin ne sont pas raccourcis alors que ces cellules sont positives pour des marqueurs de sénescence comme la protéine p16<sup>INK4a</sup> ou une haute activité de SA- $\beta$ -Gal (*Senescence-associated Acidic  $\beta$ -Galactosidase*) (46). Michaloglou *et al.* suggèrent qu'une forte activité de BRAF aboutit à



**Figure 6: Activation de la voie PI3K-PTEN-Akt suite à la liaison d'un facteur de croissance à un récepteur tyrosine kinase**

Suite à un stimulus extracellulaire (par exemple, un facteur de croissance), le récepteur tyrosine kinase ou le récepteur couplé à la protéine G est capable de phosphoryler la PI3K. La PI3K est alors activée et va pouvoir phosphoryler AKT afin que celui-ci adopte sa conformation active. Ensuite, AKT se transloque dans le noyau et va induire la transcription des gènes cibles. Celui-ci favorise la survie de la cellule ainsi que l'inhibition de l'apoptose. PTEN est capable de déphosphoryler PI3K, générant ainsi la PI3K inactive. Par conséquent, par sa fonction d'antagoniste, PTEN régule la voie signalétique PI3K-Akt.

D'après Molinari F. *Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer* (2013).

l'entrée des mélanocytes dans une sénescence induite par une oncogénicité (13, 45, 46). Par conséquent, la croissance initiale d'un nævus suite à la mutation BRAF<sup>V600E</sup> déclenche un processus de protection qui aboutit à un arrêt de la prolifération. Ce phénomène est, par exemple, enclenché suite à la surexpression de la protéine p16<sup>INK4a</sup>, un gène suppresseur de tumeurs. Par conséquent, l'activation mutationnelle de la kinase BRAF constitue l'une des premières étapes dans le développement d'un mélanome. Cependant, d'autres mutations doivent être nécessaires afin de transgresser la phase de sénescence et d'induire la progression des mélanocytes vers un stade malin (47).

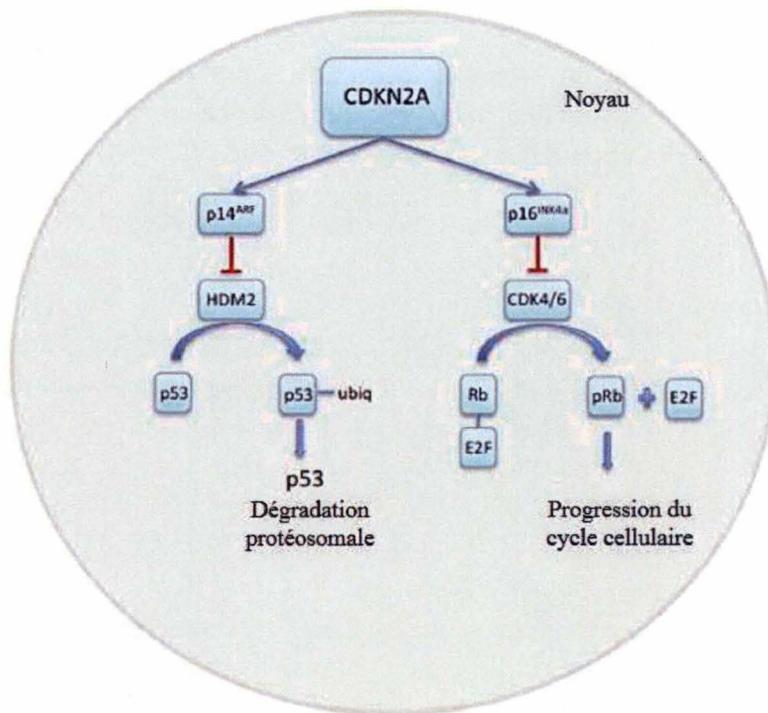
#### *PTEN et la voie signalétique PI3K-AKT*

PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) appartient à la famille des gènes suppresseurs de tumeurs. Cette phosphatase exerce son action sur deux substrats différents : les lipides et les protéines. Elle est capable, au niveau des substrats protéiques, de déphosphoryler les résidus sérine, thréonine et tyrosine alors que son action de phosphatase lipidique est exclusivement limitée au phosphoinositol 3, 4, 5 triphosphate (PIP3). Ce substrat lipidique est un acteur clé dans la voie signalétique de la phosphoinositol-3 kinase (PI3K). PTEN est généralement considéré comme le nouveau gardien du génome (48). En effet, comme déjà précisé, il est capable de réguler la voie signalétique de la PI3K qui maintient la survie cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (**Figure 6**). Il va induire la déphosphorylation de la PI3K dans le but de générer la PI2K. Celle-ci est alors incapable d'aller phosphoryler la protéine AKT. Par son rôle d'antagoniste, il limite ainsi l'activation d'AKT et évite alors la translocation de cette protéine vers le noyau en vue d'induire l'expression de gènes cibles (34). La fonction gène suppresseur de tumeurs de PTEN est également impliquée dans la maintenance de la stabilité génomique (48). Cette phosphatase peut également exercer son action sur des substrats protéiques. Par exemple, la protéine tyrosine non réceptrice FAK (*Focal Adhesion Kinase*) peut être déphosphorylée au niveau de ses résidus tyrosines. Par conséquent, PTEN est capable de réguler négativement les interactions cellulaires avec la matrice extracellulaire (48, 49).

La mutation de cette phosphatase protéique et lipidique est généralement un facteur responsable du développement de mélanomes. En effet, PTEN est inactivée chez plus de 50% des patients souffrant de cette tumeur cutanée. Au contraire, la mutation au niveau de son substrat lipidique (PI3K) n'est seulement détectée que dans 5% des mélanomes (34, 43, 47). De nombreuses données suggèrent que l'inactivation de PTEN et l'activation de BRAF sont des mutations généralement associées dans le mélanome et que celui-ci est caractérisé par une grande agressivité (13, 43). En effet, Vredeveld *et al.* ont montré que l'altération de la fonction de cette protéine suppresseur de tumeurs induit une forte activation de la voie signalétique de la PI3K. Suite à cela, le nævus, qui est initialement plongé dans une phase de sénescence induite par l'oncogène BRAF, va transgresser cette barrière de protection menant au développement d'un mélanome (50).

#### *CDKN2A et CDK4 : inactivation*

Le locus *CDKN2A* (*Cyclin-Dependant Kinase iNhibitor 2A*) est composé de 4 exons qui, suite à l'épissage alternatif, codent pour deux protéines : p16<sup>INK4a</sup> (exons 1 $\alpha$ , 2 et 3) et p14<sup>ARF</sup> (exons 1 $\beta$  et 2) (47, 51). Ces deux suppresseurs de tumeurs régulent des voies signalétiques



**Figure 7: Epissage alternatif du gène *CDKN2A* permettant la génération des protéines p16<sup>INK4a</sup> et p14<sup>ARF</sup>**  
 L'épissage alternatif du gène *CDKN2A* aboutit à la traduction de deux protéines gènes suppresseurs p16<sup>INK4a</sup> et p14<sup>ARF</sup>. Celles-ci sont impliquées dans des voies signalétiques différentes. La protéine p14<sup>ARF</sup> inhibe l'activité de HDM2. Elle contrôle donc l'ubiquitination de p53 et évite la dégradation protéosomale de celui-ci. La protéine p16<sup>INK4a</sup> régule de manière négative la fonction du complexe CDK4/6. Elle permet donc de limiter la phosphorylation de Rb et maintient son association avec le facteur de transcription E2F. Par conséquent, p16<sup>INK4a</sup> arrête la progression du cycle cellulaire.  
 D'après Bis S. (2013) (34).

différentes. Par conséquent, ils ne participent pas aux mêmes fonctions (**Figure 7**). En effet, par sa liaison avec le complexe CDK4/6 (*Cyclin-Dependant Kinase 4/6*), p16<sup>INK4a</sup> induit l'inhibition de l'activité de cette protéine. La kinase cycline dépendante 4/6 n'est donc plus capable de phosphoryler et donc d'activer la protéine RB (*RetinoBlastoma*) (43, 47). Cette protéine rétinoblastome a également un rôle de suppresseur de tumeurs. En effet, celle-ci oscille, durant le cycle cellulaire, d'un état hautement et faiblement phosphorylé. Les cellules caractérisées par un taux de prolifération important ont leurs protéines RB fortement phosphorylées. Au contraire, les cellules quiescentes ou différenciées possèdent un niveau bas de groupements phosphates sur leurs protéines RB (52). En condition inactivée, ce suppresseur de tumeurs est lié à un facteur de transcription liant l'ADN : E2F. Grâce à cette liaison, il est capable de réprimer la transcription de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Par conséquent, en conditions physiologiques, p16 mène à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Toutefois, lorsque celui-ci est muté, il va promouvoir la division cellulaire (43, 47). La deuxième protéine résultant de l'épissage alternatif de *CDKN2A* est p14<sup>ARF</sup>. La perte de fonctionnalité de celle-ci entraîne une déstabilisation de la protéine p53. Celle-ci est également un suppresseur de tumeurs qui assure le maintien de la fidélité de l'ADN. En conditions physiologiques, p14 inhibe l'ubiquitine HDM2 évitant ainsi la dégradation de p53. Sa mutation induit donc un ajout important d'ubiquitines sur la protéine p53, la guidant vers le protéasome afin qu'elle soit dégradée (34, 43, 47).

L'inactivation de ce gène se fait suite à une délétion, une mutation ou un *silencing* par hyperméthylation au niveau du promoteur du gène (47). Ce locus inactivé est souvent retrouvé dans de nombreux cas de tumeurs cutanées et est responsable du développement de mélanomes familiaux (34). Cependant, la partie du gène codant pour p14<sup>ARF</sup> est rarement mutée au contraire de la protéine p16<sup>INK4a</sup>. D'autres mutations peuvent également être rencontrées au niveau de CDK4 ou de RB, induisant une progression du cycle cellulaire (43).

## **Modèle des cellules souches cancéreuses**

### **Premières preuves expérimentales**

En 1994, travaillant sur la leucémie myéloïde aigue (AML), Lapidot *et al.* ont mis en évidence la présence d'un type cellulaire immature, caractérisé par une faible capacité de prolifération : les cellules initiant l'AML. Celles-ci étaient identifiées par l'expression de marqueurs au niveau de leur membrane cellulaire : CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>. De plus, leur transplantation dans des souris immunodéprimées permettait d'initier ce type de leucémie (53). Ces recherches constituent donc la première preuve expérimentale de l'implication des cellules souches dans l'initiation du cancer. Ces cellules ont été, par la suite, désignées sous le nom de CSC (*Cancer Stem Cell*). De plus, elles ont également été identifiées au niveau d'autres cancers comme celui du sein ou du cerveau (54, 55). Selon le rapport de l'Association Américaine de la Recherche sur le Cancer (AACR), les cellules souches cancéreuses constituent une sous-population de cellules autonomes caractérisées par une capacité d'auto-renouvellement et de maintien de la masse tumorale. Elles ont la faculté de se diviser de manière symétrique afin d'agrandir le réservoir des cellules souches ou de se différencier en des types cellulaires non tumorigéniques grâce à la division asymétrique (56).

Les cellules souches cancéreuses pourraient être de deux origines : soit les cellules souches normales deviennent cancéreuses suite à une accumulation de mutations au sein de leur génome, soit les cellules progénitrices acquièrent les propriétés des cellules souches également par l'association d'altérations génétiques. De plus, l'acquisition de telles propriétés ne se fait pas exclusivement lors de l'initiation tumorale. En effet, la tumeur en développement est également caractérisée par une certaine instabilité génétique et épigénétique et est également influencée par des interactions dynamiques avec l'environnement de la niche tumorale (56).

## **Cellules souches dans le mélanome : problématique**

L'initiation d'un mélanome suivant le mode linéaire de progression classiquement énoncé ne s'illustre que dans 26% des cas. Par conséquent, les mutations génétiques se produisant au niveau de mélanocytes différenciés ainsi que l'altération de mécanismes moléculaires ne constituent donc pas les seules causes du développement de ces tumeurs. De nombreuses données expérimentales tendent à prouver l'implication des cellules souches dans l'émergence de mélanome (57, 58).

C'est en 2005 que cette population tumorigénique a été, pour la première fois, isolée au niveau du mélanome (58). Fang *et al.* ont établi que 20% des métastases mélanomateuses étaient capables de former des sphères non adhérentes lorsqu'elles étaient placées dans un milieu spécifique des cellules souches embryonnaires humaines. De plus, elles conservaient une forte capacité d'auto-renouvellement. Elles étaient également capables de se différencier en une multitude de lignées cellulaires semblables aux cellules souches embryonnaires de la crête neurale. Dès lors, la présence de telles cellules au sein du mélanome serait donc responsable de l'hétérogénéité et de la grande tumorigénicité de celui-ci. Elles participeraient également à la plasticité morphologique et biologique de la tumeur [59].

Cependant, l'implication des cellules souches dans le développement des mélanomes reste encore, actuellement, controversée. Pour Quintana et ses collègues, les cellules issues de mélanomes présentent une hétérogénéité phénotypique réversible. De plus, la population tumorale n'est pas organisée de manière hiérarchique. Par conséquent, leurs recherches tendent à montrer que toutes les cellules constituant la population tumorale sont capables de générer indéfiniment des mélanomes lors de leur transplantation. De plus, les marqueurs exprimés par les cellules permettant de les identifier ont une expression réversible (59).

## **Cellules initiatrices de mélanomes malins: un phénotype réversible**

L'hétérogénéité et la plasticité de la tumeur sont deux critères biologiques pouvant être influencés en réponse à des stimuli émis par le milieu. En effet, les MMIC (*Malignant Melanoma Initiating Cells*) subissent certaines modifications phénotypiques réversibles suite à des stimuli externes. Ceux-ci peuvent être de natures très divers allant de l'hypoxie, aux signaux de différenciation ou aux molécules utilisées dans les traitements chimiothérapeutiques. L'influence du milieu sur l'hétérogénéité de la tumeur ainsi que sur sa plasticité a été démontré par des recherches publiées en 2013 par Ohanna *et al.* Dans cet

article, ils ont montré que les traitements chimio-thérapeutiques peuvent accroître le potentiel tumorigénique des cellules mélanomateuses par l'émergence de mécanismes de résistance. En effet, le contact de ces molécules avec les cellules tumorales peut favoriser un phénotype de sénescence au sein du mélanome. Ce phénomène aboutit alors à la production d'un sécrétome constitué de facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou le CCL2. La sécrétion de telles molécules peut activer la voie signalétique STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-3*). L'activation de celle-ci induit une reprogrammation des cellules somatiques et une augmentation du nombre de cellules souches initiant le développement du mélanome [61]. L'influence de cette protéine a également été validée grâce l'utilisation d'un ARN interférant. En effet, l'inhibition de STAT3 aboutit à une faible acquisition des propriétés des cellules souches de la tumeur [61].

D'autres acteurs peuvent également induire la reprogrammation de cellules somatiques différenciées en cellules souches pluripotentes [62]. Par exemple, SOX2 (*Sex-determining region Y (SRY)-Box2*), grâce à son action médiatrice sur la signalisation de HEDGEHOG-GLI (HH-GLI), induit le développement de progéniteurs multipotents de la crête neurale. De plus, elle est également responsable de l'induction de NANOG, OCT4 ou KLF4. Par son action, elle favorise donc le phénotype tumorigénique des MMIC alors que son inhibition aboutit à une apoptose des cellules mélanocytaires et un arrêt de la croissance tumorale [62].

## **Méthodes de détection des cellules souches cancéreuses**

Plusieurs méthodes existent dans le but d'identifier et d'isoler les cellules souches de la masse tumorale. Ces méthodes utilisent les propriétés de ces cellules dans le but de les isoler, à savoir : leur pouvoir tumorigénique chez les souris immunodéprimées, les marqueurs présents au niveau de leur surface cellulaire ou leur capacité de prolifération sous-forme de sphères non-adhérentes [63]. Cependant, chacune de ces techniques est accompagnées de certaines limitations qui ne permettent pas d'identifier avec certitude l'identité des cellules souches [57,63].

La technique de transplantation est la méthode *in vivo* la plus utilisée. Elle consiste à effectuer une première xélogreffe chez une souris immunodéprimée. Celle-ci est suivie d'une seconde transplantation dans une nouvelle souris afin d'évaluer la capacité d'auto-renouvellement des cellules (56). Cette technique a cependant certaines limitations techniques. Par exemple, le protocole de digestion utilisé pour l'isolation des cellules à partir d'échantillons cliniques peut engendrer un clivage des marqueurs cellulaires de surface. Les cellules souches présentes dans la tumeur ne seront donc pas identifiées comme telles. Un temps d'attente trop important entre l'isolation des cellules et leur greffe peut également induire une sélection des cellules étant capables de survivre au microenvironnement non physiologique [64]. De plus, comme l'activité des cellules souches normales est étroitement dépendante des signaux émis par son environnement, le site d'implantation de la greffe ainsi que la nature de l'animal doit être rigoureusement choisi [57,64]. Pour terminer, cette technique a le désavantage d'être longue et difficile à mettre en œuvre (56).

Une méthode *in-vitro* largement utilisée est celle de la formation de sphères par une mise en culture des cellules souches (56, 62, 64). Elle permet, non seulement, de mettre en évidence

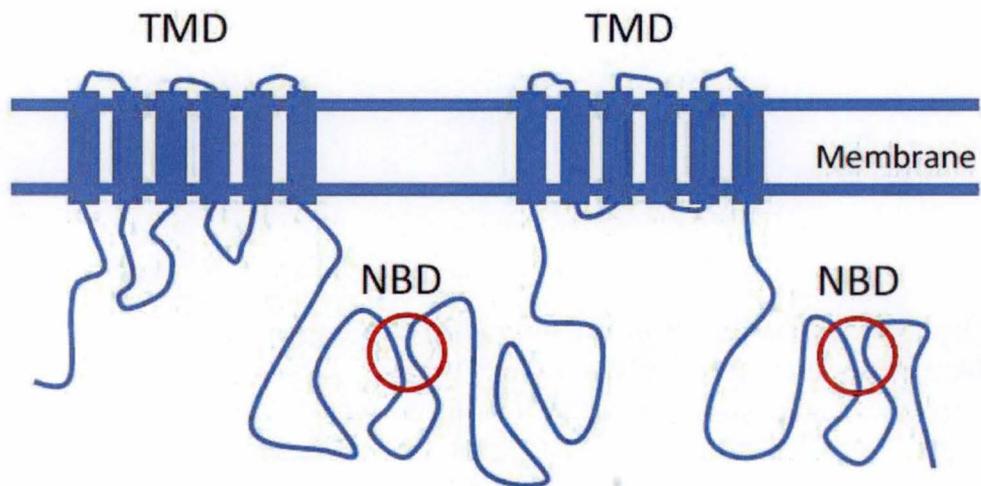
les cellules initiatrices de tumeurs et peut également contribuer à l'enrichissement de la masse tumorale en CSC. Pour rappel, les cellules sont repiquées dans un milieu qui diminue le phénomène d'agrégation cellulaire. Après plusieurs jours, les sphères sont récoltées, dissociées et repiquées à raison d'une cellule par puits. L'efficacité de formation de sphères est déterminée par le pourcentage de mélanosphères pour 100 cellules (62). Comme pour la xénotransplantation, cette technique présente certaines limitations... Par exemple, le milieu de culture ne fournit pas tous les facteurs vitaux et ne simule pas parfaitement le microenvironnement *in-vivo* (62, 64). Il est également difficile de discerner les agrégats cellulaires des cellules souches formant les sphères (62). L'identification de ces dernières se fait grâce à 3 critères. (1) Les cellules souches peuvent être transplantées. (2) La xénogreffe générée doit avoir la même identité histologique que les cellules d'origine parentale. (3) Elles doivent être capables de se différencier en plusieurs types cellulaires (64).

La cytométrie de flux est également une méthode utilisée *in-vitro* (56). Elle permet d'isoler les cellules sur base d'une expression spécifique de marqueurs. De nombreux candidats ont été proposés pour les cellules souches de mélanomes : CD133, CD166, CD271, Nestine, ABCB5, CD49f et CD90. Ceux-ci ne sont cependant pas forcément associés à une capacité de développer des tumeurs (62, 64-68). La PROMIN-1 ou CD133 est exprimée de manière stable au niveau des cellules mélanomateuses. Elle est un marqueur presque universel des cellules souches cancéreuses et sa sous-expression induit une diminution de la capacité des cellules cancéreuses à métastaser (65, 66). CD166 est généralement détectée au niveau des mélanomes cutanés primaires et est donc un signe de la progression de la tumeur. En effet, sa présence favorise l'invasion et la dissémination des cellules cancéreuses (65). De plus, elle active les molécules d'adhésion leucocytaire, les cellules T ou les monocytes. L'intégrine  $\alpha 6$  ou CD49f est capable de former un dimère avec les intégrines  $\beta 1$  ou  $\beta 2$  permettant ainsi l'attachement des cellules épithéliales à la matrice extracellulaire. La glycoprotéine CD90, qui est également l'antigène 1 des thymocytes différenciés, est impliquée dans les interactions entre les cellules ou entre les cellules et la matrice (64). La NESTINE marque les cellules souches neurales originaires de la lignée mélanocytaire (65). Le récepteur pour la neurotrophine (CD271) est également considéré comme un marqueur car les cellules positives pour cette protéine possèdent un potentiel métastatique très important, surtout lorsque celles-ci sont associées à la protéine B5 de la famille des ABC transporteurs (67). ABCB5 constituerait également un marqueur des cellules souches. Il est hautement exprimé dans les nævi pigmentés déjà positifs pour CD133 (65, 66, 69)

## **ABC transporteurs**

### **Super-famille des ABC transporteurs**

Les membranes cellulaires étant organisées en bicouches lipidiques, seules certaines petites molécules non chargées (urée, H<sub>2</sub>O) ou hydrophobes sont capables de diffuser au travers de celles-ci. Les cellules ont donc développé des moyens permettant à d'autres substrats de traverser ces membranes hydrophobes (70). Fondamentalement, il existe 4 grandes classes de protéines membranaires de transport : les canaux ioniques, les aquaporines, les transporteurs et les pompes à ATP. Ces dernières effectuent un transport dit actif en couplant le mouvement



**Figure 8: Structure d'un transporteur ABC typique**

Un transporteur ABC fonctionnel doit être constitué d'au minimum 2 domaines de liaison aux nucléotides (NBD) et 2 domaines transmembranaires (TMD). Les NBD contiennent des motifs fortement conservés, considérés comme des signatures de ces domaines, comme le Walker A et Walker B. Les TMD sont constitués de 6 hélices transmembranaires.

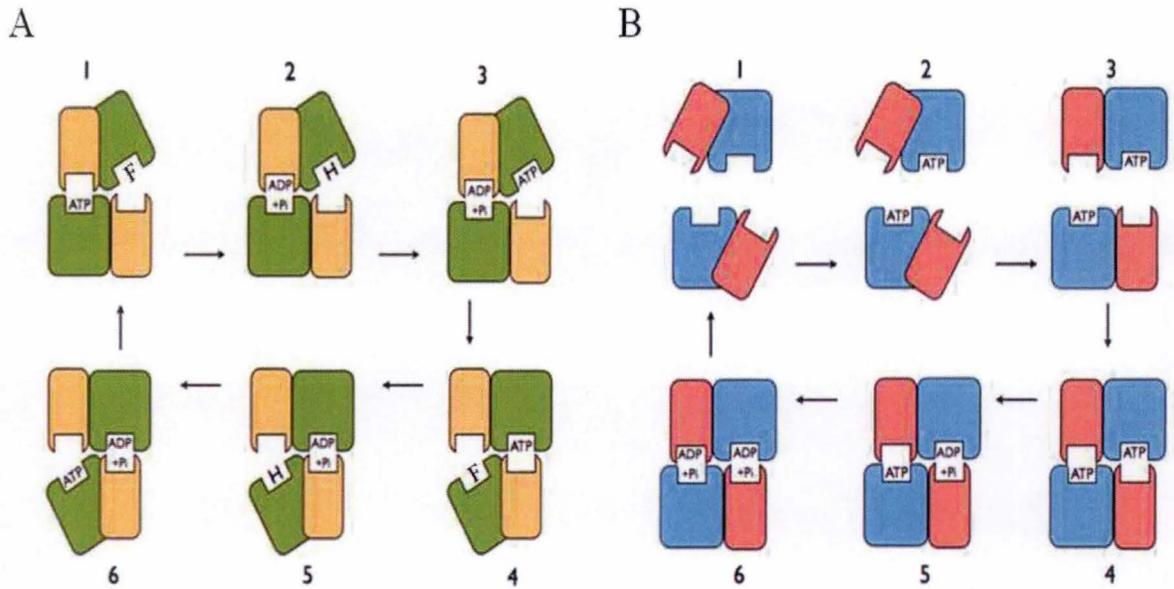
D'après Kavishe R. *Localization of the ATP-binding cassette (ABC) transport proteins PfMRP1, PfMRP2, and PfMDR5 at the Plasmodium falciparum plasma membrane* (2009).

d'un substrat, contre son gradient électrochimique, avec l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de molécules d'ATP (71, 72). Les protéines ABC (*ATP Binding Cassette*) sont l'une des familles protéiques les plus grandes et les plus diversifiées. Elles ont un rôle physiologique aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes comme les levures, les champignons, les plantes ou les animaux (71, 73, 74). Les protéines *ATP Binding Cassette* sont généralement divisées en 2 sous-familles : les ABC transporteurs et les non-transporteurs (75). La première, qui représente la majeure partie des protéines ABC, associe l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) à l'influx ou à l'efflux de molécules le long des membranes cellulaires (72). Au contraire, la seconde famille n'est pas associée à ces propriétés de transport mais se caractérise par des fonctions de maintenance et de réparation de l'ADN ainsi que par des propriétés de régulation génique (76). Rad50 est un exemple de protéine ABC n'ayant pas la fonction de transporteur. Il est impliqué dans les réparations des cassures double brins de l'ADN (76).

### **Structure des ABC transporteurs**

Actuellement, 48 ABC transporteurs ont été identifiés chez l'homme (73, 77). Grâce à une analyse basée sur la similarité des gènes, de l'ordre et de l'homologie des séquences des domaines protéiques, ceux-ci ont été répartis en 7 sous-familles (de A à G) (74). Un ABC transporteur fonctionnel doit être formé d'une structure de base constituée d'au minimum 4 domaines: 2 domaines de liaison aux nucléotides (NBD, *Nucleotide Binding Domain*) et 2 domaines transmembranaires (TMD, *Transmembrane domain*) (**Figure 8**). Les niveaux de conservation de ces domaines sont très différents. Les domaines NBD sont caractérisés par un très grand niveau de conservation. Tous les domaines nucléotidiques possèdent, en commun, des structures caractéristiques comme les motifs Walker A et B. Ceux-ci sont impliqués dans le processus de liaison de l'ATP. D'autres séquences comme le motif C ou les boucles D, Q et H sont également spécifiques aux NBD. Celles-ci sont considérées comme des signatures de la famille des protéines ABC (78–80). Au contraire, les domaines transmembranaires sont caractérisés par une grande diversité de séquences (78). Cette observation est cohérente avec la fonction de ceux-ci. Effectivement, la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, commune à toutes les protéines ABC, est induite par les domaines nucléotidiques. Inversement, les domaines de liaison au substrat, qui ont une spécificité pour seulement certains ligands, se localisent au niveau du TMD. Il faut donc que ces domaines transmembranaires soient très diversifiés dans le but de transporter le plus grand nombre de substrats possible (78, 81, 82).

Les domaines protéiques constituant l'architecture de base d'une protéine ABC ne sont pas localisés au même endroit dans la cellule. En effet, les NBD se situent à proximité de la membrane plasmique mais ne sont pas intégrés dans celle-ci. Au contraire, le TMD résulte d'un assemblage de 6 hélices  $\alpha$  transmembranaires par domaines. Cette structure constitue le canal qui permet aux molécules de traverser la bicouche lipidique (74, 78). De plus, le domaine protéique TMD possède également des structures qui ne se localisent pas au niveau de la membrane : les boucles intracytosoliques (ICL). Celles-ci permettent la communication entre les TMD et les NBD, couplant l'énergie générée par la liaison et l'hydrolyse de l'ATP au mouvement du substrat (75).



**Figure 9: Modèles de catalyse des domaines NBD au sein des protéines ABC**

La Figure A est une représentation schématique du *Constant Contact Model* (A) : une molécule d'ATP est liée au niveau d'un NBD, le monomère opposé est caractérisé par une faible affinité pour celle-ci (1). L'hydrolyse de l'ATP se produit, aboutissant à la formation d'une molécule d'ADP + Pi ainsi qu'un changement d'affinité pour le monomère opposé (2). Une nouvelle molécule d'ATP vient se lier sur le monomère de droite, en réaction à cette haute affinité (3). Cette liaison induit un changement de conformation au niveau du monomère opposé, la libération de la molécule d'ADP + Pi. Le monomère vide est caractérisé par une faible affinité pour l'ATP (4). Les étapes 5 et 6 illustrent la continuité du cycle.

La figure B est une représentation schématique du *Switch Model* (B) : les domaines de liaison des nucléotides sont séparés, ils sont dans la phase de récupération (1). Chaque NBD se lie à une molécule d'ATP (2) Cette liaison induit un changement de conformation des domaines (3) et ils vont s'associer afin de former un dimère (4). L'hydrolyse de l'ATP se produit au sein d'un des NBD et est suivi par une deuxième hydrolyse au niveau du domaine restant. Le transport est ensuite suivi par la libération des ADP + Pi (5-6) ce terminant par la phase de récupération du transporteur (1).

D'après George A. M (2013) (80).

## **Modèles du cycle catalytique**

Malgré l'existence de nombreuses études physiques et biochimiques, le mécanisme exact de fonctionnement d'un ABC transporteur reste incertain. Il existe, dans la littérature, deux hypothèses qui tentent de l'expliquer : le '*Switch Model*' et le '*Constant Contact Model*' (**Figure 9**) (75). Le mécanisme le plus largement accepté est celui du '*Switch Model*' : le domaine nucléotidique oscille entre un état symétrique fermé, lorsqu'il est associé avec 2 molécules d'ATP, et dans un état dissocié dans le cas contraire (83). Ce cycle est constitué de 4 grandes étapes. Le substrat vient, tout d'abord, se fixer au TMD ce qui permet d'initier le cycle de transport. Cette liaison induit une diminution du seuil d'activation du NBD suite à son changement de conformation. Cette étape permet d'augmenter l'affinité des domaines nucléotidiques pour les deux molécules d'ATP et aboutit à la formation du dimère en configuration fermée. Cette deuxième étape fournit l'essentielle de la force motrice et induit un changement de conformation des domaines transmembranaires. La troisième étape mène à l'ouverture de la configuration du dimère suite à l'hydrolyse de l'ATP qui déstabilise la forme dimérique fermée du NBD. Pour terminer, le phosphate inorganique ainsi que l'ADP sont relâchés de manière séquentielle. La protéine retourne à son niveau basal, restaurant alors l'état de haute affinité pour le substrat (75, 79). Le deuxième modèle proposé suggère que, l'association des deux NBD nécessite uniquement la liaison d'une seule molécule d'ATP à la fois. Ceux-ci sont couplés de manière asymétrique. De plus, l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate se produit de manière alternative permettant l'ouverture d'un seul NBD à la fois (75, 80, 83). Dans ce cycle, les monomères travaillent de manière séparés tout en étant étroitement liés. En effet, lorsque l'ATP vient se fixer sur le site de liaison d'un des domaines nucléotidiques l'autre NBD relâche l'ADP. A ce moment, le site non lié est caractérisé par une faible affinité pour l'ATP. De cette manière, ce dimère évite la liaison d'une deuxième molécule d'adénosine triphosphate. Le NBD lié hydrolyse alors l'ATP pour donner de l'ADP et un phosphate inorganique. Cette hydrolyse permet alors au monomère non lié de passer d'un état de faible affinité à un état de forte affinité pour les nucléotides (83, 84).

## **Membres B des ABC transporteurs**

La sous-famille B des protéines ABC, également désignée sous le nom de protéine MDR (*MultiDrug Resistance*) est composée de 11 gènes. Elle a la particularité de ne se retrouver que chez les mammifères et d'être la seule sous-famille rassemblant les deux types de transporteurs : 4 transporteurs typiques (ABCB1, B4, B5 et B11) ainsi que 7 demi-transporteurs (ABCB2, B3, B6, B7, B8, B9 et B10). Leurs localisations dans la cellule est également très variable. En effet, il est possible de les retrouver au niveau de la membrane plasmique, du réticulum endoplasmique, des lysosomes mais aussi dans les membranes mitochondriales (74, 85).

L'importante conservation des gènes ABCB sous-entend qu'ils ont un rôle physiologique important. De plus, la fonction de chaque transporteur est commune à tous les mammifères (86). Par exemple, le transporteur ABCB1 (MDR1/P-glycoprotein) qui est fortement exprimé au niveau des barrières physiologiques du cerveau, du foie, du pancréas ou de l'intestin constitue une protection des organes fragiles contre les composés et les métabolites toxiques

(73, 74, 85, 87). ABCB1 est la première protéine ABC à être caractérisée à cause de sa surexpression dans les cellules cancéreuses résistantes aux traitements chimio-thérapeutiques (88–90). Un autre exemple est celui de la sécrétion des phosphatidylcholines (PC) et des sels biliaires qui s'effectue, respectivement, grâce aux protéines ABCB4 et B11 au niveau du foie. Les protéines de cette famille peuvent également être impliquées dans l'immunité. En effet, les transporteurs B2 et B3 assurent le mouvement des molécules dégradées du cytoplasme jusque dans la lumière du réticulum endoplasmique permettant ainsi la présentation de ces antigènes aux complexes MHC-I (74, 85).

## **Le transporteur ABCB5**

Le gène codant pour le transporteur ABCB5 a été pour la première fois identifié en 1996. A cette époque seulement 13 séquences nucléotidiques d'ABC avaient été caractérisées chez l'humain. La technique utilisée est une méthode d'identification de gènes potentiels de protéines ABC dans des banques EST (*Exchange Sequences Tags*). Les séquences de référence utilisées étaient celles d'ABCB1 et ABCC7 ou CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Grâce à leurs analyses, Allikmets *et al.* ont réussi à identifier et à examiner la phylogénie de 21 gènes supplémentaires codant des ABC transporteurs (91).

Même si l'identification d'ABCB5 s'est faite il y a plusieurs années, cette protéine membranaire reste, actuellement, très peu caractérisée. La séquence génique de 141 kb codant pour cet ABC transporteur se situe au niveau du chromosome 7p21.1 et est constituée de 28 exons (92). Il existe, dans la littérature, 3 isoformes d'ABCB5 caractérisées: la structure typique de 1257 aa (138.641 kDa), ABCB5 $\beta$  de 812 aa (89.9 kDa), ABCB5 $\alpha$  de 131 aa (15 kDa) (93, 94).

L'isoforme codant pour le transporteur typique est la séquence ayant la plus grande homologie avec ABCB1. De plus, sa structure est similaire à celle d'un transporteur fonctionnel traditionnel (95). En effet, il est constitué de 2 TMD composés de 6 hélices transmembranaires et de 2 NDB. Cette protéine semble s'ancrer dans la membrane plasmique car elle possède 2 sites potentiels de N-glycosylation au niveau des boucles extracellulaires. Les analyses phylogénétiques et évolutives ont également montré qu'il n'y a pas eu, au cours de l'évolution, de modification majeure de la séquence nucléotidique. Cette haute conservation à travers le temps suggère qu'ABCB5 jouerait un rôle important au sein des lignées mammaliennes (93). Cependant, chez l'homme, cette isoforme ne se retrouverait pas exprimée au niveau des cellules pigmentées mais au sein des testicules et de la prostate (92, 93).

ABCB5 $\beta$  est considérée comme un demi-transporteur tronqué et serait actif suite à une dimérisation avec une autre unité. De plus, cette isoforme possède approximativement 70% de similarité avec ABCB1. Sa structure est formée par 2 domaines nucléotidiques dont un est tronqué suite à la perte de la région Walker A. Contrairement à l'isoforme entière de 1257 aa, la forme  $\beta$  est fortement exprimée au niveau de cellules souches de mélanome, de mélanocytes et d'autres cellules pigmentées. Il jouerait un rôle dans l'apparition du phénotype

de résistance aux traitements chimio-thérapeutiques (93, 96), ainsi que dans la régulation de la fusion des cellules progénitrices (93, 97).

ABCB5 $\alpha$  est la plus petite séquence codant pour une protéine ABCB. Au contraire des autres isoformes, sa petite taille ne lui permettrait pas de former la structure nécessaire pour composer un transporteur actif. Sa fonction hypothétique serait donc régulatrice. Tout comme ABCB5 $\beta$ , l'isoforme  $\alpha$  se retrouve au sein des cellules pigmentées (93, 96).

## **Rôles d'ABCB5**

### **Régulation de la fusion cellulaire**

En 2003, les recherches de Frank et collègues ont montré une implication de l'isoforme ABCB5 $\beta$  dans la fusion cellulaire. En effet, il a été montré que ce transporteur jouerait un rôle important dans la régulation du potentiel de membrane des cellules progénitrices déclenchant ce phénomène (97). Le processus de fusion cellulaire permet à certaines cellules mammaliennes adultes de maintenir un haut niveau de plasticité et de renouvellement. Cette particularité a été observée au niveau de la moelle osseuse en 2002. Cet organe est constitué de cellules souches mésenchymateuses et de cellules souches hématopoïétiques ayant pour fonction de produire les cellules sanguines. Celles-ci sont caractérisées par un phénotype pluripotent car leur transplantation induit une différenciation en de nombreux types cellulaires comme des cellules du foie, des muscles, ... Terada *et al.* ont montré, en culture *in vitro*, que des cellules murines de la moelle osseuse sont capables de fusionner spontanément avec des cellules souches embryonnaires (98). Ces cellules différenciées, devenues hyper-diploïdes, adoptent alors le phénotype des cellules réceptrices. C'est un phénomène de dédifférenciation ou trans-différenciation (98, 99). Cependant, leurs recherches parlaient d'un processus de fusion cellulaire spontané et que celui-ci pouvait être induit par l'ajout, dans le milieu, d'interleukine 3 (IL-3). Cependant, il s'est avéré, l'année suivante, que ce n'était pas un évènement spontané mais qu'il était plutôt spécifiquement régulé par l'isoforme ABCB5 $\beta$ . Plus précisément, lors de la fusion membranaire et nucléaire, seule une cellule doit être positive pour cette protéine  $\beta$ . Cette constatation a été faite grâce à des co-cultures de cellules souches mésenchymateuses et de cellules épithéliales. La fusion entre ces deux types cellulaires permet alors d'initier un *turn-over* ainsi qu'une capacité de renouvellement des cellules de la peau (97).

### **Implication d'ABCB5 dans les processus tumorigéniques**

#### ***Production de cytokines pro-inflammatoires***

Les recherches de Wilson *et al.* ont mis en évidence la relation qui existe entre l'expression d'ABCB5 au niveau des cellules cancéreuses, le maintien des MMIC (*Malignant Melanoma Initiating Cells*), la croissance tumorale et le phénotype de résistance aux drogues (100). D'autres données avaient déjà prouvé que la production d'IL-8 (InterLeukine-8) et la surexpression de ses récepteurs CXCR1 et CXCR2 menait à un phénotype de grande agressivité du mélanome. En effet, ces acteurs induisent la migration cellulaire, stimulent l'angiogenèse et favorisent la croissance des cellules tumorales (101). Dans son article, Wilson a prouvé qu'ABCB5 est capable de sécréter de l'IL-1 $\beta$  (InterLeukine-1 $\beta$ ). Celle-ci va

alors stimuler la production d'IL-8 par les cellules ABCB5 négatives qui constituent la majorité de la masse tumorale. Cette interleukine-8 produite est alors libérée dans le milieu extracellulaire et va activer les récepteurs CXCR1 exprimés au niveau des MMIC. Une communication autocrine s'effectue également par l'IL-1 $\beta$  qui active la production de l'IL-8 par les cellules souches du mélanome. Cette voie est importante pour le maintien de la masse tumorale durant les premières phases de métastases ou lors de l'absence de cellules négatives pour ABCB5 suite aux traitements thérapeutiques, par exemple (102).

### ***Modulation de l'immunité anti-tumorale***

Le concept d'immuno-surveillance des cancers a été énoncé il y a plus de 50 ans par Burnet (103). Bien que fortement controversée, plusieurs évidences ont permis de valider cette hypothèse. Par exemple, une immunodéficiência sévère chez la souris ou l'humain est associée à une augmentation du risque de malignité (104). De plus, les cellules tumorales ont la capacité de manipuler les acteurs du système immunitaire afin qu'elles soient considérées comme des cellules du soi. Ce processus, qui est appelé *immunoediting*, se déroule en 3 grandes étapes : l'élimination, la phase d'équilibre et la réponse d'échappement. La phase d'élimination est le concept de base de l'immuno-surveillance, les acteurs du système immunitaire reconnaissent les cellules aux caractéristiques tumorales et les détruisent. Vient ensuite la phase d'équilibre, où le nombre de cellules cancéreuses éliminées par le système immunitaire entre dans un équilibre dynamique avec le nombre de cellules tumorales résistantes. Elle est la plus longue des 3 étapes et peut durer plusieurs années chez l'homme. La dernière phase est celle de l'échappement, où les cellules tumorales ne sont plus reconnues comme telles. Elles peuvent donc grandir dans un environnement immunologique intact (105, 106). Selon les recherches de Schatton et collègues, les MMIC positives pour ABCB5 auraient les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de moduler les réponses immunes dirigées contre les tumeurs (107). En effet, ces cellules ABCB5<sup>+</sup> sont capables d'inhiber l'activation des cellules T médiée par l'IL-2 (InterLeukine-2) tout en induisant également une augmentation du nombre de cellules T régulatrices (Treg) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. De plus, elles n'expriment que très faiblement les antigènes spécifiques des mélanomes ou les complexes d'histocompatibilité majeure de classe I (MHC I). Elles expriment également les MHC II de manière aberrante et induisent la production de l'IL-10 (InterLeukine-10). Toutes ces modifications sont clairement impliquées dans le phénomène d'évasion des cellules tumorales au système immunitaire de l'hôte (107).

### ***Marqueur d'initiation de la mélanomagenèse***

L'implication d'ABCB5 en tant que marqueur des cellules initiant la mélanomagenèse a été pour la première fois évoquée en 2008 par Schatton *et al.* Leurs recherches ont effectivement mis en évidence la présence, au sein de la tumeur, d'une sous-population de MMIC exprimant ce transporteur. Leurs analyses histologiques de mélanomes fournissent également une cartographie de l'expression d'ABCB5 dans les tumeurs : les cellules positives pour celui-ci se localisent au niveau de zones peu différenciées dépourvues de mélanine. Au contraire, les cellules n'exprimant pas le transporteur se situent dans les parties différenciées de la tumeur et sont richement pigmentées. Leur étude s'est également intéressée à la capacité des cellules ABCB5<sup>+</sup> à générer des tumeurs par la transplantation de celles-ci dans des souris *Nude*. Ils ont

observé que ces cellules possédaient une capacité tumorigénique beaucoup plus importante que les cellules négatives pour le transporteur. De plus, elles sont capables d'engendrer une forte hétérogénéité au sein de la tumeur car la division de ces cellules peut aboutir à la génération d'une population cellulaire positive ou négative pour ABCB5 (69).

Une autre recherche est venue valider ces résultats. Leur objectif était de comparer l'expression du gène ABCB5 au sein de la peau normale par rapport aux mélanomes acraux, qui se développent au niveau de zones peu exposées aux UVs. Ils ont montré que ces tumeurs étaient toutes positives pour ce transporteur, à l'opposé de l'épiderme normal. L'expression d'ABCB5 étant très variable d'un échantillon à l'autre, il semblerait, cependant, que la régulation de ce transporteur soit spécifique d'un mélanome (108).

L'entièreté de la communauté scientifique n'est, cependant, pas totalement convaincue par l'hypothèse qu'ABCB5 peut être considéré comme un marqueur de MMIC. Quintana *et al.* ont effectivement publié des données contradictoires montrant que les cellules positives ou négatives pour ABCB5 possèdent, toutes les deux, la capacité de former des tumeurs lorsque celles-ci sont transplantées dans des souris *Nude* (59).

#### ***Résistance du mélanome aux traitements chimio-thérapeutiques***

Les mélanomes sont des tumeurs difficiles à soigner car celles-ci développent une résistance intrinsèque vis-à-vis des traitements conventionnels comme la radio- et la chimio- thérapies (95). Il semblerait qu'ABCB5 soit impliqué dans les mécanismes moléculaires de résistance. Les premières preuves de l'implication de ce transporteur ABC ont été présentées en 2005 par Frank *et al.* Dans cette étude, ils ont identifié ABCB5 comme un nouveau marqueur de la résistance des mélanomes aux agents chimio-thérapeutiques. En effet, les cellules exprimant ce transporteur affichent une rétention intracellulaire de molécules de doxorubicine plus faible. Afin de valider ce résultat, ils ont également bloqué l'activité d'ABCB5 par un anticorps. Le résultat est que celui-ci induit une accumulation plus importante de la doxorubicine dans la cellule. En effet, lorsque ce transporteur n'est plus fonctionnel, l'efflux de molécules en dehors de la cellule est diminué (109).

Une autre preuve expérimentale a également été apportée par Kawanobe *et al.* grâce à la transfection de cellules 293T avec un ADN complémentaire d'*ABCB5*. En effet, ces cellules montrent une augmentation de la résistance plus importante à la doxorubicine de 1.5 fois. Ces rapports sont de 2 à 3 fois pour le paclitaxel et le docetaxel. Ils ont également bloqué la traduction d'*ABCB5* avec, cette fois-ci, un ARN interférant. Comme pour les expériences menées en 2005, ce blocage induit une plus faible résistance des cellules en contact avec les taxanes et les anthracyclines (92).

Récemment, une étude menée par Keniya *et al.* a également apporté une nouvelle preuve expérimentale de l'implication d'ABCB5 dans ce processus. Le but de cette étude était de créer une levure *Saccharomyces cerevisiae* capable d'exprimer ce transporteur afin de savoir si celle-ci pouvait développer une résistance face aux traitements chimio-thérapeutiques. L'utilisation de cette levure permet de fournir des données expérimentales sur un eucaryote. Ce modèle est également dépourvu de protéines humaines pouvant interagir avec ABCB5 et est complètement délété pour 7 ABC transporteurs endogènes. Trois transfections ont été mise

en œuvre : un ARNm de la forme  $\beta$  et deux ADNc produisant la forme typique d'*ABCB5* harmonisé pour la levure ou pas. Seules celles contenant la protéine harmonisée ont développé un phénotype de résistance aux molécules chimiothérapeutiques (110).

## Objectifs du mémoire

L'implication des cellules souches dans le développement des mélanomes demeure controversée. En outre, le rôle d'*ABCB5* comme marqueur de ces cellules souches reste à élucider. L'objectif premier de ce mémoire est de générer une souche murine qui développe spontanément des mélanomes tout en exprimant la protéine eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) lors de la transcription d'*Abcb5*. Ces souris nous permettront donc de caractériser les cellules exprimant la protéine eGFP et de déterminer si elles possèdent bien des caractéristiques de cellules souches cancéreuses. Pour cela, nous avons croisé deux souches murines. L'une développée par Bosenberg et Mc Mahon:  $\text{Braf}^{\text{tm1Mmcm}}\text{Pten}^{\text{tm1Hwu}}\text{Tg}(\text{Tyr-cre/ERT2})13\text{BosJ}$ . Pour plus de facilité, cette souris sera désignée sous le nom de  $\text{TyrCre:Pten}^{(-/-)}\text{Braf}^{(\text{V600E})}$ . L'autre, développée par Gillet J-P *et al.* (données non publiées) et nommée *Abcb5-IRESeGFP*. En parallèle, un second objectif de ce mémoire a consisté en la mise au point d'un protocole d'immunohistochimie pour la cartographie de l'expression d'*ABCB5* dans la souche murine *Abcb5-IRESeGFP*. L'identification des types cellulaires exprimant ce transporteur permettra de générer des hypothèses qu'en aux rôles joués par *ABCB5* en conditions physiologiques.

# MATERIELS ET METHODES

---

## Génération de souris transgéniques

### La souche murine *Abcb5*-IRESeGFP

Cette souris transgénique a été générée par Gillet J-P. *et al.* (données non publiées). La construction a été introduite dans une souche de fond génétique C57Black/6J. Cette transgénèse additive s'est effectuée par l'insertion d'une cassette IRES-eGFP dans la région 3'UTR du gène *Abcb5*. Cette séquence est complétée par le gène de la néomycine floquée par des sites LoxP. La cassette de résistance a pu être enlevée par le croisement de la souris avec une souche murine transgénique exprimant la protéine de recombinaison Cre.

### La souche murine *TyrCre:Pten*<sup>(-/-)</sup>*Braf*<sup>(V600E)</sup>

Cette souris transgénique est issue du *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, USA). La souche a initialement été élaborée par Bosenberg *et al.* en 2009 (13) à partir d'une souris de fond génétique C57Black/6J. Plusieurs transgénèses additives ont été effectuées dans le but de créer une souche murine *knock-out* conditionnelle. Une cassette floquée par des sites LoxP a été insérée au niveau du chromosome 6 dans l'exon 14 du gène *Braf*<sup>(CA)</sup>. Celle-ci est constituée d'une partie de la séquence de ce gène (de l'exon 15 à l'exon 18) ainsi que d'une cassette de résistance à la néomycine. Une transgénèse ciblée a également été effectuée dans le but d'insérer la mutation *Braf*<sup>(V600E)</sup> au niveau du deuxième exon 15 présent. Une manipulation génétique du gène *Pten* situé sur le chromosome 5 a également été effectuée. Une cassette constituée de l'exon 5, floquée par des sites LoxP remplace celui de la souche murine. Une dernière transgénèse a été effectuée pour induire un génotype conditionnel des deux constructions précédentes: *TyrCreER*<sup>T2</sup>. Cette séquence est constituée du promoteur de la Tyrosinase ainsi que de son *enhancer* associé. La construction est suivie par le gène de fusion *CreER*<sup>T2</sup>. L'expression de la recombinaise Cre est inductible par l'hydroxytamoxifène (4-HT) (70% Z-isomer, Sigma, St. Louis, USA). Cet antagoniste des récepteurs à l'œstrogène est dilué dans du DMSO à une concentration de 50mg/ml (65-130mM). Il est appliqué sur la peau de souris jeunes (de 2,3 et 4 jours) ainsi que sur les souches adultes (de 6 à 8 semaines). La recombinaise Cre activée reconnaît les sites LoxP bordant les constructions insérées dans les gènes *Braf* et *Pten*. Elle induit leur excision et leur recombinaison dans le but d'activer les mutations. Comme cette cassette est contrôlée par la transcription de l'enzyme initiant la synthèse de la mélanine, elle est exclusivement exprimée dans les mélanocytes cutanés.

## Génotypage des souris

### Extraction et purification de l'ADN génomique

L'extrémité de la queue de la souche murine est coupée et digérée dans 200 µl de tampon de lyse (50 mM de KCl (Carl Roth, Lauterbourg, France), 10 mM de Tris HCl à pH 8 (Carl Roth, Lauterbourg, France) et 1% de Tween@20 (Promega, Madison, USA). L'échantillon est

soumis à une température de 95°C pendant 5'. Ensuite, 10 µl de Protéinase K (20 mg/ml) y sont ajoutés et l'échantillon est incubé durant la nuit à 55°C. Cette protéase est ensuite inactivée à 95°C pendant 5' et l'éppendorf est centrifugé à 14 000 rpm pendant 2'. Le surnageant contenant l'ADN génomique de la souris est purifié en utilisant le protocole de précipitation et de réhydratation de l'ADN (Promega, Madison, USA) suivant les conseils de la firme.

## **PCR**

Le mix PCR est obtenu grâce au mélange de la DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, Aalst), d'eau dépourvue de nucléase (Thermo Fisher Scientific, Aalst), des oligonucléotides spécifiques (**Table S1**) et de l'ADN génomique concentré à 100 ng/µl. Chaque PCR est effectuée dans le C1000 Touch Thermo Cycler (Bio-Rad Laboratories, Nazareth Eke, Belgique). Le résultat de celle-ci est visionné grâce à la migration du mix dans un gel d'agarose supplémenté par du bromure d'éthidium. Ce gel est immergé dans du tampon TAE (tampon Tris-Acetate (50X) 2 M de Tris Base, 0.1 M d'acide acétique glacial, 100 ml d'une solution de 0.5 M EDTA). La migration s'effectue dans une cuve Sub-Cell GT electrophoresis systems (BioRad, Hercules, USA) à un voltage de 130 V avec un ampérage constant de 300 A et une alimentation de 300 W.

## **Souches murines génotypées**

### ***Abcb5-IRESeGFP***

La détection de la cassette eGFP est permise grâce à l'utilisation des primers PG1. Ces oligonucléotides détectent le génotype *Wild-Type* de la souris (bande de 401 pb) et la cassette eGFP (bande de 2000 pb). Les souches hétérozygotes sont positives pour les deux bandes (celles de 401 pb et de 2000 pb). Le programme PCR utilisé est le suivant : 3' à 94°C suivi de 30'' à 94°C, de 30'' à 60°C ainsi que de 2'15'' à 72°C. Ces cycles sont répétés 34 fois et sont suivis de 10' à 72°C.

Une autre PCR est effectuée sur cette souche dans le but de détecter la présence de la séquence codant pour la recombinaison Cre. Les oligonucléotides utilisés sont les Cre 1 et Cre 2. Les souches possédant cette cassette génèrent une bande de 400 pb. Le programme utilisé est le suivant : 3' à 94°C suivi de 30'' à 94°C, de 30'' à 58°C ainsi que de 30'' à 72°C. Ces cycles sont répétés 29 fois et sont terminés par 10' à 72°C.

### **TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>**

Les oligonucléotides PG2 sont utilisés afin de détecter le gène *Braf* muté ou *Wild-Type*. Le programme PCR est le suivant : 3' à 94°C suivi de 30'' à 94°C et de 1' à 63°C ainsi que de 1' à 72°C. Ces cycles sont répétés 35 fois et sont suivis de 10' à 72°C. Cette PCR met en évidence une bande de 185 pb pour les souris *Wild-Type* ou une bande de 307 pb pour celle contenant le transgène inséré dans le gène de *Braf*. Les oligonucléotides PG11 sont utilisés afin de détecter la séquence insérée dans le gène de *Pten*. Le programme utilisé est le suivant : 3' à 94°C suivi de 30'' à 94°C, de 1' à 60°C ainsi que de 1' à 72°C. Ces cycles sont répétés 35 fois et sont terminés par 10' à 72°C. Les souris *Wild-Type* sont identifiées grâce à une

bande de 156 pb alors que l'allèle recombiné est mis en évidence par une bande de 327 pb. Pour terminer, la présence ou l'absence de *TyrCreER<sup>T2</sup>* est détecté grâce à l'utilisation des oligonucléotides PG12. Ceux-ci mettent en évidence la séquence du transgène à 100 pb associée à un contrôle interne à 324 pb. Le programme utilisé est le suivant : 3' à 94°C suivi de 30'' à 94°C, de 1' à 51,7°C ainsi que de 1' à 72°C. Ces cycles sont répétés 35 fois et sont terminés par 10' à 72°C.

### **Détermination du genre de la souris**

Afin de déterminer le sexe de la souche murine, une PCR utilisant les oligonucléotides Zfy 11 et Zfy 12 peut être effectuée. Celle-ci détecte la présence du chromosome mâle. Le programme PCR est le suivant : 3' à 94°C suivi de 30'' à 94°C, de 30'' à 57°C ainsi que de 30'' à 72°C. Ces cycles sont répétés 29 fois et sont terminés par 10' à 72°C. Les souris mâles sont identifiées grâce à la présence d'une bande de 250 pb.

## **Etude de la localisation de l'expression d'ABCB5**

### **Détection du transcrit d'ABCB5 dans des souris mâles *Wild-***

#### **Type**

#### **Extraction de l'ARN**

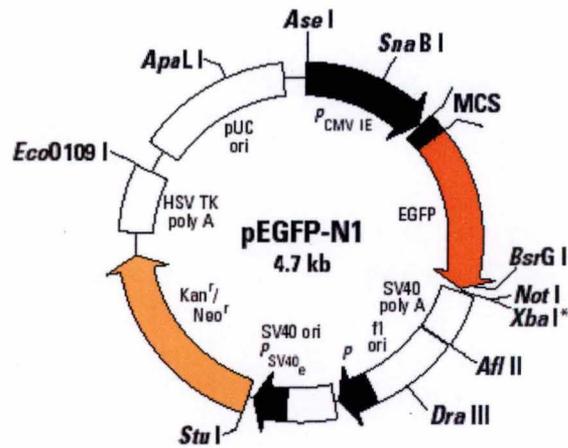
Après l'euthanasie des souris par dislocation cervicale, différents organes ont été prélevés : les testicules, les yeux, la peau de la queue, le duodénum, le petit intestin et le gros intestin. Chaque organe a été pesé et maximum 100 mg ont été utilisés pour effectuer l'extraction d'ARN. Ceux-ci ont ensuite été broyés et mélangés avec du TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, USA) et l'ARN total de chaque organe a été extrait selon les instructions de la firme (Applied Biosystems, Life Technology, Carlsbad, USA).

#### **Kit utilisé pour la transcription inverse**

L'ARN de chaque organe a été soumis à la transcription inverse dans le but de produire de l'ADN complémentaire. Le kit utilisé est celui de High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Qiagen, Venlo, Pays-Bas). Le protocole a été rigoureusement suivi en fonction des recommandations de la firme.

#### **Real-time qPCR**

L'expression d'ABCB5 a été mesurée en utilisant la chimie TaqMan. De plus, les mesures pour chacun des organes ont été dupliquées. Les sondes utilisées ciblent la forme typique d'ABCB5 (HS 03676539\_m1, HS 03676540\_m1, HS 03676541\_m1, HS 03698751\_m1) (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA). Le contrôle utilisé est celui du *housekeeping gene* 18S (HS 03003631\_g1). Les valeurs de Ct d'ABCB5 sont obtenues par le programme GQ Manager Software. La RT-qPCR a été effectuée dans un volume final de 20 µl contenant : 10 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life technologies, Carlsbad, USA), 1 µl de TaqMan assay, 8 µl d'eau dépourvue de nucléase et 1 µl d'ADN complémentaire (100 ng). Avant de lancer le programme, la plaque 96 puits est centrifugée afin d'assurer que le mix soit homogène. Cette réaction s'effectue avec le



**Figure 10: Cartographie du plasmide pEGFP-N1**

Vue schématique du plasmide utilisé pour la transfection des cellules 293T dans le but de valider la reconnaissance de la protéine GFP par l'anticorps. La transcription de l'eGFP est sous le contrôle d'un promoteur fort (CMV). La cassette de résistance permettant de sélectionner les bactéries électroporées avec le plasmide est la néomycine.

D'après <http://rintor.blog.163.com/blog/static/73181755201261425511634/>

StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life technologies, Carlsbad, USA). Le programme appliqué est le suivant : 2' à 50°C, 10' à 95°C, le troisième cycle se fait à une température de 95°C durant 15'' suivi par un dernier cycle d'une heure à 60°C.

## **Détection de la transcription d'*Abcb5* par la fluorescence de la eGFP sur les coupes histologiques**

### **Séquençage de la souris *Abcb5*-IRESeGFP**

Afin d'amplifier la quantité d'ADN, la PCR permettant de génotyper les souris *Abcb5*-IRESeGFP a été effectuée dans un volume total de 400 µl. Après migration sur gel d'agarose, les bandes ont été prélevées et purifiées selon le protocole DNA purification by centrifugation (Promega, Madison, USA) suivant les conseils de la firme. Plusieurs oligonucléotides ont été synthétisés afin d'assurer une grande fiabilité du séquençage. Les échantillons ont été envoyés à la firme Beckman Coulter (Pasadena, USA) afin d'effectuer le séquençage.

### **Validation de l'anticorps anti-GFP *in vitro***

#### *Production du plasmide pEGFP-N1*

Dans le but d'amplifier le plasmide pEGFP-N1 (**Figure 10**), celui-ci est électroporé dans des bactéries vides de souche *Escherichia coli* (DH5α). Celles-ci sont décongelées avec précaution sur la glace et 2 µl de plasmide sont ajoutés dans l'éppendorf contenant les *E. coli*. Le mélange est ensuite transféré dans une cuve adaptée pour l'électroporation et est soumis à un choc pulsé de 150 V grâce à l'appareil d'électroporation (Marksman Cellject Inc, Toronto, Canada). Après le choc électrique, les bactéries sont placées dans 500 µl de LB (*lysogeny broth*) pendant 1h à 37°C. Sous la flamme, 100 µl du mélange LB/bactéries électroporées sont étalés à l'aide d'un râtelier stérilisé. Cet étalement se fait dans une boîte de Petri sur du LB supplémenté de néomycine. Cette boîte est ensuite incubée toute la nuit à 37°C.

Un bouillon de bactéries est ensuite généré par la sélection d'une unique colonie bactérienne placée dans 250 ml de LB supplémenté de néomycine. Ce mélange est soumis à une agitation constante toute la nuit à 37°C. L'ADN plasmidique est extrait et purifié en utilisant le kit PureYield™ Plasmid Maxiprep System ((Promega, Madison, USA) selon les conseils de la firme.

#### *Culture cellulaire*

Les cellules 293T sont maintenues dans un milieu DMEM (Lonza, Verviers, Belgique) supplémenté par 10% de sérum fœtal bovin (FBS) (Sigma, St. Louis, USA) et de 100 unités/ml de pénicilline/streptomycine (Lonza, Verviers, Belgique). Les cellules en culture sont maintenues à 37°C avec une saturation en CO<sub>2</sub> de 5%.

#### *Repiquage des cellules et transfection (Jour 1 et 2)*

Les cellules 293T sont comptées avec le Vi-Cell counter (Beckman Coulter, Analys, Pasadena, USA). La transfection est effectuée sur des lames couvre-objet dans une plaque 24 puits CELLSTAR® Tissue Culture Plates (Greiner Bio One, Wemmel, Belgique). Afin d'améliorer l'ancrage des cellules, cette plaque est préalablement traitée avec de la p1274 α-

polylysine (70 000.150 000). Chaque puits est incubé avec 130 µl de polylysine (1 mg/10 ml) pendant 1h30 à une température de 37°C. La solution est ensuite aspirée et deux lavages sont effectués avec de l'eau stérile. Il faut s'assurer que la plaque soit sèche avant de repiquer les cellules. 70 000 cellules sont repiquées dans chaque puits afin d'atteindre une confluence de 70% pour la transfection.

Le mix pour la transfection est constitué, pour chaque puits, de 1,5 µl de Turbofect (Thermoscientific, Rockford, IL, USA), 0.50 µg d'ADN plasmidique (pEGFP-N1) et de 100 µl d'Opti-MEM (Gibco by life technologies, Carlsbad, USA). Ce mélange est ensuite distribué de manière homogène dans chacun des puits contenant du milieu DMEM avec 10% de FBS. Les cellules sont placées à 37°C avec une saturation en CO<sub>2</sub> de 5%. Le milieu de culture est remplacé afin de limiter la mort cellulaire 8h après la transfection.

### ***Immunofluorescence (jour 3)***

Les anticorps testés à une dilution de 1/200 sont : *GFP Rabbit IgG Antibody Fraction, Alexa Fluor®594 Conjugate* (A21312) et *GFP Rabbit IgG Polyclonal Antibody Fraction* (A-11122), [Life Technologies (Molecular Probes), Carlsbad, USA]. L'immunoglobuline primaire, qui est non couplée à un fluorochrome nécessite une incubation avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin dilué à 1/500: *Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody*, (Life Technologies, Carlsbad, USA).

Les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS (0,01M). Celles-ci sont ensuite fixées pendant 5' avec du PFA 4% (Carl Roth, Lauterbourg, France) et sont à nouveau rincées 2 fois avec du PBS (0,01M). Les 293T transfectées sont perméabilisées durant 5' à température ambiante avec une solution de 1% de Triton-X100 (Promega, Madison, USA) dilué dans du PBS (0,01M). Les sites antigéniques aspécifiques sont bloqués par 2 lavages des cellules avec une solution de PBS et 1% de BSA (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, USA). Les cellules ancrées sur les lames couvre-objet sont ensuite incubées avec l'anticorps anti-GFP dilué dans une solution de PBS (0,01M)/BSA (1%) pendant 2h en chambre humide, à température ambiante. L'anticorps A21312 est directement couplé avec un fluorochrome 594, il ne nécessite donc pas une deuxième incubation avec un anticorps secondaire au contraire de l'IgG A-11122. Après 3 rinçages avec la solution de PBS (0,01M)/BSA (1%), les cellules sont soit incubées avec l'anticorps secondaire ou soit leurs noyaux sont directement marqués avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) dilué 10 000 fois dans la solution de PBS (0,01M)/BSA (1%) et incubé à température ambiante pendant 5'. Pour terminer, les cellules sont à nouveau rincées avec du PBS et montées sur des lames porte-objet avec du Mowiol. Après être placées à une température de 4°C pendant au minimum une nuit, les lames peuvent être observées au microscope confocal (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

## **Détection de l'expression d'*Abcb5* sur des coupes à congélation d'organes de souris par la mise en évidence de la protéine eGFP**

### ***Perfusion trans-cardiaque et prélèvement des organes***

La souris est mise à jeun 4h avant la perfusion trans-cardiaque. Celle-ci est anesthésiée par une injection intra-péritonéale avec un cocktail de kétamine (75 mg/kg) et de médétomidine

(1 mg/kg) suspendus dans du PBS stérile (Lonza, Verviers, Belgique). La souris est placée dans un endroit calme et ses réflexes sont vérifiés 15min après l'anesthésie afin de s'assurer de la bonne sédation de celle-ci. L'animal est ensuite immobilisé pour réaliser la thoracotomie. L'oreillette droite est exsanguinée et le ventricule gauche de la souris est perfusé avec une aiguille de 25G (SurGuard2™ Safety Needles - Terumo Medical Products, Tokyo, Japon). Celle-ci est reliée, par un cathéter à une seringue de 60ml (Terumo, Tokyo, Japon). La souris est lavée de son sang grâce à la perfusion d'une solution de PBS (0,01M)/héparine (2unité/ml) (Heparin, Sodium Salt, Porcine Intestinal Mucosa, Calbiochem, San Diego, USA) placée à température ambiante. Cette solution est injectée à une vitesse de 6ml/min grâce à une pompe (Pump 22 - Harvard Apparatus, Holliston, USA). Suivant le premier protocole testé, une deuxième perfusion est réalisée avec une solution placée à 4°C de PBS (0,01M)/PFA (4%)/acide picrique (7%) injectée à une vitesse de 8ml/min puis avec une solution de PBS (0,01M)/sucrose (10%) à 4°C. Les organes sont extraits et placés dans une solution de PBS (0,01M)/sucrose (20%) à 4°C pendant une nuit. Ceux-ci sont ensuite mis en OCT (Q path, VWR International, Pennsylvanie, USA) et sont conservés à une température de -80°C. Le deuxième protocole testé nécessite, après la solution à 4°C de PBS (0,01M)/héparine (2unité/ml), une seconde perfusion avec du PBS (0,01M)/PFA (4%) à 4°C. Les organes sont directement prélevés et placés, pendant 2h, dans une solution de PBS (0,01M)/sucrose (15%) à 4°C. Ils sont ensuite immergés dans du PBS (0,01M)/sucrose (30%) pendant une nuit à 4°C. Pour terminer, les organes de souris sont mis en OCT et placés à une température de -80°C.

### ***Immunohistochimie***

Comme pour l'immunofluorescence sur les cellules 293T, les anticorps testés à une dilution de 1/200 sont : *GFP Rabbit IgG Antibody Fraction, Alexa Fluor®594 Conjugate* (A21312) et *GFP Rabbit IgG Polyclonal Antibody Fraction* (A-11122), [Life Technologies (Molecular Probes), Carlsbad, USA]. L'immunoglobuline primaire, qui est non couplée à un fluorochrome nécessite une incubation avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin dilué à 1/500: *Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody*, (Life Technologies, Carlsbad, USA).

Afin de ne pas altérer la présence de l'eGFP dans les tissus, cette immunohistochimie se réalise dans la pénombre. Les organes placés dans l'OCT sont déposés à une température de -25°C dans le crystat (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Des coupes de 10 à 15µm sont réalisées grâce à cet appareil. Pour le premier protocole (III), celles-ci sont placées à température ambiante pendant 5 min et sont ensuite immergées dans de l'acétone à 4°C pendant 10min. Les coupes sont ensuite rincées dans du PBS (0,01M) puis sont bloquées durant 30 min dans une solution de PBS (0,01M)/BSA (5%) (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, USA). L'anticorps primaire A21312 est dilué dans du PBS (0,01M)/BSA (1%) pendant 1h. Après le rinçage des coupes pendant 5 min, leurs noyaux sont colorés au DAPI, dilué à 1/10 000 dans une solution de PBS (0,01M)/BSA (1%). Pour terminer, les lames sont rincées 3 fois pendant 5 min dans du PBS (0,01M) puis elles sont montées au Mowiol. Le deuxième protocole d'immunohistochimie (II) requiert une incubation des coupes de 1h à température ambiante après la coupe des blocs d'OCT d'une épaisseur de 10 à 15µm. Les

lames sont ensuite immergées dans une solution de PBS (0,01M)/Triton-X100 (0,1%) puis elles sont bloquées par du PBS (0,01M)/Triton-X100 (0,1%)/sérum normale de chèvre (10%). L'anticorps primaire (A-11122) est incubé toute la nuit à 4°C, dilué dans la solution de blocage. Après 3 bains de rinçage dans du PBS (0,01M)/Triton-X100 (0,1%), l'anticorps secondaire (*Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody*, (Life Technologies, Carlsbad, USA) est incubé dans la même solution que l'IgG primaire placée à température ambiante pendant 2h. Après le rinçage des coupes pendant 5 min, leurs noyaux sont colorés au DAPI, dilué 1/10 000 dans une solution de PBS (0,01M)/Triton-X100 (0,1%). Pour terminer, les lames sont rincées 3 fois pendant 5min dans du PBS (0,01M) puis elles sont montées au Mowiol. Après être placées à une température de 4°C pendant au minimum une nuit, les lames peuvent être observées au microscope confocal (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

## **Coupes histologiques de tumeurs générées par les souris TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>**

### **Extraction, fixation et mise en cassette des tumeurs**

Les tumeurs sont prélevées après l'euthanasie par dislocation cervicale de la souche murine. Celles-ci sont fixées durant 24 h dans une solution de 4% de PFA (Paraformaldéhyde, Carl Roth, Lauterbourg, France) dissout dans du PBS (*Phosphate Buffer Saline*) à 0,01M. Les tumeurs sont placées dans des cassettes adaptées à leur volume et sont immergées dans du méthanol toute la nuit. L'inclusion en paraffine nécessite une déshydratation du tissu. Par conséquent, les cassettes sont placées dans le Tissues-Tek Vacuum Infiltration Processor (VIP) (Sakura Finetek, Torrance, USA) et vont subir différents traitements. La succession des différents bains est la suivante : 2 immersions dans du formol 4% de 90' à une température 35°C, les tissus sont ensuite soumis à 4 bains successifs de méthanol 100% de 45', ils sont suivis par 4 immersions dans du toluène à 35°C (2 pendant 45' et 2 autres pendant 60'), les 4 derniers bains se font dans la paraffine à 60°C pendant 60'. Les tumeurs sont ensuite mises dans une cassette de paraffine utilisant l'Histostar Embedding Station (Thermo-Scientific, Waltham, USA). Lorsque la paraffine est totalement solidifiée, le bloc est dégrossi avec le microtome Leica RM 2145 (GMI, Minnesota, USA). Lorsque toute la surface de l'organe apparait, celui-ci est ramolli grâce à un bain de 2h dans le Molliflex (VWR International Ltd, Poole, UK).

### **Déparaffinage**

Des coupes de tumeurs de 6 µm sont faites avec le microtome Leica RM 2145 (GMI, Minnesota, USA). Celles-ci sont ensuite montées sur des lames porte-objet SuperFrost®Plus (VWR International bvba, Leuven, Belgique) puis sont déparaffinées suite à différents traitements : 2 bains dans le toluène (le méthylbenzène est un bon solvant de la paraffine), 2 immersions dans du méthanol absolu (il sert de rinçage car celui-ci est miscible avec le toluène), 2 bains dans du méthanol 70% et 30% d'eau (permettant une réhydratation progressive du tissu). Chacun des bains a une durée de 3'. Pour terminer, les coupes sont

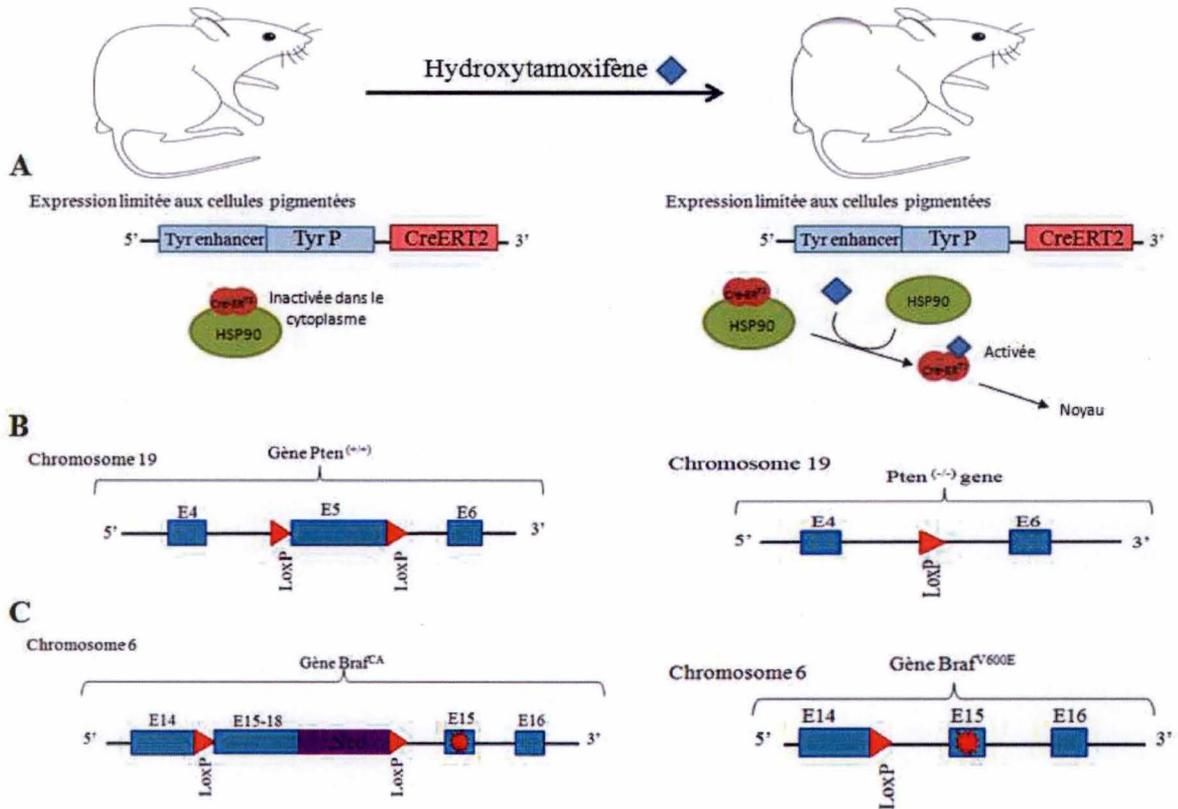
blanchies à l'eau de ville pendant 10' (ce traitement permet de réhydrater totalement le tissu et d'éliminer les traces éventuelles de méthanol).

### **Coloration Hemalun – Erythrosine – Safran (HES)**

La coloration HES permet de colorer les noyaux en bleu/violet (hémalun), ainsi que les cytoplasmes en rouge/rose (érythrosine) et les fibres conjonctives en jaune/orange (safran). Elle s'effectue grâce à l'immersion des lames dans différents bains utilisant le Medite Tissue stainer (Burgloff, Allemagne): un bain d'hémalun de 7' suivi par un rinçage à l'eau, 1' dans l'éthanol-HCl (qui est le différentiateur de l'hémalun), un bain de 6' d'érythrosine suivi par un bain de rinçage à l'eau. Les lames sont ensuite lavées pendant 1' dans de l'éthanol absolu puis sont plongées dans 3 bains de 2' dans de l'isopropanol absolu. Elles sont ensuite plongées pendant 8' dans le safran pour terminer par 3 rinçages dans l'isopropanol absolu ainsi que 3 bains dans le toluène. Après la coloration, les lames sont montées au DPX (Distyrene, Plasticizer and Xylene) et sont mises à sécher pendant une nuit.

### **Coloration Fontana-Masson**

La coloration Fontana-Masson met en évidence l'eumélanine en noir. Elle s'effectue grâce à l'immersion des lames dans différentes solutions. Chaque bain est suivi par 3 rinçages successifs dans de l'eau distillée. La première solution est celle d'argent ammoniacal durant 1h dans le noir. Ensuite les coupes sont plongées dans une solution de cajal pendant 10' puis dans du  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$  (5 g/100 ml d'eau distillée) durant 5'. Une contre coloration ES (Erythrosine – Safran) peut être faite. Les lames sont montées avec du DPX.



**Figure 11: Souche murine  $TyrCre:Pten^{(-/-)}Braf^{(V600E)}$**

Cette souche résulte de l'insertion de trois constructions différentes dans une souris C57Black/6J. Le transgène  $TyrCreER^{T2}$  est constitué du promoteur de la tyrosinase, de sa région *enhancer* ainsi que du gène de fusion  $CreER^{T2}$  (A). La recombinase Cre est fusionnée avec un récepteur à l'œstrogène modifié et est uniquement produite dans les cellules pigmentées. En effet, sa séquence génomique est sous le contrôle du promoteur de la tyrosinase, une enzyme impliquée dans la production de la mélanine. La protéine de fusion  $CreER^{T2}$  est séquestrée dans le cytosol suite à sa liaison avec la HSP90 (*Heat Shock Protein 90*). Sa forme activée est induite par l'application cutanée de tamoxifène/4-hydroxytamoxifène. Cette molécule se fixe sur le récepteur à l'œstrogène menant à la libération de la recombinase. Elle migre ensuite vers le noyau et induit la recombinaison des séquences bordées par les sites LoxP. La deuxième construction est insérée, au niveau du chromosome 19, dans la séquence du gène codant pour la protéine Pten (B). Ce transgène a été créé de manière à générer une souris *knock-out* conditionnelle pour ce gène. L'exon 5 constituant cette séquence génomique est bordé par des sites LoxP. Il sera, lors de l'activation de la recombinase Cre, excisé. La dernière construction, floquée par des sites LoxP, est localisée dans l'exon 14 du gène codant pour la protéine Braf, au niveau du chromosome 6 (C). Celle-ci est constituée d'une partie de la séquence de ce gène (de l'exon 15 à l'exon 18) ainsi que d'une cassette de résistance à la néomycine. Une transgénèse ciblée a également été effectuée dans le but d'insérer la mutation  $Braf^{(V600E)}$  au niveau du deuxième exon 15 présent.

# RESULTATS

---

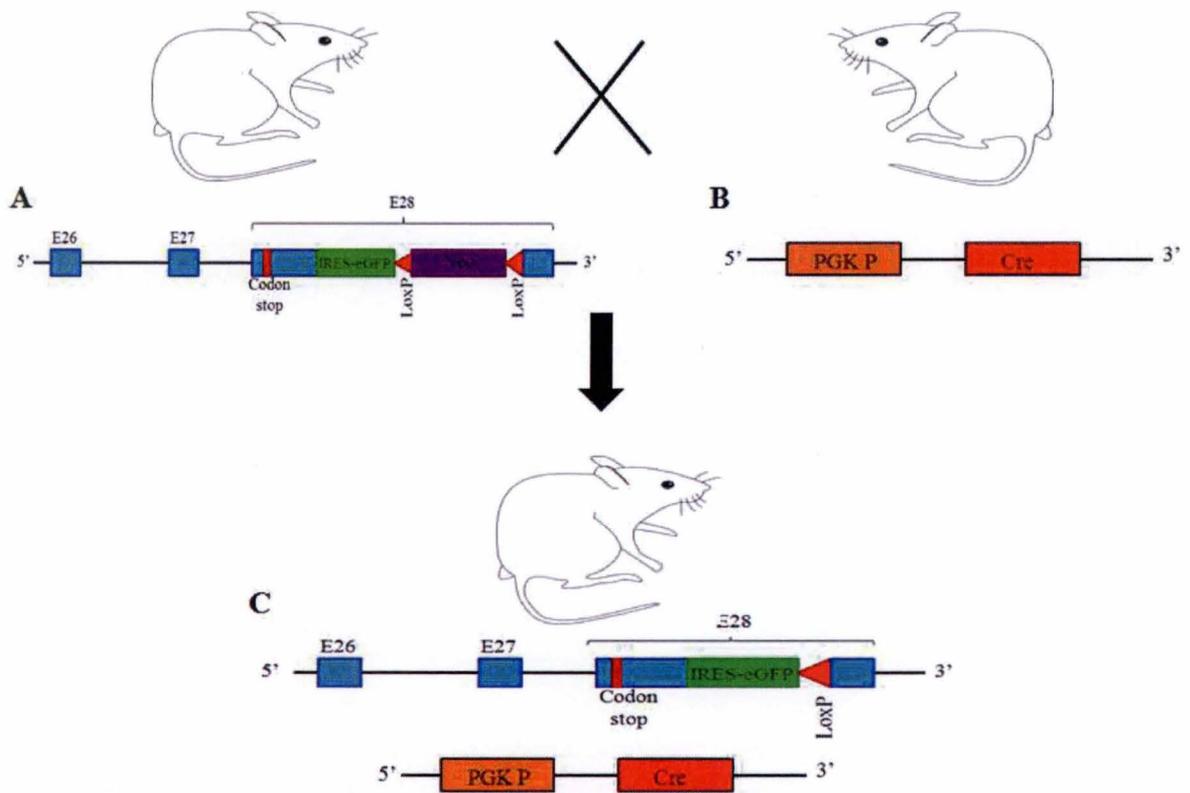
## Génération des modèles murins

### Souris *TyrCre:Pten*<sup>(-/-)</sup>*Braf*<sup>(V600E)</sup>

Cette souche murine a été commandée chez *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, USA). La colonie a été créée à partir d'un mâle *Braf*<sup>tm1Mmcm (+/-)</sup> *Pten*<sup>tm1Hwu (+/-)</sup> Tg (*Tyr-cre/ERT2*)13Bos<sup>(+/-)</sup> et d'une femelle *Braf*<sup>tm1Mmcm (+/-)</sup> *Pten*<sup>tm1Hwu (+/-)</sup> (numéro de stock #013590). Selon cette institution, les souris qui sont hémizygotés pour le transgène *TyrCreER*<sup>T2</sup>, hétérozygotés pour l'allèle *Braf* et homozygotés pour l'allèle *Pten* pourvu de sites LoxP, sont viables et fertiles. Cependant, 25% de la colonie est susceptible de développer des mélanomes de manière spontanée après 2 à 12 mois. L'induction de ces tumeurs est induite grâce à l'application topique de Tamoxifène/4-Hydroxytamoxifène. Cette molécule induit le développement de lésions cutanées pigmentées, qui progressent vers le stade mélanomateux (<http://jaxmice.jax.org/strain/013590.html>).

Le transgène *TyrCreER*<sup>T2</sup> est constitué du promoteur de la tyrosinase, de sa région *enhancer* suivi par le gène de fusion *CreER*<sup>T2</sup> (**Figure 11 A**). L'activité de la recombinaise Cre est inductible car celle-ci est fusionnée avec un récepteur à l'œstrogène modifié. De plus, elle est uniquement exprimée dans les cellules pigmentées. En effet, sa séquence génomique est sous le contrôle du promoteur de la tyrosinase, une enzyme impliquée dans la production de la mélanine. En condition physiologique, la protéine de fusion *CreER*<sup>T2</sup> est séquestrée dans le cytosol par sa liaison avec la HSP90 (*Heat Shock Protein 90*). Sa forme activée est induite par l'application cutanée topique de Tamoxifène/4-Hydroxytamoxifène. Cette molécule se fixe sur le récepteur à l'œstrogène menant à la libération de la recombinaise. Elle migre ensuite vers le noyau et induit la recombinaison des séquences bordées par les sites LoxP. Les séquences ciblées par la Cre sont l'exon 5 du gène *Pten* situé sur le chromosome 19 ainsi que les exons 15 à 18 du gène *Braf* localisés sur le chromosome 6 (**Figure 11 B et C**). Elle permet de générer une souche murine possédant des mélanocytes positifs pour les mutations régulièrement retrouvées dans les mélanomes. Comme décrit par *The Jackson Laboratory*, il arrive également que le développement de tumeurs se produise de manière spontanée suite à un niveau d'expression de la recombinaise Cre non fusionnée avec le récepteur à l'œstrogène modifié. Ce développement spontané de tumeur s'est déjà illustré chez plusieurs souris de la colonie. Suite à cette détection, les souris ont été euthanasiées et les tumeurs ont été réséquées dans le but d'effectuer une analyse histologique.

Suite à de nombreux croisements, plusieurs mâles et femelles ont été obtenus. Ceux-ci sont, au minimum, homozygotés pour *Pten*, hétérozygotés pour *Braf* et hémizygotés pour le transgène *TyrCreET*<sup>T2</sup>. Actuellement, la colonie est en phase d'amplification dans le but d'accroître le nombre d'animaux disponibles pour la création du modèle murin *TyrCre:Pten*<sup>(-/-)</sup> *Braf*<sup>(V600E)</sup>.*Abcb5*-IRESeGFP. Les transgènes sont détectés grâce à différentes PCR utilisant le programme et les oligonucléotides adaptés (**Tables S1**) : les PG2 pour détecter l'insert de



**Figure 12: Souche murine *Abcb5*-IRES-eGFP**

Dans le but de suivre la transcription du transporteur du gène *Abcb5* grâce à la traduction de la protéine GFP, un transgène a été inséré dans une souche C57Black/6J (A). Cette construction est composée d'une cassette IRES-eGFP couplée à un gène de résistance à la néomycine bordé par des sites LoxP. Celle-ci est insérée après le codon stop de l'exon 28, localisée dans la région 3' UTR du gène *Abcb5*. La présence de la séquence IRES permet d'induire une transcription de l'eGFP de manière indépendante de la structure 5' CAP de l'ARNm d'*Abcb5*. Afin d'obtenir une souche plus pure, la cassette de résistance a été retirée grâce à l'accouplement de la souris *Abcb5*-IRES-eGFP avec une souche exprimant la recombinaise Cre (B). Cette enzyme est sous le contrôle du promoteur de la kinase phosphoglycérate 1, exprimée de manière constitutive dans toutes les cellules. Ce croisement permet donc l'expression de la recombinaise Cre de manière ubiquiste et une excision de la cassette néomycine dans toutes les cellules murines (C). Pour terminer, les souris sélectionnées afin de générer la souche murine  $TyrCre:Pten^{(-/-)}Braf^{(V600E)}Abcb5$ -IRES-eGFP sont celles qui ne possèdent plus la séquence de résistance ainsi que le transgène PGKCre.

*Braf* (307 pb), les PG11 pour amplifier le transgène de *Pten* (327 pb) et les PG12 qui mettent en évidence la présence de *TyrCreER*<sup>T2</sup> de 100 pb associée à un contrôle interne de 324 pb.

## **Souris *Abcb5*-IRESeGFP**

Cette souche murine *knock-in* a été élaborée dans le but de suivre l'expression du gène *Abcb5* grâce à la fluorescence de l'eGFP. Elle constitue, donc, un outil de recherche important pour la caractérisation de l'expression de ce transporteur dans les organes murins. Cette cartographie pourrait également fournir des pistes quant aux rôles physiologiques de cette protéine ABC.

Une transgénèse additive a été réalisée chez une souris de souche C57Black/6J dans le but d'insérer la séquence IRESeGFP dans la région 3' UTR du gène *Abcb5*. Celle-ci est couplée à une cassette de résistance à la néomycine afin de sélectionner les cellules souches recombinées. Plus précisément, ce transgène est localisé dans l'exon 28, après le codon stop de ce transporteur (**Figure 12 A**). L'insertion de la séquence IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*) constituant le site d'entrée interne ribosomique couplée à l'eGFP, permet de générer un ARNm bicistronique. Ce site mène donc à une traduction de la protéine fluorescente de manière indépendante à la séquence d'*Abcb5* (113). Généralement, la traduction au sein des cellules eucaryotes est initiée par la liaison de la sous-unité ribosomique 40S à la coiffe localisée sur l'extrémité 5' de l'ARNm. Celle-ci parcourt ensuite la région 5' UTR afin de détecter un codon d'initiation, s'associe à la sous-unité 60S, et débute la traduction. Au contraire, la présence d'un site IRES sur l'ARNm permet d'atteindre directement le codon de départ, d'initier la traduction sans effectuer une analyse de la séquence, au préalable (114).

Cette construction permet, non seulement, de conserver un niveau d'expression physiologique de la protéine ABCB5 contrôlée par son promoteur endogène tout en induisant la production de la forme typique de l'eGFP. La traduction séparée du transporteur et de la protéine rapportrice permet d'éviter une activité biologique aberrante d'ABCB5 qui peut s'observer lors de la production de protéine de fusion (115).

Après avoir obtenu des souris homozygotes pour l'insert *ABCB5*-IRESeGFP, celles-ci sont croisées avec des souches murines PGK-Cre (**Figure 12 A et B**). Cet accouplement permet d'induire l'excision de la cassette de résistance à la néomycine qui pourrait être responsable d'altérations physiologiques (**Figure 12 C**). Étant sous le contrôle du promoteur constitutif de la phosphoglycérate kinase 1 (PGK, *PhosphoGlycerate Kinase 1*), la recombinaise Cre est exprimée de manière ubiquiste dans ces souris. Cet événement de recombinaison est révélé en effectuant une PCR de génotypage. En effet, si la cassette de résistance a été retirée, les oligonucléotides PG1 nous permettront d'amplifier une séquence de 2000 pb (**Table S1**). Cependant, à ce stade, cette souche murine ne peut pas encore être croisée avec la souche *TyrCre:Pten*<sup>(-/-)</sup>*Braf*<sup>(V600E)</sup>. En effet, si cet accouplement est réalisé, la souris résultante exprimera la Cre dans toutes ces cellules et perdra donc sa susceptibilité à générer uniquement des tumeurs de type mélanocytaire. Le croisement avec la souris *TyrCre:Pten*<sup>(-/-)</sup>*Braf*<sup>(V600E)</sup> doit donc se faire avec une souris homozygote pour la séquence IRESeGFP et dépourvue de la cassette Cre. La présence de cette recombinaise est mise en évidence grâce à une PCR utilisant

les oligonucléotides Cre1 et Cre2. L'amplification génère une bande de 400 pb lorsque la souris exprime cette enzyme. Actuellement plusieurs souris mâles et femelles sont dépourvues de la Cre tout en étant homozygotes pour le transgène *Abcb5*-IRESeGFP. Comme pour la colonie TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>, cette souche murine est en phase d'amplification afin d'accroître le nombre de souris et faciliter la génération du modèle TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>:*Abcb5*-IRESeGFP.

## **Souris TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>:Abcb5-IRESeGFP**

Dans le but d'étudier l'implication du transporteur ABCB5 dans le développement et le maintien d'une tumeur cutanée mélanocytaire, un modèle murin a été généré. Celui-ci est susceptible de développer des mélanomes, de manière spontanée ou inductible, tout en exprimant une protéine fluorescente verte (eGFP, *enhanced green fluorescent protein*) lors de la transcription du gène *Abcb5*.

Cette souris est générée grâce au croisement de la souche TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup> développée par Bosenberg et Mc Mahon (13, 116, 117) (**Figure 11 A, B et C**) avec la souche *Abcb5*-IRESeGFP (**Figure 12 A, B, C**) créée par Gillet et ses collègues (données non publiées). Les premiers croisements ont débuté durant le mois d'août 2014. Dans le but de générer rapidement la souche d'intérêt, les souris choisies pour initier la création de la colonie sont homozygotes pour le transgène IRESeGFP et pour les allèles *Pten* et *Braf*. Cependant, comme la PCR de génotypage avec les oligonucléotides PG12 permettent uniquement de détecter la présence du transgène *TyrCreER<sup>T2</sup>*, il n'est pas possible de savoir si la souris est homozygote ou hétérozygote pour ce dernier. Après plusieurs croisements, nous avons obtenu des individus hétérozygotes pour tous les allèles. Un premier croisement entre ces animaux hétérozygotes a été réalisé donnant naissance à 4 mâles. Toutefois, la combinaison idéale n'a pas été obtenue. En effet, le ♂0 est positif pour le transgène *TyrCreER<sup>T2</sup>*, hétérozygote pour *Braf* et ne possède pas les constructions *Pten* et IRESeGFP. Le ♂1 est *Wild-Type* pour le transgène eGFP et *TyrCreER<sup>T2</sup>*, par contre, il est hétérozygote pour les gènes *Pten* et *Braf*. Le ♂2 possède le même profil que la souris ♂1 excepté qu'il est hétérozygote pour le transgène IRESeGFP. Pour terminer, la souris ♂3 est hétérozygote pour la séquence de *Pten*. Il est, de plus, homozygote pour le transgène IRESeGFP mais ne possède pas le gène muté pour *Braf*. La création de cette souche murine est plus longue que prévue. En effet, les souriceaux ont une croissance plus lente par rapport aux autres souris. Leur sevrage est donc retardé et par conséquent, les croisements se font, au plus tôt, après 8 semaines.

## **Étude de la localisation d'*Abcb5* dans la souris**

### **PCR en temps réel**

L'objectif de cette analyse est de générer le profil d'expression d'*Abcb5* dans une souche murine. Ces données permettront alors d'identifier les organes positifs pour cet ARNm. Sur base des résultats obtenus, certains tissus seront préférentiellement analysés lors de l'imagerie immunohistochimique de la souris *Abcb5*-IRESeGFP.

Souris	Organes analysés	Expression d' <i>Abcb5</i>
Mâle 1 (MWT 1) 7 mois	Duodénum	—
	Intestin grêle	—
	Colon	—
	Testicule	*
	Œil	—
	Peau de la queue	—
Mâle 2 (MWT 2) 4 mois	Intestin	—
	Testicule	***
	Œil	—
	Peau de la queue	*
Mâle 3 (MWT 3) 4 mois	Intestin	*
	Testicule	***
	Œil	—

Expression de l'ARNm d' <i>Abcb5</i>		
Niveau d'expression	$\Delta$ Ct	Symbole
Haut	De 16 à 19	***
Moyen	De 19 à 22	**
Faible	De 22 à 25	*
Absent	Au-dessus de 25	—

Tableau 1: Expression d'*Abcb5* détectée par la PCR en temps réelle

L'écart entre la plus petite valeur du  $\Delta$  Ct (à partir de 16 cycles) et le  $\Delta$  Ct de 25 est divisé en 3 groupes d'expression : haut, moyenne et faible. Dans le tableau, une haute expression est caractérisée par trois étoiles, une expression moyenne est schématisée par deux étoiles alors qu'une expression faible est symbolisée par une étoile. L'absence de détection de l'ARNm d'*Abcb5* est représentée par une bande horizontale. L'étoile rouge signifie que l'expression d'*Abcb5* est seulement retrouvée dans un des deux duplicats.

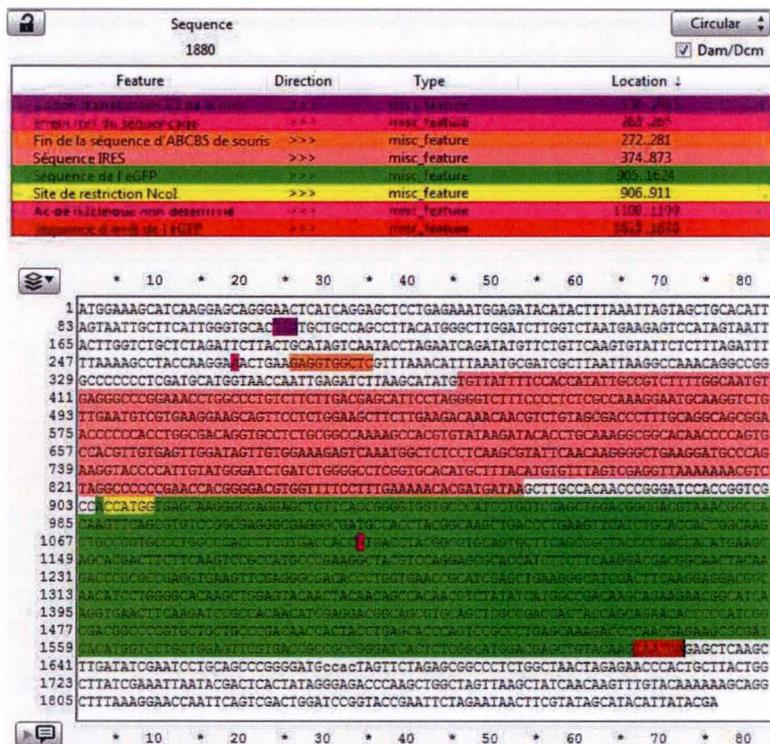


Figure 13: Analyse de la séquence nucléotidique constituant le transgène présent chez les souris *Abcb5*-IRESeGFP

Cette image provenant du logiciel APE (*A Plasmid Editor*) détaille les différentes cassettes constituant la séquence de l'insert présent chez les souris produisant l'eGFP lors de la transcription d'*Abcb5*. La taille de la séquence est de 1880 paires de bases. Le codon d'arrêt de la transcription de la protéine ABCB5 est localisé à 106 pb en mauve. La séquence codant pour ce transporteur s'arrête au niveau de la zone orange (272 à 281 pb). La cassette IRES est visible en rose pâle (374 à 873 pb) alors que la séquence codant pour l'eGFP est colorée en vert (905 à 1624 pb). Le morceau de séquence surligné en rouge marque l'arrêt de la cassette eGFP (1625 à 1630 pb). Un site de restriction NcoI est localisé au début de la séquence eGFP. Les acides nucléiques surlignés en rose proviennent d'erreurs produites lors du séquençage de la séquence.

La détection de l'ARNm d'*Abcb5* au sein de différents organes de souris a été effectuée par une PCR quantitative utilisant la technologie Taqman. Cette analyse a été réalisée chez trois souris *Wild-Type* mâles : deux rongeurs âgés de 4 mois et un de 7 mois. Les organes prélevés pour la première souris, désignée sous le nom de mâle *Wild-Type* 1 (MWT1), sont le duodénum, l'intestin grêle, le colon, les testicules, les yeux et la peau de la queue. Seule une partie de l'intestin a été échantillonnée pour le mâle *Wild-Type* 2 et 3. Les testicules, les yeux et la peau de la queue ont également été prélevés pour le MWT2 alors que seul les yeux et les testicules ont été extraits chez les MWT3. La PCR en temps réel basée sur la chimie Taqman a été normalisée par l'utilisation d'un gène constitutif, l'ARN ribosomique 18S.

Suite à la PCR en temps réel, les transcrits 18S sont détectés dans tous les échantillons. Ils apparaissent après 11 à 15 cycles. L'ARNm d'*Abcb5* a été détecté dans les testicules pour chacune des souris analysées. Il dépasse le seuil fixé après 28,4 à 32,8 Ct. La peau de la queue du mâle *Wild-Type* 2 est également positive pour cet ARNm après 37,6 Ct. *Abcb5* a également été détecté après 36,3 cycles, uniquement chez le mâle *Wild-Type* 3. Toutefois, cette détection est seulement visualisée dans un des duplicats. Aucune expression de cet ARN cible n'a été mesurée au niveau des yeux provenant de cette cohorte. Pour terminer, le contrôle négatif pour l'ARNm d'*Abcb5* n'a pas été détecté, au contraire du contrôle négatif de la référence interne qui a dépassé le niveau seuil fixé après 36,7 cycles (CT) (**Tableau S2**).

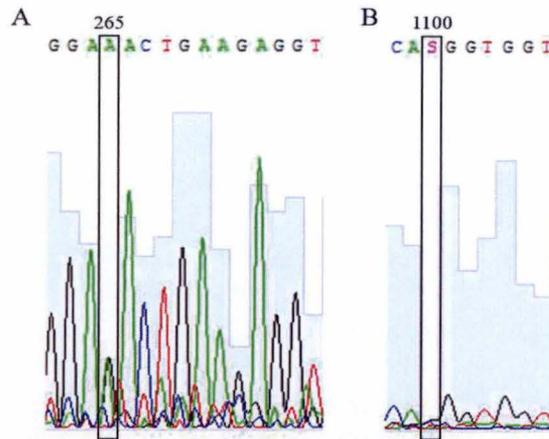
Après avoir identifié les organes positifs pour *Abcb5*, la quantification de son expression a également été réalisée en utilisant la méthode utilisée par Heimerl *et al.* (118). L'analyse du niveau en ARNm d'*Abcb5* se base sur le calcul du  $\Delta Ct$  avec la formule suivante :  $[Ct (Abcb5) - Ct (18S)]$ . L'écart entre la plus petite valeur du  $\Delta Ct$  (à partir de 16 cycles) et le  $\Delta Ct$  de 25 est divisé en 3 groupes d'expression : haut (\*\*\*), moyenne (\*\*), et faible (\*) (**Tableau 1**). Pour le mâle *Wild-Type* 1, l'expression d'*Abcb5* a faiblement été détectée dans les testicules (\*). Pour cette souris, aucune expression n'a été décelée pour les autres organes. Une expression a été détectée dans le testicule (\*\*\*) et dans la peau de la queue (\*) pour le mâle *Wild-Type* 2. Le testicule (\*\*\*) et l'intestin (\*) de la troisième souris sont également positifs pour le transcrit d'*Abcb5*. Cependant, les résultats obtenus dans l'intestin ne peuvent pas être acceptés car seul un des duplicats a dépassé le seuil d'expression fixé.

## **Cartographie de l'expression d'Abcb5 dans la souche murine Abcb5-IRESeGFP**

### **Séquençage du transgène IRESeGFP**

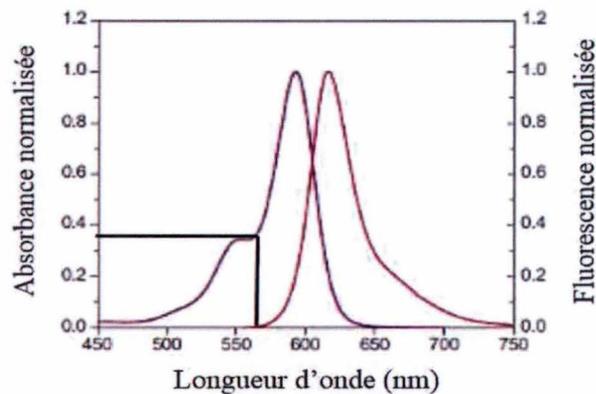
La génération de la souche murine *Abcb5-IRESeGFP* étant terminée, le séquençage de son transgène a été effectué. Cette analyse génomique a pour objectif de déceler la présence éventuelle de modifications de séquence qui pourraient être responsables de la production d'une eGFP aberrante. La séquence d'insertion étant importante, plusieurs séquençages successifs ont dû être réalisés. Des amorces ont donc été créées dans le but de couvrir l'entièreté de l'insert et d'augmenter la fidélité du séquençage.

Les séquences obtenues ont donc été alignées avec la séquence d'*Abcb5 Mus musculus* (Gene ID: 77706) présent sur le chromosome 12. Cette recherche d'homologie entre les séquences a



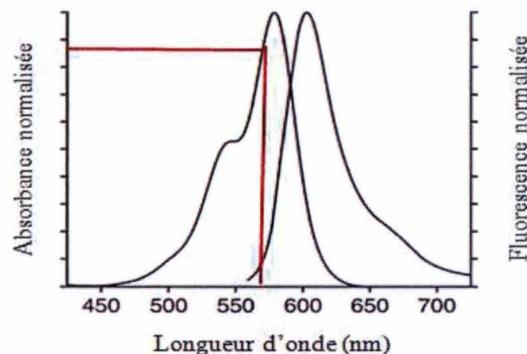
**Figure 14: Courbe de déduction de la succession des bases nucléiques**

Cette image est l'agrandissement des courbes de déduction de la succession des bases nucléiques présentant des erreurs. Suite à la détection de la fluorescence lors du séquençage, l'acide nucléique situé à la position 265 sur la séquence du transgène *Acb5-IRESeGFP* peut être soit une adénine, soit une guanine. Pour la base nucléique présente à la position 1100, aucune prédiction ne peut être faite car la courbe de détection associée à un des quatre acides n'est pas visible. Sur base de l'alignement de la séquence de l'eGFP avec celle de notre souris, le S est, en fait, une cytosine alors que l'acide nucléique situé à la position 265 est une guanine.



**Figure 15: Caractéristiques spectrales de l'anticorps anti-GFP (GFP Rabbit IgG Antibody Fraction, Alexa Fluor® 594 Conjugate, Molecular Probes®)**

Ce graphe schématise la longueur d'onde d'excitation (mauve) et d'émission (rose) de l'Alexa 594. La longueur d'onde permettant d'induire une fluorescence maximum de ce fluorochrome est de 594 nm. Le laser disponible dans le microscope confocal Leica est de 561 nm. Il ne permet donc de fournir seulement une fluorescence de moins de 40% pour cet Alexa (noir). D'après <https://secure.eurogentec.com/EGT/Images/Anaspec/HiLyteFluor594Abs-em.jpg>



**Figure 16: Caractéristiques spectrales de l'Alexa 568 présent sur l'anticorps secondaire (Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, Life Technologies) reconnaissant l'IgG anti-GFP (GFP Rabbit IgG Antibody Fraction, Molecular Probes®)**

Ce graphe schématise la longueur d'onde d'excitation (à gauche) et d'émission (à droite) de l'Alexa 568. La longueur d'onde permettant d'induire une fluorescence maximum de ce fluorochrome est de 568 nm. Le laser disponible dans le microscope confocal Leica est de 561 nm. Il permet donc de fournir une fluorescence de presque 90% pour cet Alexa (rouge). D'après <http://measure.mit.edu/~20.309/wiki/index.php?title=File:Alexa568.jpg>

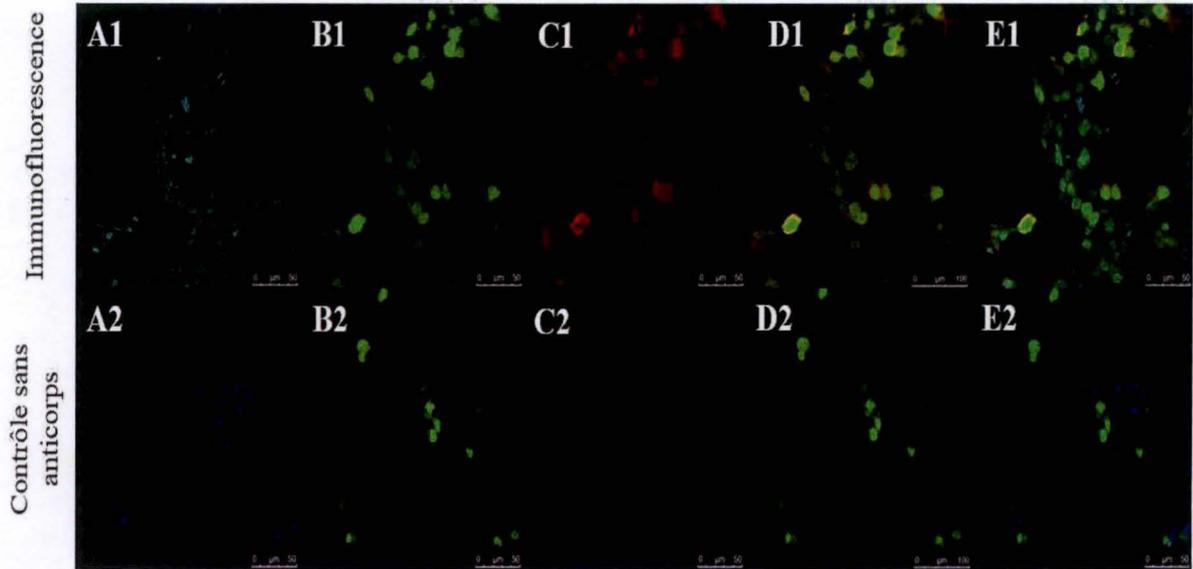
permis de localiser le codon d'arrêt de la transcription de l'ARNm d'*Abcb5* et la fin de la séquence codant pour cette protéine (**Figure 13**). Ensuite, comme la construction insérée dans les souris a été générée sur base du plasmide pMSCV-IRES-GFP (pMIG), le transgène séquencé a été aligné avec la séquence de ce vecteur. Les cassettes IRES et eGFP sont localisées de 374 à 873 pb et de 905 à 1624 pb respectivement. La séquence codant pour la protéine fluorescente verte possède au niveau de ses extrémités des acides nucléiques surlignés en des couleurs différentes. La zone colorée en jaune est le site de restriction NcoI alors que la séquence en rouge montre l'arrêt de la cassette eGFP. Les deux acides nucléiques surlignés en rose au niveau de la séquence d'*Abcb5* et de l'eGFP proviennent d'erreurs produites lors du séquençage (**Figure 14**). Sur base de l'alignement de la séquence de l'eGFP avec celle de notre souris, l'acide nucléique situé à la position 265 sur la séquence du transgène *Abcb5*-IRESeGFP est une guanine. Pour la base nucléique présente à la position 1100, le S est, en fait, une cytosine.

### **Validation des anticorps anti-GFP utilisés pour l'immunohistochimie**

Dans le but d'améliorer la détection de la protéine fluorescente produite lors de la transcription d'*Abcb5*, deux anticorps anti-GFP ont été choisis. Avant de débiter le protocole d'immunohistochimie sur les organes de souris, leurs fixations sur les antigènes de la GFP ont été testées et validées *in vitro*.

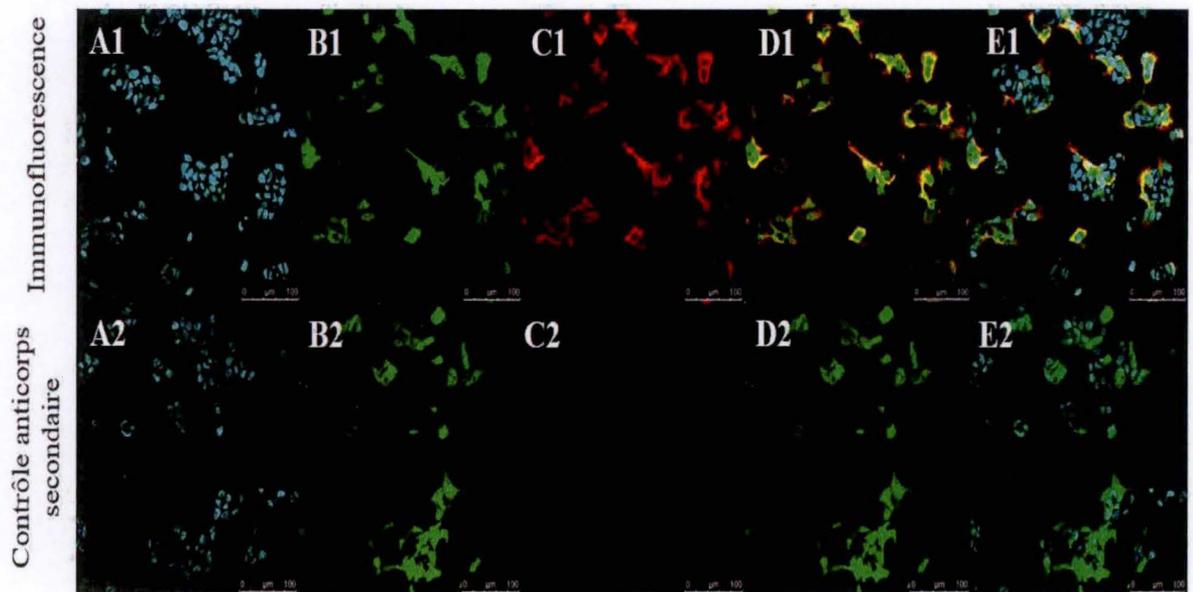
Une première immunoglobuline polyclonale anti-GFP a été testée. Cet anticorps est produit dans le lapin et est directement couplé à l'Alexa 594 (*GFP Rabbit IgG Antibody Fraction, Alexa Fluor® 594 Conjugate, Molecular Probes®*). Ce choix a été motivé grâce à un article publié en 2003 par Kusser *et al.* (111). Une des techniques illustrée par ces chercheurs permet de détecter la fluorescence émise par l'eGFP et l'anticorps anti-GFP dans les tissus lymphoïdes de souris. Comme ce protocole a été testé sur les souris *Abcb5*-IRESeGFP, le même anticorps a été sélectionné dans le but de limiter les changements techniques. Cependant, une autre immunoglobuline a dû être choisie car le microscope confocal Leica n'émet pas à la longueur d'onde adéquate pour l'excitation de l'Alexa 594. Celui-ci ne produit donc pas une fluorescence importante (**Figure 15**). Pour ce microscope, la génération de signaux rouges est permise grâce à un laser d'une longueur d'onde de 561 nm. Dans cette gamme d'excitation, seul 40% de la capacité de fluorescence de l'Alexa est produite. Par conséquent, un deuxième anticorps a été testé. Celui-ci provient de la même fraction que le précédant sans être directement couplé à un fluorochrome (*GFP Rabbit IgG Antibody Fraction, Molecular Probes®*). La génération de fluorescence sera donc induite par un anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente. Celui-ci est dirigé contre les IgG de lapin et est couplé à un Alexa 568 (*Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, Life Technologies*) adapté au laser disponible sur le microscope confocal. Contrairement au premier anticorps, celui-ci émet près de 90% de sa capacité de fluorescence lorsqu'il est excité par une longueur d'onde de 561 nm (**Figure 16**).

La validation de ces anticorps a été réalisée par immunofluorescence (IF) sur des cellules 293T repiquées sur des lames couvre-objet (**Figure 17 et 18**). Dans un premier temps, l'optimisation de la transfection a été réalisée dans le but de déterminer quel est le rapport en ADN plasmidique et Turbofect qui permet une efficacité de transfection plus importante



**Figure 17: Validation de l'anticorps anti-GFP (GFP Rabbit IgG Antibody Fraction, Alexa Fluor® 594 Conjugate, Molecular Probes®) *in vitro***

Une immunofluorescence a été réalisée dans le but de valider la reconnaissance de l'anticorps anti-GFP IgG produit dans le lapin vis-à-vis de la GFP (A1, B1, C1, D1 et E1). Par conséquent, les cellules 293T ont été transfectées avec le plasmide pEGFP-N1 permettant une production de la protéine fluorescente verte (B1). Cette protéine est reconnue par l'IgG anti-GFP qui est directement couplée à un Alexa Fluor® 594. Celui-ci émet de la fluorescence rouge lorsqu'il est excité (C1). Une coloration bleue des noyaux a également été réalisée au DAPI qui se lie fortement aux bases adénine et thymine de l'ADN (A1). L'image confocale D1 est obtenue suite à la fusion des images B1 et C1 alors que l'image E1 résulte de la fusion entre les photos A1, B1 et C1. Afin de confirmer le résultat obtenu, une condition contrôle, sans anticorps a également été réalisée (A2, B2, C2, D2 et E2). La coloration des noyaux est illustrée en A2, la fluorescence verte de la transfection en B2. L'image C2 est la condition contrôle sans anticorps. Comme pour la condition IHC, les photos D2 et E sont le résultat de l'assemblage entre les photos B2/C2 et A2/B2/C2 respectivement.



**Figure 18: Validation de l'anticorps primaire anti-GFP (GFP Rabbit IgG Polyclonal Antibody Fraction, Molecular Probes) et de l'anticorps secondaire (Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, Life Technologies) *in vitro***

Une immunofluorescence a été réalisée dans le but de valider la reconnaissance de l'anticorps anti-GFP IgG produit dans le lapin vis-à-vis de la GFP (A1, B1, C1, D1 et E1). Par conséquent, les cellules 293T ont été transfectées avec le plasmide pEGFP-N1 permettant une production de la protéine fluorescente verte (B1). Cette protéine est reconnue par l'IgG anti-GFP qui est lui-même lié par un anticorps secondaire anti-lapin produit dans la chèvre couplée à un Alexa Fluor® 568. Celui-ci émet de la fluorescence rouge lorsqu'il est excité (C1). Une coloration bleue des noyaux a également été réalisée au DAPI qui se lie fortement aux bases adénine et thymine de l'ADN (A1). L'image confocale D1 est obtenue suite à la fusion des images B1 et C1 alors que l'image E1 résulte de la fusion entre les photos A1, B1 et C1. Afin de confirmer le résultat obtenu, une condition contrôle, avec un anticorps secondaire a également été réalisée (A2, B2, C2, D2 et E2). La coloration des noyaux est illustrée en A2, la fluorescence verte de la transfection en B2. L'image C2 est la condition contrôle ou les cellules sont uniquement incubées avec l'anticorps secondaire. Comme pour la condition IHC, les photos D2 et E sont le résultat de l'assemblage entre les photos B2/C2 et A2/B2/C2 respectivement.

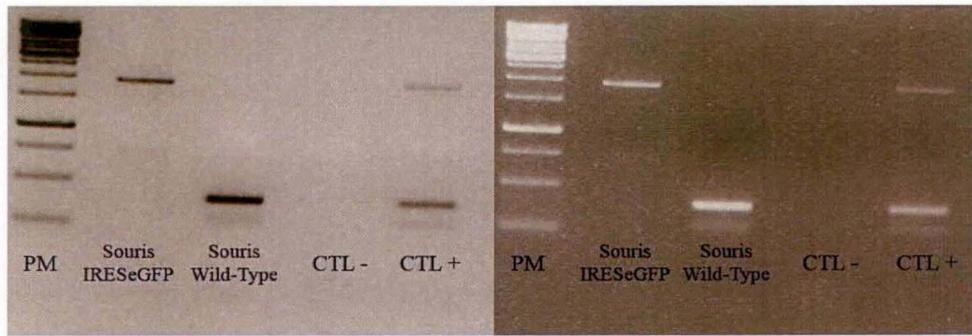
(données non montrées). Suite à ces résultats les cellules 293T ont été transfectées avec 0.5 µg d'ADN plasmidique pEGFP-N1 et 1,5 µl d'agent transfectant (rapport 1/3). Après vérification de la présence de protéines fluorescentes vertes dans ces cellules, celles-ci ont été fixées et perméabilisées. Les 293T ont été incubées avec l'anticorps anti-GFP qui est, soit directement couplé à l'Alexa 594 (**Figure 17**), ou soit qui nécessite une seconde incubation avec un anticorps secondaire anti-lapin, couplé avec l'Alexa 568 (**Figure 18**). Ces anticorps reconnaissent et se lient aux antigènes de l'eGFP. Grâce au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI), qui se lie fortement aux bases adénine et thymine de l'ADN, les noyaux émettent dans le bleu (**Figure 17/18, images A1 et A2**). Les cellules transfectées avec le plasmide pEGFP-N1 expriment des protéines fluorescentes vertes (**Figure 17/18, images B1 et B2**). Les anticorps anti-GFP sont excités avec la longueur d'onde de 561 nm et émettent dans le rouge (**Figure 17/18, images C1**). Cette fluorescence est plus importante pour les cellules incubées avec les anticorps primaire et secondaire par rapport aux 293T uniquement traitées avec l'anticorps couplé avec l'Alexa 594 (**Figure 17/18, images C1**). Les résultats combinés de la fluorescence verte et rouge peuvent être visualisés sur les photos (**D1**) et (**D2**) présentes sur les deux figures (**Figure 17/18**). Les photos (**E1**) et (**E2**) sont générées grâce à la fusion entre les images (**A**), (**B**) et (**C**) des conditions respectives.

Afin de s'assurer de la spécificité de la fixation de l'anticorps sur l'eGFP, un contrôle négatif a été réalisé pour les deux immunofluorescences (**Figure 17 A2 à E2 et Figure 18 A2 à E2**). Pour la première IF, les cellules transfectées n'ont pas été incubées avec l'anticorps. Au contraire de la deuxième immunofluorescence où les 293T ont été mises en contact avec l'immunoglobuline secondaire anti-lapin. Pour les deux expériences, aucune fluorescence rouge n'a été détectée (**Figure 17/18, images C2**).

### **Mise au point du protocole permettant de préserver la fluorescence de l'eGFP dans des coupes à congélation de testicules**

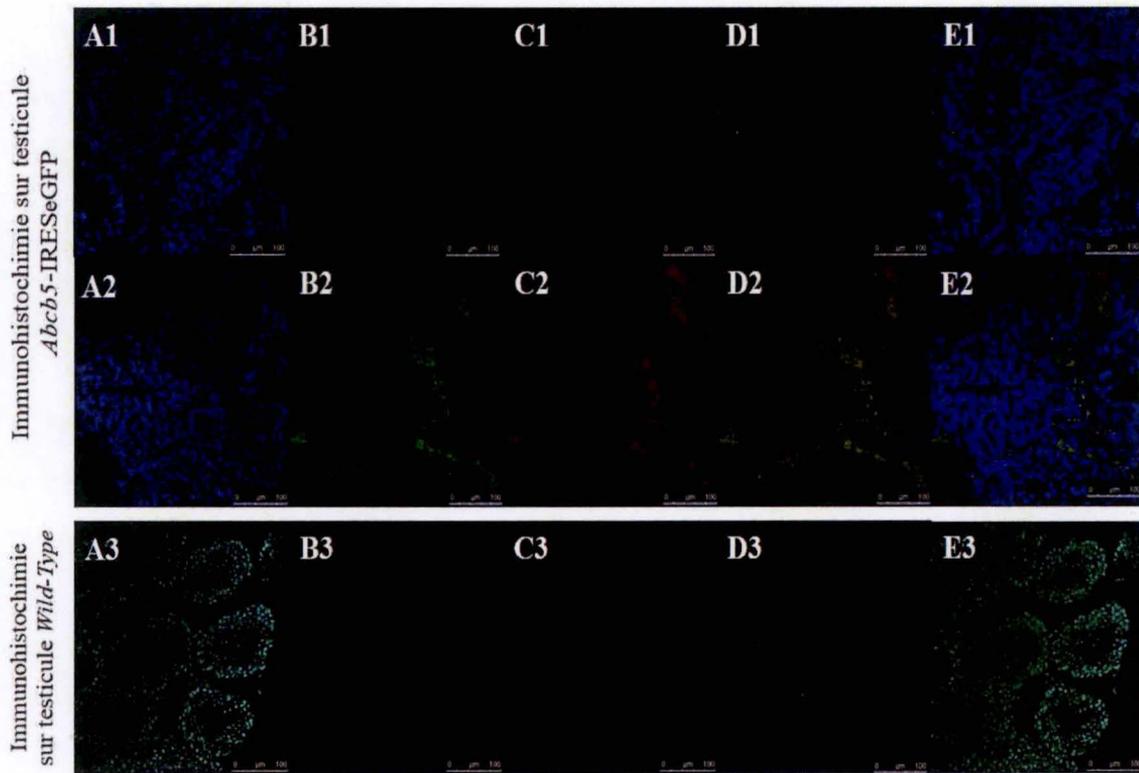
La cartographie de l'expression du transporteur ABCB5 dans les tissus provenant de la souche murine *Abcb5*-IRESeGFP nécessite la mise au point d'un protocole d'immunohistochimie élaboré. En effet, nous devons nous assurer que la GFP présente à l'intérieur des cellules ne soit pas dénaturée. Nous devons également maintenir l'architecture du tissu dans le but de déterminer le type cellulaire exprimant ABCB5. Des problèmes de détection de l'eGFP avaient précédemment été rencontrés dans les organes de souris *Abcb5*-IRESeGFP. Le protocole utilisé nécessitait une fixation des organes par immersion dans une solution de PBS/PFA (données non montrées). Plusieurs méthodes ont, par conséquent, été testées afin de déterminer la technique qui favorise, au mieux, le maintien et la fluorescence de l'eGFP. N'ayant pas de contrôle positif, ces protocoles ont été testés uniquement sur les testicules des souris. Cet organe a été choisi suite aux résultats obtenus lors de la PCR quantitative. Pour rappel, l'ARNm d'*Abcb5* a été détecté dans les testicules des trois souris *Wild-Type* testées.

Dans le but de détecter au mieux la fluorescence de l'eGFP, seules des souris homozygotes pour le transgène *Abcb5*-IRESeGFP ont été utilisées. Cette condition expérimentale a été vérifiée pour chaque souche grâce au génotypage de celles-ci. Les souris *Wild-Type* ont également été analysées afin de s'assurer de l'absence du transgène d'intérêt (**Figure 19**).



**Figure 19: Génotypage de la souris Abcb5-IRESeGFP**

Les souris fixées par perfusion trans-cardiaque sont génotypées dans le but de valider la présence du transgène. Par conséquent, une PCR utilisant les oligonucléotides PG1 a été effectuée. Son produit a été chargé sur gel d'agarose. Le premier puits contient l'échelle de poids moléculaire de 1000 pb (PM). La bande présente à 2000 pb est celle de la souris *Abcb5*-IRESeGFP alors que celle de 400 pb prouve l'absence du transgène. Les deux derniers puits sont des contrôles négatifs (CTL -) et positifs (CTL +) de la PCR. Le CTL - ne montre aucune amplification de bande alors que le CTL + présente deux bandes (2000 pb et 400 pb).



**Figure 20: Détection de l'expression d'*Abcb5* par immunohistochimie sur le testicule issu d'une souris *Abcb5*-IRESeGFP fixée par perfusion trans-cardiaque utilisant une solution de PBS (0.01M)/PFA (4%)/acide picrique (7%) et son contrôle négatif associé**

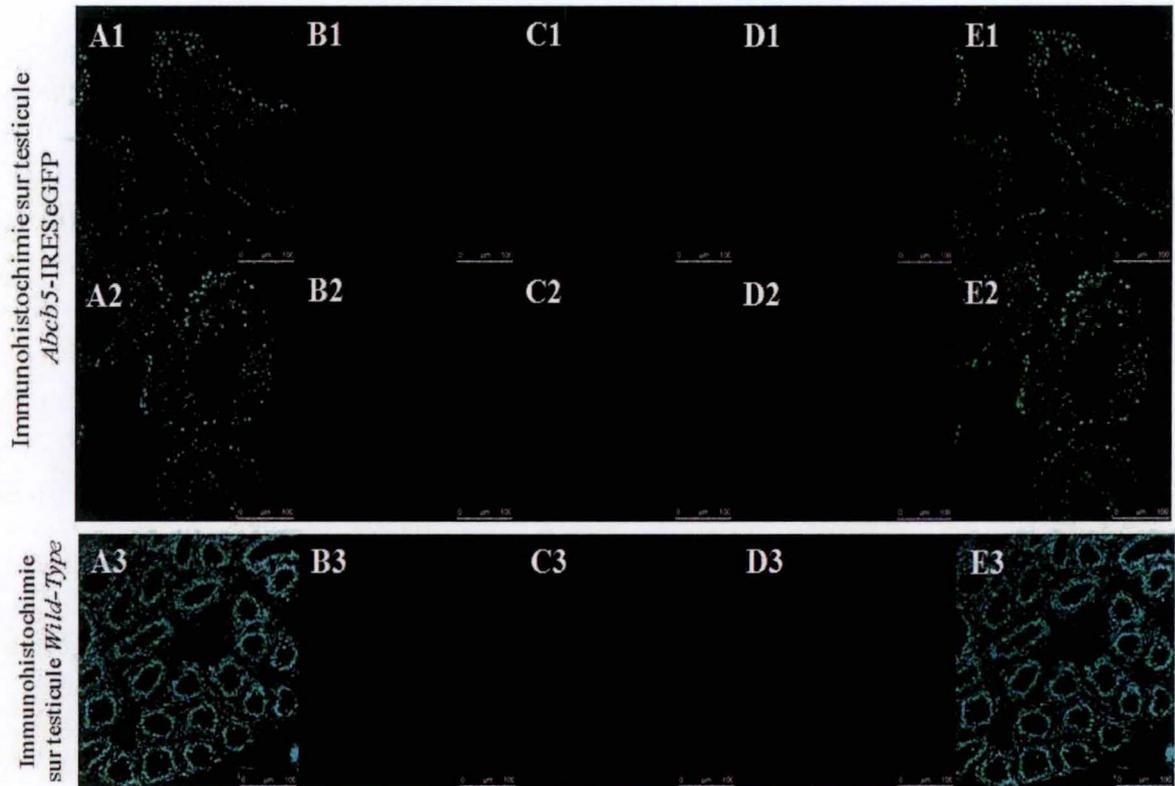
Après la fixation trans-cardiaque des souris *Abcb5*-IRESeGFP et *Wild-Type* avec une solution de PBS/PFA/acide picrique. L'immunohistochimie s'effectue sur des coupes de 15µM qui ont été fixées à l'acétone et bloquées dans du PBS/BSA. L'anticorps anti-GFP est incubé dans la solution de blocage à une dilution de 1/200 pendant 1h. Les deux premières lignes d'images sont les résultats obtenus dans le testicule d'une souris *Abcb5*-IRESeGFP (de A1 à D1 et de A2 à D2). La dernière ligne regroupe les images prises dans le testicule de souris *Wild-Type*, le contrôle négatif de l'expérience (de A3 à E3). Les noyaux sont colorés en bleu grâce au DAPI (A1, A2, A3). Les photos B1, B2 ou B3 mettent en évidence la présence éventuelle de fluorescence verte induite par la GFP. Alors que les C1, C2 et C3 montrent la présence éventuelle d'une fluorescence rouge induite par l'anticorps anti-GFP (*GFP Rabbit IgG Antibody Fraction, Alexa Fluor® 594 Conjugate, Molecular Probes®*). La fusion des images B et C est réalisée sur l'image D alors que l'image E est produite suite à l'assemblage des photos A, B et C. Des zones de fluorescence verte (B1 et B2) et rouge (C1 et C2) plus intenses sont observées dans les testicules des souris *Abcb5*-IRESeGFP. Elles sont localisées sur le pourtour des canaux séminifères. Malgré un bruit de fond important, ces zones de fluorescence ne sont pas observées chez la souris *Wild-Type* (B3 et C3).

Tous les protocoles de fixation ont été effectués par perfusion trans-cardiaque sur souris anesthésiées. La première méthode de fixation mise en œuvre se base sur celle publiée en 2003 par Kusser *et al.* (111). Conscients de la difficulté de conserver une protéine soluble dans des coupes histologiques, ces chercheurs ont élaboré un protocole permettant de la préserver. Brièvement, deux souris, une *Abcb5*-IRESeGFP de presque 10 semaines (**Figure 20, de A1 à E1 et de A2 à E2**) et une souris *Wild-Type* de 3 semaines (**Figure 20, de A3 à E3**) sont fixées avec une solution de fixation de PBS/PFA/acide picrique. Les lames porte-objet sont fixées secondairement avec de l'acétone, et incubées avec l'anticorps anti-GFP (*GFP Rabbit IgG Antibody Fraction, Alexa Fluor® 594 Conjugate, Molecular Probes®*).

Le deuxième protocole (112) a été testé sur une souris *Abcb5*-IRESeGFP de 8 semaines (**Figure 21, de A1 à E1 et de A2 à E2**) et sur une souris *Wild-Type* de 4 semaines (**Figure 21, de A3 à E3**). Celui-ci préconise uniquement une fixation avec du PBS/PFA. Une fixation secondaire est ensuite réalisée avec la même solution de fixation. La perméabilisation des coupes se réalise dans un bain de PBS/Triton-X100. Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont : *GFP Rabbit IgG Polyclonal Antibody Fraction, Alexa Fluor®* et *Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody*. A cause de la mauvaise préservation de l'architecture des coupes, ce deuxième protocole a été réitéré avec une souris âgées de 8 semaines (**Figure 22, de A1 à E1 et de A2 à E2**) avec son contrôle négatif associé, âgé de 6 semaines (**Figure 22, de A3 à E3**).

Pour chaque coupe, les noyaux sont colorés au DAPI. Deux endroits ont été sélectionnés dans les coupes de testicules *Abcb5*-IRESeGFP alors qu'une seule zone est présentée pour le contrôle négatif *Wild-Type*. La fluorescence bleue des noyaux est visualisée sur les images (A). L'association des photos présentant la fluorescence verte (B), produite par l'eGFP, et la fluorescence rouge produite par l'Alexa 594 ou 568 (C) est visualisée sur la photo (D). La fusion des images A/B/C peut être analysée sur les photos (E).

Les photos issues du premier protocole affichent une architecture des tissus peu conservée (**Figure 20**). Il est tout de même possible de visualiser les canaux séminifères (A1/A2/A3). La présence de fluorescence verte plus importante est perceptible en bordure de ces canaux (B1/B2). Celle-ci n'est pas observée chez la souris *Wild-Type* (B3). De manière similaire, des signaux avec une plus forte fluorescence rouge sont également observés uniquement dans les testicules *Abcb5*-IRESeGFP (C1/C2). Les photos issues du deuxième protocole montrent une architecture du tissu peu conservée, avec des canaux séminifères très éloignés les uns des autres (A1/A2). Au contraire, les canaux provenant de la souris *Wild-Type* forment un tissu compact (**Figure 21, de A3 à E3**). La fluorescence verte éventuelle, produite par la présence de l'eGFP dans les tissus, est visualisée sur les photos de la deuxième colonne (**Figure 21, B1/B2**). Cette fluorescence verte est peu intense sur ces coupes. Seules certaines cellules, présentes au niveau des espaces interstitiels semblent émettre des signaux verts plus forts. Une fluorescence rouge est légèrement perceptible au niveau de la bordure des canaux séminifères (**Figure 21, C1/C2**). Excités avec la même longueur d'onde spécifique à l'eGFP et à l'Alexa 568, les coupes de la souris *Wild-Type* montrent très peu de bruit de fond (**Figure 21, B3/C3**). Pensant que la perte de l'eGFP était à accrédi-ter à l'altération de l'architecture du tissu, le deuxième protocole a été réitéré. La fluorescence bleue produite par le DAPI prouve



**Figure 21 : Détection de l'expression d'*Abcb5* par immunohistochimie sur le testicule issu d'une souris *Abcb5*-IRESeGFP fixée par perfusion trans-cardiaque utilisant une solution de PBS (0.01M)/PFA (4%) suivi d'une fixation secondaire avec la même solution à 4°C pendant une nuit et son contrôle négatif associé**

Après la fixation trans-cardiaque des souris *Abcb5*-IRESeGFP et *Wild-Type* avec une solution de PBS/PFA, les organes sont récoltés et placés dans une solution de PBS/PFA à 4°C pendant une nuit. L'immunohistochimie s'effectue sur des coupes de 10µM qui ont été perméabilisées avec une solution de PBS/Triton-X100. L'anticorps anti-GFP est dilué 1/200 alors que l'anticorps secondaire anti-lapin est dilué 1/500. Les deux premières lignes d'images sont le résultat obtenu dans le testicule d'une souris *Abcb5*-IRESeGFP (de A1 à D1 et de A2 à D2). La dernière ligne regroupe les images prises dans le testicule de souris *Wild-Type*, le contrôle négatif de l'expérience (de A3 à E3). Les noyaux sont colorés en bleu grâce au DAPI (A1, A2, A3). Les photos B1, B2 ou B3 mettent en évidence la présence éventuelle de fluorescence verte induite par la présence de la GFP. Alors que les C1, C2 et C3 montrent la présence éventuelle d'une fluorescence rouge induite par l'association entre l'anticorps primaire anti-GFP (*GFP Rabbit IgG Polyclonal Antibody Fraction, Alexa Fluor®*, Molecular Probes®) et l'anticorps secondaire (*Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody*, Life Technologies). La fusion des images B et C est réalisée sur l'image D alors que l'image E est produite suite à l'assemblage des photos A, B et C. Des zones de fluorescence verte (B1 et B2) et rouge (C1 et C2) légèrement plus intenses sont observées dans les testicules des souris *Abcb5*-IRESeGFP. Elles sont localisées sur le pourtour des canaux séminifères. Des zones de fluorescence verte sont également observées dans le tissu interstitiel entourant les canaux séminifères (B1 et B2). Ces zones de fluorescence ne sont pas observées chez la souris *Wild-Type* (B3 et C3). Pour terminer, le bruit de fond et la fluorescence sont moins importants par rapport au premier protocole.

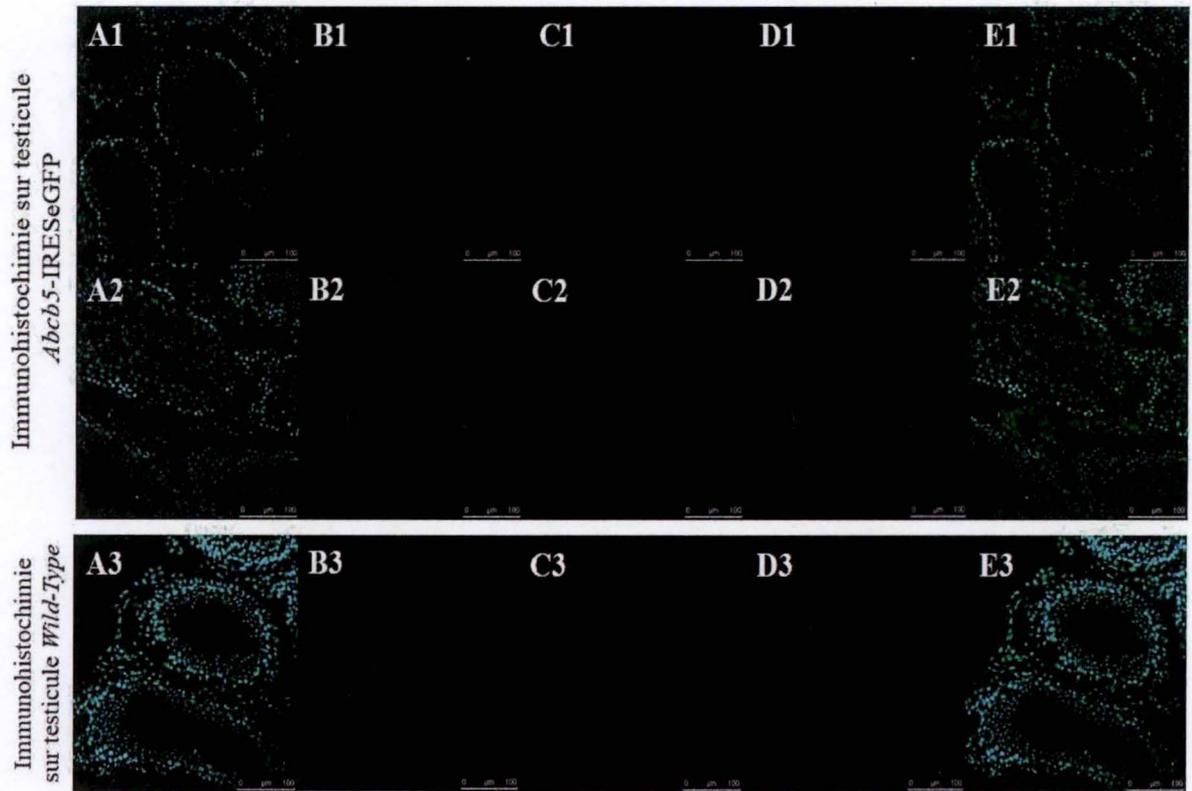
que l'architecture du tissu a bien été conservée (**Figure 22 A1/A2/A3**). De plus, les photos (**B1**) et (**B2**) affichent une fluorescence verte plus importante dans l'espace interstitiel entourant les canaux séminifères. Cependant, celle-ci n'est pas associée à une fluorescence rouge (**C1/C2**). Aucun signal rouge n'a également été détecté en bordure des canaux séminifères (**C1/C2**). Cependant, le testicule provenant de la souris *Wild-Type* présente, de manière similaire, une fluorescence verte au niveau des tissus de soutien des testicules (**Figure 22, B3**). Ces signaux verts ne sont pas associés à une fluorescence rouge produite par l'anticorps anti-GFP (**C3**). Pour terminer, que ce soit pour les tissus exprimant le transgène ou non, peu de bruit de fond est observé dans chacune des conditions (**B1/B2/B3 et C1/C2/C3**).

En conclusion, après analyse, le protocole permettant de mieux préserver la fluorescence est celui qui nécessite la fixation de la souris avec une solution de PBS/PFA/acide picrique.

## **Analyses histologiques de tumeurs développées par la souche murine TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>**

Le développement de tumeurs cutanées chez les souris TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup> a été plusieurs fois observé lors de la génération de la colonie. Pour rappel, à cause de leur génome modifié, plus de 25% des souris hémizygotes pour *TyrCreER<sup>T2</sup>*, homozygotes pour *Pten* et hétérozygotes pour *Braf* peuvent spontanément générer des tumeurs par une fuite d'activité de la recombinase Cre. Plusieurs souris ont dû être euthanasiées suite au développement spontané de tumeurs localisées au niveau de la peau. Les lésions cutanées de deux des souches murines ont été analysées dans le but de déterminer leur nature.

La première souris a développé quatre tumeurs au niveau de son épiderme (**Figure 23, A et B**): deux petites et deux plus importantes. Cette souche, âgée de 14 semaines, était hémizygote pour *TyrCreER<sup>T2</sup>*, homozygote pour *Pten* et hétérozygote pour *Braf*. Lors de la dissection, celle-ci ne montrait aucun signe de métastase. Après prélèvement, ces tumeurs ont été fixées par immersion dans une solution de PBS/PFA. Elles ont ensuite été mises en paraffine, montées sur lames et colorées. Une coloration Hemalun – Erythrosine – Safran (HES) (**Figure 24**) ainsi qu'un Fontana-Masson (**Figure 25**) associée à une contre coloration Erythrosine – Safran (ES) ont été réalisées sur des coupes différentes. Pour rappel, le HES permet de colorer les noyaux en bleu/violet (hémalun), les cytoplasmes en rouge/rose (érythrosine) et les fibres conjonctives en jaune/orange (safran). Deux endroits analysés au grossissement 4X et 20X ont été choisis au niveau de cette coupe HES (**Figure 24**). L'analyse histo-pathologique de la lésion semble identifier cette tumeur comme mélanocytaire et maligne (119, 120). En effet, la présence de mélanine dispersée au niveau du derme laisse penser à une lésion du type mélanocytaire. De plus, ce pigment noir n'est pas présent de manière homogène dans le tissu mais sous la forme d'amas dispersés. Un signe de malignité est que le tissu adipocytaire est infiltré par de nombreux types cellulaires produisant de la mélanine ou non. Cependant, cette lésion montre très peu d'infiltration de mélanine au niveau épidermique. Ces coupes présentent également une quantité importante en cellules fusiformes ainsi que quelques cellules épithélioïdes (non montrées). Dans le but de déterminer si les amas noirs présents en masse dans le derme étaient constitués de mélanine, une coloration Fontana-



**Figure 22: Détection de l'expression d'Abcb5 par immunohistochimie sur le testicule issu d'une souris *Abcb5-IRES-eGFP* fixée par perfusion trans-cardiaque utilisant une solution de PBS (0.01M)/PFA (4%) suivi d'une fixation secondaire avec la même solution à 4°C pendant une nuit et son contrôle négatif associé**

Après la fixation trans-cardiaque des souris *Abcb5-IRES-eGFP* et *Wild-Type* avec une solution de PBS/PFA, les organes sont récoltés et placés dans une solution de PBS/PFA à 4°C pendant une nuit. L'immunohistochimie s'effectue sur des coupes de 15µM qui ont été perméabilisées avec une solution de PBS/Triton-X100. L'anticorps anti-GFP est incubé à 1/200 alors que l'anticorps secondaire anti-lapin est dilué 1/500. Les deux premières lignes d'images sont le résultat obtenu dans le testicule d'une souris *Abcb5-IRES-eGFP* (de A1 à D1 et de A2 à D2). La dernière ligne regroupe les images prises dans le testicule de souris *Wild-Type*, le contrôle négatif de l'expérience (de A3 à E3). Les noyaux sont colorés en bleu grâce au DAPI (A1, A2, A3). Les photos B1, B2 ou B3 mettent en évidence la présence éventuelle de fluorescence verte induite par la présence de la GFP. Alors que les C1, C2 et C3 montrent la présence éventuelle d'une fluorescence rouge induite par l'association entre l'anticorps primaire anti-GFP (*GFP Rabbit IgG Polyclonal Antibody Fraction, Alexa Fluor®*, Molecular Probes®) et l'anticorps secondaire (*Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody*, Life Technologies). La fusion des images B et C est réalisée sur l'image D alors que l'image E est produite suite à l'assemblage des photos A, B et C. Des zones de fluorescence verte (B1 et B2) sont observées dans les testicules des souris *Abcb5-IRES-eGFP*. Elles sont localisées dans le tissu interstitiel entourant les canaux séminifères. Cependant, ces zones de fluorescence sont observées chez la souris *Wild-Type* (B3). Cependant, elles ne sont pas observées en fluorescence rouge (C3). Pour terminer, le bruit de fond et la fluorescence sont moins importants par rapport au premier protocole.

Masson a été réalisée (**Figure 25**). Celle-ci permet de mettre en évidence l'eumélanine par sa coloration en noir. Comme pour les premières images, plusieurs agrégats de mélanine sont visibles dans le derme de la lésion. Une quantité importante de ce pigment noir est également visualisée au niveau des follicules pileux de la souris. A l'opposé, aucun mélanocyte n'a été détecté au niveau de la couche basale de l'épiderme. En effet, contrairement à l'humain, les cellules pigmentées de la souris sont uniquement localisées au niveau des follicules pileux (121).

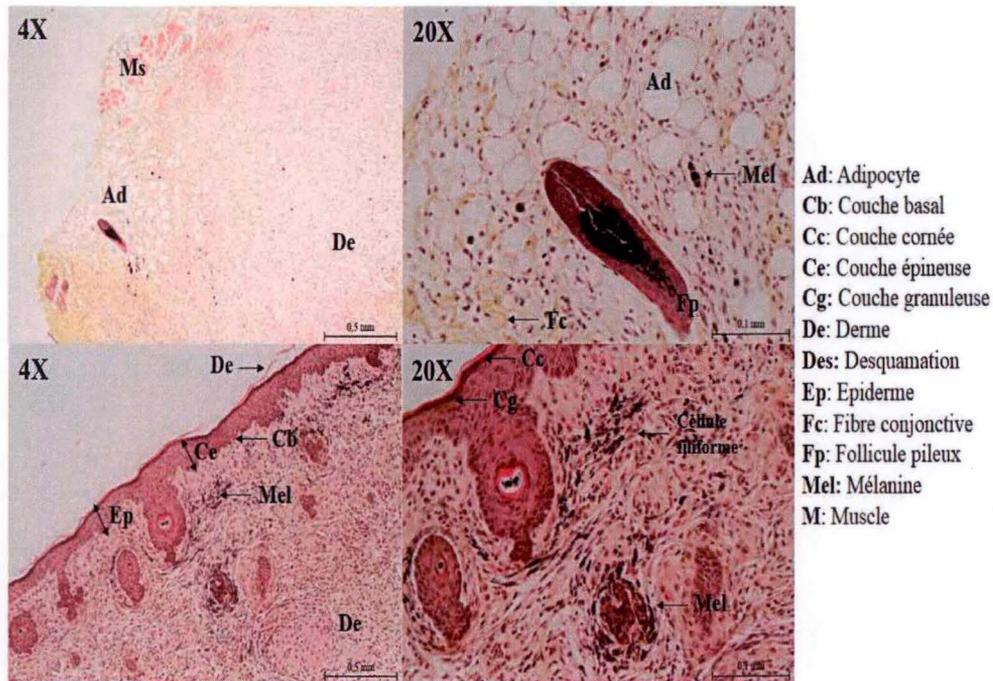
Une deuxième souris hémizygote pour *TyrCreER<sup>T2</sup>*, homozygote pour *Pten* et *Braf*, âgée de 12 semaines a également développé plusieurs tumeurs au niveau de la peau (**Figure 26**). Trois tumeurs au bas de son dos ont été observées. Cette souche développait également une lésion au niveau de sa patte postérieure droite. De plus, de petites tumeurs, très foncées étaient également visibles sur le flanc de celle-ci. Pour terminer, cette souris présentait d'importantes métastases au niveau de l'épiderme (**Figure 26, flèche bleue**). Comme pour les coupes histologiques obtenues chez la première souris, une HES a été réalisée (**Figure 27 et 28**). Comme cette coloration montre une présence très importante de mélanine, la coloration Fontana-Masson n'a pas été effectuée. Uniquement deux tumeurs ont été sélectionnées afin de procéder à leur analyse : la plus grosse lésion dans le bas du dos (**Figure 27**) et la petite tumeur, hautement pigmentée se trouvant au niveau du flanc de la souris (**Figure 28**). L'architecture de ces lésions laisse paraître que ces deux tumeurs sont similaires et qu'elles proviennent du même type cellulaire. Elles sont caractérisées par des zones hautement pigmentées au niveau dermique (**Figure 27 et 28**). Comme pour les coupes de la souris précédente, le tissu adipeux est infiltré par de nombreux types cellulaires mélanocytaires ou non-mélanocytaires. La tumeur localisée dans le bas du dos de la souris est caractérisée par de nombreux follicules pileux hautement pigmentés. Ils sont, de plus, associés à d'importantes glandes sébacées permettant de lubrifier le poil (**Figure 27**). L'asymétrie visible sur les bords de la tumeur localisée au niveau du flanc de la souris est un signe de malignité de celle-ci (**Figure 28**). Par comparaison, une tumeur bénigne est reconnaissable par sa symétrie. L'analyse de la lésion qui s'était développée au niveau du flanc de la souris affiche les mêmes caractéristiques que les tumeurs précédentes. En effet, celle-ci est hautement pigmentée mais de manière irrégulière. Le grossissement n'étant pas assez important, il n'est pas possible d'observer la présence de mitoses, signe de malignité. Cependant, celles-ci sont très faiblement représentées sur les coupes. Il est également possible d'observer, à certains endroits, la présence d'anisocaryoses et d'anisocytoses au niveau des mélanocytes. Cependant, la concentration très forte en mélanine ne permet pas d'observer, avec précision, ce phénotype cellulaire. De nombreuses cellules filiformes et épithélioïdes sont localisées au niveau du derme. Une caractéristique généralement retrouvée au niveau du mélanome est la présence d'une zone protégée située entre l'épiderme et le derme hautement pigmentée. Pour terminer, une plage de nécrose peut également être visualisée sur la coupe avec la présence d'un infiltrat de polymorphonucléaires neutrophiles.

Même si ce diagnostic a été validé par une histo-pathologiste, les mélanomes malins sont difficiles à reconnaître avec certitude. De plus, comme les souris développent rarement ce type de lésions cutanées, il existe très peu de documentation qui fournissent des critères



**Figure 23: Tumeurs développées par une souris *TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>***

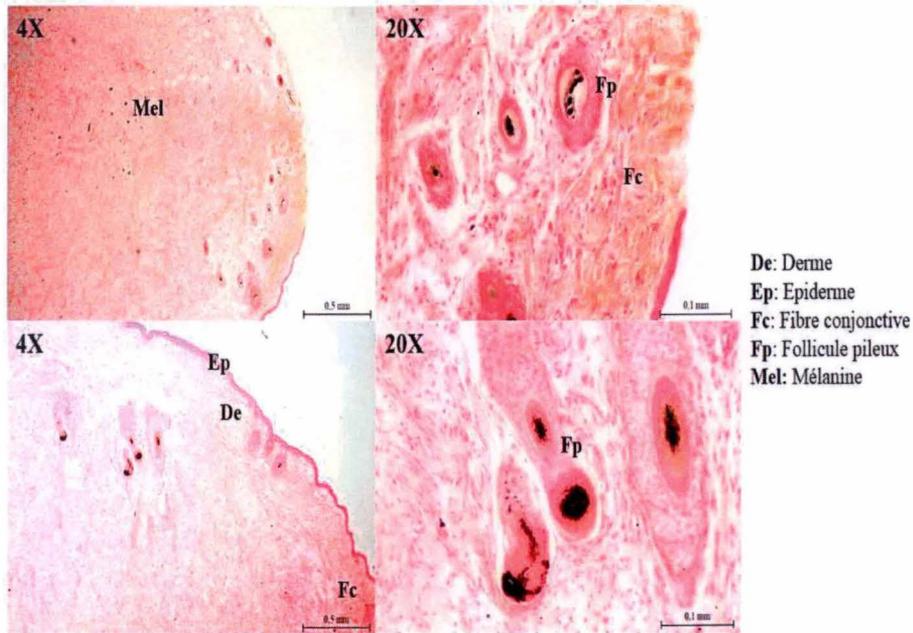
Cette souche est un modèle murin permettant d'étudier le développement des mélanomes. Il est possible d'induire des tumeurs cutanées par l'application topique de Tamoxifène/4-Hydroxytamoxifène sur la peau. Cette molécule se fixe sur la protéine de fusion *CreER<sup>T2</sup>*, induit l'activation de la recombinaise Cre et sa libération de la protéine HSP90. Lorsque *CreER<sup>T2</sup>* est activée, elle induit la recombinaison de ces sites *LoxP*. Cependant, cette souche est également capable de générer des tumeurs de manière spontanée. La souris, hémizygote pour *TyrCreER<sup>T2</sup>*, homozygote pour *Pten* et hétérozygote pour *Braf* et âgée de 14 semaines a été prise en photo. Celle-ci a généré 4 tumeurs sans application de Tamoxifène. Chaque tumeur a été identifiée et est mise en évidence par des flèches rouges. Les flèches plus fines mettent en évidence des lésions cutanées dans les premiers stades de développement. Cette souris ne montre pas de signe de métastase.



**Figure 24: Coupes histologiques en coloration HES provenant d'une tumeur cutanée développée par une souris *TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>***

Cette tumeur s'est développée chez une souche âgée de 14 semaines. Elle était hémizygote pour *TyrCreER<sup>T2</sup>*, homozygote pour *Pten* et hétérozygote pour *Braf*. Deux endroits de la coupe ont été sélectionnés et sont visualisables à un grossissement de 4X et 20X. La structure de la peau est retrouvée avec l'épiderme constitué des couches cornée, épineuse, granuleuse et basale puis le derme. La présence de follicules pileux est également visible. Cette coupe présente également les signes d'une tumeur mélanocytaire maligne. En effet, celle-ci manifeste des zones fortement pigmentées au niveau du derme. Les mélanocytes présents sur la coupe affichent un aspect filiforme. De plus le tissu adipeux est fortement infiltré par différents types cellulaires.

spécifiques permettant d'établir un diagnostic certain. Une immunohistochimie a donc été réalisée dans le but de détecter la présence d'antigènes typiquement retrouvés dans le mélanome. Un anticorps dirigé contre la protéine HMB45 et Mart1 a été testé sur les coupes en paraffine. HMB45 ou gp100 est importante pour la détermination de la différenciation mélanocytaire alors que Mart1 (*melanoma antigen recognized by T cells-1*) est exprimé dans beaucoup de lésions de type mélanocytaire qu'elles soient bénignes ou malignes (120). Cependant, suite à cette immunohistochimie, aucune conclusion n'a pu être tirée. En effet, la quantité importante de signaux non spécifiques requiert une meilleure optimisation notre protocole.



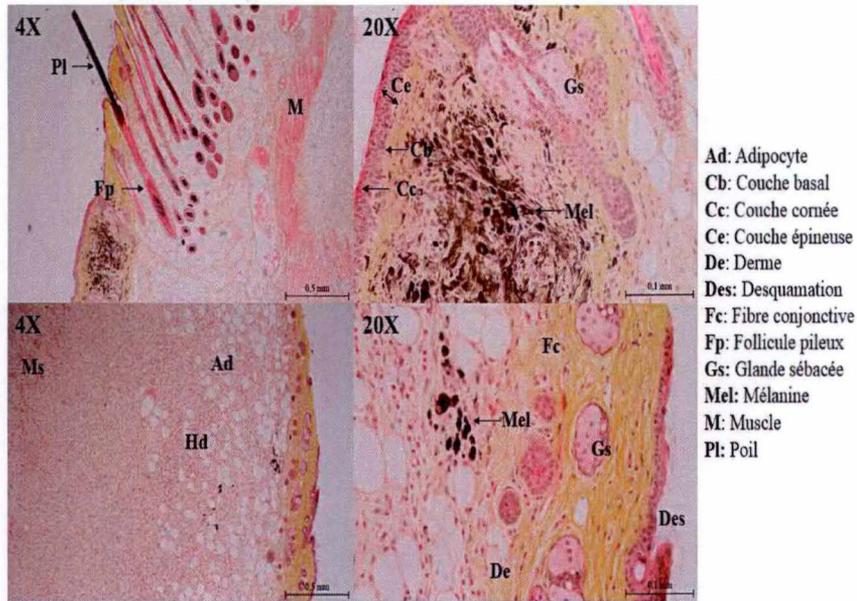
**Figure 25: Coupes histologiques en coloration Fontana-Masson suivi par une contre coloration ES provenant d'une tumeur cutanée développée par une souris  $TyrCre:Pten^{(-/-)}Braf^{(V600E)}$**

Cette tumeur s'est développée chez une souche âgée de 14 semaines. Elle était hémizygote pour  $TyrCreER^{T2}$ , homozygote pour  $Pten$  et hétérozygote pour  $Braf$ . Deux endroits de la coupe ont été sélectionnés et sont visualisables à un grossissement de 4X et 20X. La structure de la peau est retrouvée avec l'épiderme puis le derme. La coloration Fontana-Masson permet de colorer la mélanine en noir. La présence de follicules pileux pigmentés est visible. Des petites zones d'agglomérat de mélanine sont également visibles au niveau du derme de la lésion.



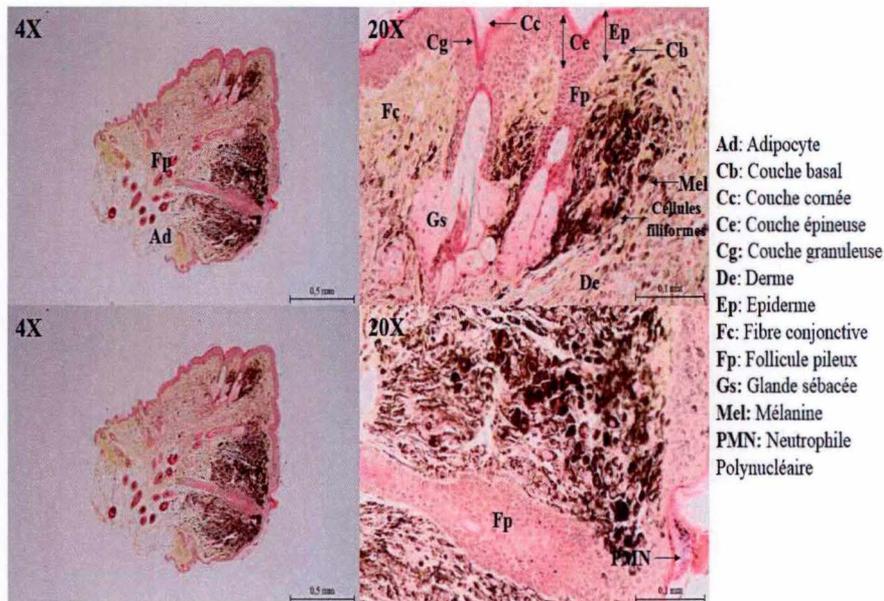
**Figure 26: Tumeurs développées par une souris  $TyrCre:Pten^{(-/-)}Braf^{(V600E)}$**

Cette souche est un modèle murin permettant d'étudier le développement des mélanomes. Il est possible d'induire des tumeurs cutanées par l'application topique de Tamoxifène/4-Hydroxytamoxifène sur la peau. Cette molécule se fixe sur la protéine de fusion  $CreER^{T2}$ , induit l'activation de la recombinase Cre et sa libération de la protéine HSP90. Lorsque  $CreER^{T2}$  est activée, elle induit la recombinaison de ces sites LoxP. Cependant, cette souche est également capable de générer des tumeurs de manière spontanée. La souris prise en photo est hémizygote pour  $TyrCreER^{T2}$ , homozygote pour  $Pten$  et  $Braf$ . Elle a généré des tumeurs après 12 semaines sans aucune application de Tamoxifène. Trois tumeurs sont localisées dans le bas du dos de celle-ci (flèche rouge). Une tumeur au niveau de la patte postérieure droite a également été analysée (flèche rouge). Cette souris présentait des zones de métastases au niveau cutané (Flèche bleue).



**Figure 27: Coupes histologiques en coloration HES provenant d'une tumeur cutanée développée par une souris *TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>***

Cette tumeur s'est développée chez une souche âgée de 12 semaines. Elle était hémizygote pour *TyrCreER<sup>T2</sup>*, homozygote pour *Pten* et homozygote pour *Braf*. Cette lésion a été prélevée au niveau du dos du bas de la souris. Deux endroits de la coupe ont été sélectionnés et sont visualisables à un grossissement de 4X et 20X. La structure de la peau est retrouvée avec l'épiderme constitué des couches cornée, épineuse, granuleuse et basale puis le derme pourvu de fibres conjonctives. La présence importante de follicules pileux est également visible. Ceux-ci sont généralement associés à des glandes sébacées qui permettent de lubrifier le poil. Cette coupe présente également les signes d'une tumeur mélanocytaire maligne. En effet, celle-ci manifeste des zones fortement pigmentées au niveau du derme. Ces cellules adoptent un aspect poussiéreux qui ne permet pas une analyse aisée de leurs noyaux. Les mélanocytes présents sur la coupe affichent un aspect filiforme. De plus le tissu adipeux est fortement infiltré par différents types cellulaires qui produisent de la mélanine ou non.



**Figure 28: Coupes histologiques en coloration HES provenant d'une tumeur cutanée développée par une souris *TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>***

Cette tumeur s'est développée chez une souche âgée de 12 semaines. Elle était hémizygote pour *TyrCreER<sup>T2</sup>*, homozygote pour *Pten* et homozygote pour *Braf*. Cette lésion a été prélevée au niveau du flanc de la souris. Deux endroits de la coupe ont été sélectionnés et sont visualisables à un grossissement de 4X et 20X. La structure de la peau est retrouvée avec l'épiderme constitué des couches cornée, épineuse, granuleuse et basale puis le derme. La présence de follicules pileux est également visible. Cette coupe présente également les signes d'une tumeur mélanocytaire maligne. En effet, celle-ci manifeste des zones fortement pigmentées au niveau du derme. Les mélanocytes présents sur la coupe affichent un aspect filiforme. De plus, une plage de nécrose est également visible sur la coupe avec la présence d'un infiltrat de polymorphonucléaires neutrophiles.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

La protéine ABCB5 est un ABC transporteur exprimé de façon prédominante dans les cellules pigmentées. Les mélanocytes et les mélanomes métastatiques sont les types cellulaires qui présentent la plus haute expression en cette protéine (118). Cependant, même si certaines hypothèses ont été énoncées, son implication dans la mélanomagenèse n'est pas encore élucidée. Plusieurs études ont montré que les cellules capables d'initier le développement de mélanomes présentaient une expression importante pour ABCB5 (66, 69, 122). Les recherches de Schatton *et al.* ont identifié le phénotype de ces cellules. Celles-ci sont caractérisées par une absence de mélanine et se localisent dans les zones peu différenciées de la tumeur. Elles ont, de plus, une forte capacité tumorigénique et permettent le maintien d'une hétérogénéité importante au sein de la tumeur (69). D'autres études s'opposent toutefois à ces hypothèses. En effet, suite à leurs analyses, Quintana *et al.* ont montré que la capacité de développer des tumeurs n'était pas restreinte à une sous-population de cellules positives pour ABCB5 (59). Cependant, l'anticorps dirigé contre ce transporteur utilisé lors de ces deux études est très controversé dans le monde de la recherche sur le mélanome. Celui-ci n'a effectivement pas été validé préalablement et n'est pas commercialement disponible.

Ce travail s'inscrit dans une étude visant à répondre à deux questions fondamentales. (1) Est-ce que le mélanome présente, comme d'autres types de cancer, des cellules souches cancéreuses capables de générer une tumeur en tous points similaire à la tumeur primaire? (2) Est-ce qu'ABCB5 est un marqueur de ces cellules souches cancéreuses dans le mélanome?

Le premier objectif de ce mémoire est la création d'un modèle murin qui développe des mélanomes de manière spontanée ou inductible tout en exprimant une protéine fluorescente verte (eGFP), couplée à la transcription d'*Abcb5*. Ces souris sont en cours de développement à partir des souches *Abcb5*-IRESeGFP (Gillet *et al.* données non publiées) et *TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>* (13, 116, 117). Contrairement à l'humain, les mélanocytes de souris sont uniquement localisés au niveau des follicules pileux (121). Par conséquent, le développement de mélanomes chez la souris est un phénomène rare (121, 123). Cette souche murine *TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup>*, commandée chez la firme *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, USA), a été élaborée par une transgénése additive au niveau de son génome dans le but d'insérer des altérations génétiques détectées dans les mélanomes humains. La fréquence de ces mutations est approximativement de 50% que ce soit pour *Braf<sup>(V600E)</sup>* que pour *Pten<sup>(-/-)</sup>* (43). Lorsque nous disposerons de notre modèle murin, le développement de tumeurs pourra être spontané : au moins 25% des souris de la colonie développeront des tumeurs entre 2 et 12 mois. Ce phénomène pourra également être accéléré suite à l'induction de celui-ci par une application cutanée topique de Tamoxifène/4-Hydroxytamoxifène. Cette molécule induira le développement de tumeurs de la peau après 21 à 28 jours (<http://jaxmice.jax.org/strain/013590.html>). Ensuite, les mélanomes seront réséqués et analysés par immunohistochimie dans le but d'identifier la présence éventuelle de l'eGFP, signe de la transcription d'*Abcb5*. Grâce à cette propriété de fluorescence, une analyse en cytométrie en flux sera également réalisée. Elle aura pour but d'isoler les cellules tumorales positives pour ABCB5 grâce à la détection de la GFP produite. Une analyse transcriptomique

et protéomique seront également réalisées afin de déterminer si ces cellules isolées possèdent des marqueurs de cellules souches. Enfin, l'injection dans des souris *nude* de cellules positives ou négatives pour ABCB5 nous permettra de déterminer si la génération d'une tumeur hétérogène dans une souris est exclusivement réservée aux cellules exprimant le transporteur d'intérêt. Les résultats de ces expériences nous permettront donc de répondre aux deux questions mentionnées antérieurement.

En outre, la souche murine *Abcb5*-IRESeGFP est très intéressante car elle nous permet de réaliser une cartographie d'expression du transporteur ABCB5. Le second objectif de ce mémoire consiste à mettre au point un protocole d'immunohistochimie élaboré, afin de détecter l'eGFP. A part dans les mélanocytes, le profil d'expression d'ABCB5 n'est pas encore bien documenté. Même si Kawanobe *et al.* ont récemment isolés l'ADNc de la forme typique d'ABCB5 dans les testicules (92), ils n'ont pu déterminer le type cellulaire dans lequel ABCB5 a été détecté. Par conséquent, la détermination du profil d'expression d'ABCB5 dans un modèle murin nous permettrait de générer de nouvelles hypothèses quant aux fonctions de celui-ci dans des cellules normales, en conditions physiologiques.

Une PCR quantitative a été réalisée dans le but de détecter la présence de l'ARNm du transporteur *Abcb5* chez une souris *Wild-Type*. Seuls certains organes ont été analysés durant cette expérience. Comme il a été démontré qu'*Abcb5* était exprimé dans les mélanocytes (118), les premiers tissus sélectionnés sont les organes possédant, dans leur architecture tissulaire, des cellules pigmentées : les yeux et la peau de la queue. Les souris analysées étant âgées de 4 et 7 mois, la peau du dos n'a pas été prélevée. En effet, les mélanocytes de souris sont uniquement localisés au niveau des follicules pileux (121). La présence d'*Abcb5* est, par conséquent, très faible car la production d'eumélanine est uniquement activée lors de la croissance du poil. Par conséquent, l'analyse de l'expression d'*Abcb5* au niveau de la peau du dos devait nécessairement se faire sur un animal jeune. En effet, pour que la mélanogenèse soit significative, les souris doivent être âgées de 8 à 12 jours, période de la croissance pileuse (124, 125). Les autres organes prélevés sont les testicules et différentes parties des intestins dont l'expression d'*Abcb5* a déjà été mise en évidence (96, 126). De manière similaire, la PCR quantitative réalisée détecte également la présence de l'ARNm de ce transporteur au niveau des testicules et de l'intestin de souris. L'absence d'expression de cette protéine au niveau des yeux de souris est sujette à débat. En effet, cet organe sensoriel est caractérisé par la présence importante de cellules pigmentées. De plus, Jing *et al.* ont observé la formation de macro-mélanosomes au niveau de la choroïde et du stroma de l'iris. Dans leur article, ils suggèrent que les yeux constituent un excellent modèle pour la production de mélanine (127). Sur base de nos résultats, nous avons choisi le testicule pour mettre au point un protocole d'immunohistochimie.

L'utilisation de techniques immunohistochimiques dans le but de détecter l'eGFP à plusieurs avantages. Par exemple, le signal fluorescent de cette protéine est relativement stable car son chromophore est protégé de l'environnement extérieur grâce à sa conformation tridimensionnelle. Au contraire de la luciférase, l'émission de la fluorescence de l'eGFP ne nécessite pas l'ajout d'un substrat particulier. En effet, la protéine émet une fluorescence verte suite au contact avec une longueur d'onde adéquate permettant de l'exciter. De plus, l'eGFP

génère des signaux 1000 fois plus important que la luciférase (128). Cependant, plusieurs contraintes existent également. La présence d'une cassette d'insertion IRESeGFP dans le génome murin peut induire une auto-fluorescence des tissus plus importante. Ce pourcentage élevé de faux négatifs peut, toutefois, être évité grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-GFP. L'emploi d'une immunoglobuline anti-GFP permet également de générer un signal dans le cas où la fluorescence de la protéine GFP serait altérée. De plus, la production d'une protéine fluorescente, soluble, peut constituer un problème supplémentaire. En effet, même si cette construction a été initialement élaborée afin d'éviter la création d'une protéine de fusion ABCB5eGFP qui pourrait aboutir à la traduction d'un transporteur non fonctionnel, certaines techniques histologiques peuvent induire la perte de la GFP. En effet, certains traitements peuvent mener à une altération de l'intégrité de la cellule aboutissant à la perte de la protéine fluorescente. Par conséquent, la méthode utilisée pour la cartographie d'*Abcb5* doit préserver les membranes cellulaires (129).

Le premier protocole testé sur une souris de 10 mois montre une fluorescence un peu plus importante au niveau de la membrane basale des canaux séminifères. Celui-ci associait la capacité importante de pénétration du tissu de la paraformaldéhyde avec la grande faculté de fixation de l'acide picrique (130). Cependant, les coupes présentaient un bruit de fond très important qui pourrait être responsable d'un phénomène de masquage des signaux de fluorescence verte.

Le deuxième protocole testé permettait une fixation du tissu sans ajout d'acide picrique. Toutefois, comme le paraformaldéhyde a une capacité de fixation moindre, la souris de 8 semaines a été perfusée avec une solution de PFA puis a subi une fixation secondaire par immersion dans cette solution. En comparaison avec le protocole précédant, le bruit de fond est considérablement diminué. Cependant, la fluorescence verte de l'eGFP précédemment visible au niveau de la membrane basale des canaux séminifères n'est plus perceptible. La présence d'une fluorescence rouge générée par l'anticorps au niveau des canaux est à peine visible. Ce deuxième protocole a été réitéré sur une souris de 8 semaines où aucun signal rouge n'a été détecté. Toutefois, la présence d'une fluorescence verte importante située dans les tissus interstitiels est observable aussi bien avec les souris *Abcb5*-IRESeGFP qu'avec les souris *Wild-Type*.

En résumé, le premier protocole semble idéal pour la préservation de la fluorescence générée par la GFP, au contraire du deuxième protocole réalisé. De plus, il ne semble pas altérer la reconnaissance de l'anticorps anti-GFP pour ces antigènes. Il génère toutefois un bruit de fond beaucoup plus important par rapport au protocole testé secondairement. Ne possédant pas une colonie de souris *Abcb5*-IRESeGFP assez importante, la vérification de ces données grâce à des répliques, n'a pu être réalisée.

La présence d'une fluorescence verte associée à des signaux rouge produits par l'anticorps se localise au niveau de la membrane basale des canaux séminifères. Les cellules bordant la paroi de ces tubes sont les spermatogonies caractérisées par des propriétés de cellules souches. Celles-ci dérivent des cellules germinales primordiales et permettent le maintien d'une spermatogenèse importante et constante (131). En effet, ces cellules souches, en contact avec leur niche, sont capables de générer de nouvelles cellules qui, après leur méiose, vont

entrer dans la spermiogenèse afin de produire des spermatozoïdes. Elles peuvent également se renouvelées dans le but de maintenir une population de cellules souches constante (132). Une étude publiée en 2004 par Falciatori *et al.* présente une technique qui permet l'identification de ce type cellulaire ayant les propriétés de cellules souches. Cette méthode se base sur la capacité de ces cellules à expulser le colorant Hoechst 33342 grâce à l'activation de pompes de type ABC. Par conséquent, les cellules non marquées situées en bordure des canaux séminifères sont identifiées comme des cellules de type progénitrice (132). Ces données expérimentales rappellent la capacité d'expulsion d'agents chimio-thérapeutiques rencontrée chez les cellules cancéreuses constituant le mélanome. Avec sa capacité d'effluer plusieurs molécules xénobiotiques comme la doxorubicine (109), le paclitaxel ou le docetaxel (92), le transporteur ABCB5 pourrait être exprimé par ces spermatogonies caractérisées par des propriétés de cellules souches.

La présence de fluorescence verte dans le tissu interstitiel entourant les canaux séminifères est sujette à débat. En effet, excepté lors du premier protocole, ces signaux verts ne sont pas associés à une fluorescence rouge. Par conséquent, deux hypothèses peuvent être émises. Le deuxième protocole testé pourrait n'être pas assez efficace pour induire une rétention de la GFP assez forte. Par conséquent, cette protéine libérée dans le milieu n'est plus reconnue par l'anticorps. La deuxième hypothèse est que le tissu interstitiel émet une auto-fluorescence verte qui n'est pas liée à la présence de GFP au sein de ces cellules. La présence de cette fluorescence détectée au niveau de la souris *Wild-Type* préalablement perfusée et fixée secondairement avec une solution de paraformaldéhyde apporte les preuves expérimentales d'un phénomène d'auto-fluorescence du tissu. Les cellules de Leydig localisées au niveau de cet espace interstitiel pourraient être responsables de ce phénomène non spécifique. En effet, ces cellules dérivant de cellules souches mésenchymateuses sont impliquées dans la production de testostérone. Lors du développement fœtal murin, un niveau important en cette hormone est nécessaire. En effet, elle influence la morphogenèse de certains organes, la fonction neurale ou l'activité enzymatique de certaines protéines seulement exprimées durant la vie de la souris (133).

Le transporteur ABCB5 pourrait être exprimé par ces cellules de Leydig. En effet, ces cellules participent avec les cellules de Sertoli et les cellules endothéliales constituant les capillaires au maintien de la barrière hémato-testiculaire. Cette structure constitue une protection interne des testicules face à des substances xénobiotiques. L'expression d'ABC transporteurs au niveau de ces membranes permet l'efflux de molécules qui pourraient être toxiques pour les cellules germinales (134). Une preuve supplémentaire de l'implication d'ABCB5 dans ce type de protection interne est que celui-ci joue un rôle dans l'établissement de la barrière hémato-encéphalique. En effet, il a été montré qu'ABCB5 était exprimé dans le cerveau, au niveau des capillaires (article en presse). Cependant, la détection d'une fluorescence verte au niveau des cellules de Leydig issues de souris *Wild-Type* ne permet pas de valider cette hypothèse. Cette émission de fluorescence verte peut être due à l'activité des cellules de Leydig. Ces cellules commencent à produire une quantité maximale de testostérone 45 jours après la naissance de la souris. Avant ce stade, les cellules de Leydig sont maintenues dans un état prépubertaire indifférencié (135). Cette phase précédant la maturité sexuelle de la souris

n'avait pas été dépassée pour les deux premières souris *Wild-Type* perfusées, au contraire de la dernière souche murine.

La technique qui permettrait de déterminer si ABCB5 est véritablement exprimée par les cellules de Leydig est l'analyse immunohistochimique de ces coupes en utilisant la technique avidine-biotine-peroxydase. Celle-ci permettrait d'utiliser un anticorps primaire anti-GFP, reconnu par un anticorps secondaire couplé à un système de peroxydase. Cette technique détecterait donc l'eGFP produite par les cellules positives pour ABCB5 sans visualiser la fluorescence de celle-ci.

Les deux souches murines impliquées dans la création du modèle *Abcb5*-IRESeGFP:TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup> ont été validées. D'une part, le transgène IRESeGFP a été vérifié par séquençage et l'eGFP a été détectée au sein des souris *Abcb5*-IRESeGFP. D'autre part, la souche murine TyrCre:Pten<sup>(-/-)</sup>Braf<sup>(V600E)</sup> est capable de développer des lésions cutanées de manière spontanée. Suite à l'analyse histologique, ces tumeurs affichent certains critères spécifiques d'un mélanome malin. Cependant, les mélanomes malins sont difficiles à reconnaître avec certitude. Par conséquent, l'optimisation d'une technique immunohistochimique ciblant des protéines spécifiquement retrouvées dans les mélanomes (HMB45 ou Mart1) sera nécessaire. La détection de ces antigènes permettra de diagnostiquer avec certitude les tumeurs développées par les souris mutées dans ses gènes *Pten* et *Braf*.

En conclusion, ce mémoire a permis de débiter la génération d'un modèle murin qui développe des mélanomes de manière spontanée ou inductible tout en exprimant une protéine fluorescente verte (eGFP), couplée à la transcription d'*Abcb5*. Celui-ci constituera un outil d'expérimentation important qui nous permettra de déterminer si le mélanome contient des cellules souches cancéreuses et si ces cellules peuvent être identifiées par le transporteur ABCB5. Seuls quelques croisements sont encore nécessaires pour la génération de cette souche murine. Ces quelques mois ont également été mis à profit pour tester et évaluer plusieurs protocoles d'immunohistochimies. L'objectif de ces essais était de déterminer la méthode qui permet de préserver, au mieux, la fluorescence de la GFP produite par les souris *Abcb5*-IRESeGFP. Après la validation, sur plusieurs souris, du protocole de fixation transcardiaque avec une solution de PBS (0.01M)/PFA (4%)/acide picrique (7%), la cartographie de la souris *Abcb5*-IRESeGFP pourra débiter. Des données préliminaires ont également été obtenues ont niveau des testicules de ces souris. Celles-ci montrent une fluorescence plus importante au niveau de la membrane basale des canaux séminifères, où se localise les spermatogonies ayant les caractéristiques des cellules souches. La cartographie complète du profil d'expression d'ABCB5 chez la souris peut maintenant être entreprise.

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. U. Leiter, T. Eigentler, C. Garbe, Epidemiology of skin cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **810**, 120–40 (2014).
2. J. E. Mayer, S. M. Swetter, T. Fu, A. C. Geller, Screening, early detection, education, and trends for melanoma: Current status (2007-2013) and future directions. *J. Am. Acad. Dermatol.* **71**, 599.e1–599.e12 (2014).
3. J. Ferlay *et al.*, Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer.* **49**, 1374–403 (2013).
4. K. Lacy, W. Alwan, Skin cancer. *Medicine (Baltimore).* **41**, 402–405 (2013).
5. R. Gordon, Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. *Semin. Oncol. Nurs.* **29**, 160–9 (2013).
6. K. Lacy, W. Alwan, Skin cancer. *Medicine (Baltimore).* **41**, 402–405 (2013).
7. S. Chummun, N. R. McLean, The management of malignant skin cancers. *Surg.* **32**, 485–490 (2014).
8. C. C. Boring, T. S. Squires, T. Tong, Cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* **41**, 19–36 (1991).
9. Cancer Research UK, “Cancer Statistics : Skin cancer” (2014).
10. J. H. Cooley, L. M. Quale, Skin cancer preventive behavior and sun protection recommendations. *Semin. Oncol. Nurs.* **29**, 223–6 (2013).
11. R. J. T. van der Leest *et al.*, The Euromelanoma skin cancer prevention campaign in Europe: characteristics and results of 2009 and 2010. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **25**, 1455–65 (2011).
12. K. Satyamoorthy, M. Herlyn, Cellular and Molecular Biology of Human Melanoma. *Cancer Biol. Ther.* **1**, 14–17 (2002).
13. D. Dankort *et al.*, Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat. Genet.* **41**, 544–52 (2009).
14. K. G. Chen *et al.*, Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9903–7 (2006).
15. S. Gaudi, J. L. Messina, Molecular bases of cutaneous and uveal melanomas. *Patholog. Res. Int.* **2011**, 159421 (2011).
16. E. Dupin, N. M. Le Douarin, Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene.* **22**, 3016–23 (2003).

17. L. Lecoin *et al.*, Cloning and characterization of a novel endothelin receptor subtype in the avian class. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3024–9 (1998).
18. R. M. White, L. I. Zon, Melanocytes in development, regeneration, and cancer. *Cell Stem Cell.* **3**, 242–52 (2008).
19. R. N. Kelsh, M. L. Harris, S. Colanesi, C. A. Erickson, Stripes and belly-spots -- a review of pigment cell morphogenesis in vertebrates. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 90–104 (2009).
20. J. Y. Lin, D. E. Fisher, Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* **445**, 843–50 (2007).
21. M. A. Teillet, N. Le Douarin, [The migration of pigmentary cells studies by the method of heterospecific grafts of neural tube in bird embryo]. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* **270**, 3095–8 (1970).
22. H. Ando *et al.*, Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 1222–9 (2012).
23. G.-E. Costin, V. J. Hearing, Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* **21**, 976–94 (2007).
24. M. Tsatmali, J. Ancans, A. J. Thody, Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 125–33 (2002).
25. I. F. dos S. Videira, D. F. L. Moura, S. Magina, Mechanisms regulating melanogenesis. *An. Bras. Dermatol.* **88**, 76–83 (2013).
26. M. Seiberg, Keratinocyte-Melanocyte Interactions During Melanosome Transfer. *Pigment Cell Res.* **14**, 236–242 (2001).
27. J.-P. Ortonne, Photoprotective properties of skin melanin. *Br. J. Dermatol.* **146**, 7–10 (2002).
28. S. Kuphal, A. Bosserhoff, Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. *J. Pathol.*, 400–409 (2009).
29. C. Gaggioli, E. Sahai, Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* **20**, 161–72 (2007).
30. L. Ha, G. Merlino, E. V Sviderskaya, Melanomagenesis: overcoming the barrier of melanocyte senescence. *Cell Cycle.* **7**, 1944–8 (2008).
31. H. Swalwell, J. Latimer, R. M. Haywood, M. a Birch-Machin, Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 626–34 (2012).

32. N. V Margaryan *et al.*, EphA2 as a promoter of melanoma tumorigenicity. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 279–88 (2009).
33. G. Zhang *et al.*, EphA2 is an essential mediator of UV radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* **68**, 1691–6 (2008).
34. S. Bis, H. Tsao, Melanoma genetics: the other side. *Clin. Dermatol.* **31**, 148–55 (2013).
35. T. Schwarz, A. Schwarz, Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced immunosuppression. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 560–4 (2011).
36. F. R. de Gruijl, UV-induced immunosuppression in the balance. *Photochem. Photobiol.* **84**, 2–9 (2008).
37. L. Timares, S. K. Katiyar, C. A. Elmetts, DNA damage, apoptosis and langerhans cells-Activators of UV-induced immune tolerance. *Photochem. Photobiol.* **84**, 422–36 (2008).
38. A. Schwarz *et al.*, Prevention of UV radiation-induced immunosuppression by IL-12 is dependent on DNA repair. *J. Exp. Med.* **201**, 173–9 (2005).
39. D. T. Leicht *et al.*, Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1773**, 1196–212 (2007).
40. C. Andreadi *et al.*, Regulation of MEK/ERK pathway output by subcellular localization of B-Raf. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 67–72 (2012).
41. R. D. Hall, R. R. Kudchadkar, BRAF mutations: signaling, epidemiology, and clinical experience in multiple malignancies. *Cancer Control.* **21**, 221–30 (2014).
42. S. Wiese *et al.*, Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nat. Neurosci.* **4**, 137–42 (2001).
43. H. Tsao, L. Chin, L. A. Garraway, D. E. Fisher, Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* **26**, 1131–55 (2012).
44. P. Uribe, I. I. Wistuba, S. González, BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin. *Am. J. Dermatopathol.* **25**, 365–70 (2003).
45. V. Marsh Durban, M. M. Deuker, M. W. Bosenberg, W. Phillips, M. McMahon, Differential AKT dependency displayed by mouse models of BRAFV600E-initiated melanoma. *J. Clin. Invest.* **123**, 5104–18 (2013).
46. C. Michaloglou *et al.*, BRAFV600E-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* **436**, 720–4 (2005).
47. G. Palmieri *et al.*, Main roads to melanoma. *J. Transl. Med.* **7**, 86 (2009).

48. Y. Yin, W. H. Shen, PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene*. **27**, 5443–53 (2008).
49. M. Tamura, Inhibition of Cell Migration, Spreading, and Focal Adhesions by Tumor Suppressor PTEN. *Science (80-. )*. **280**, 1614–1617 (1998).
50. L. C. W. Vredeveld *et al.*, Abrogation of BRAF V600E -induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev.*, 1055–1069 (2012).
51. L. Chin, The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat. Rev. Cancer*. **3**, 559–70 (2003).
52. J. W. Harbour, The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*. **14**, 2393–2409 (2000).
53. T. Lapidot *et al.*, A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. **367**, 645–8 (1994).
54. S. K. Singh *et al.*, Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res*. **63**, 5821–5828 (2003).
55. M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, M. F. Clarke, Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3983–8 (2003).
56. M. F. Clarke *et al.*, Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. **66**, 9339–44 (2006).
57. S. E. Zabierowski, M. Herlyn, Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma. *J. Clin. Oncol*. **26**, 2890–4 (2008).
58. D. Fang *et al.*, A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*. **65**, 9328–37 (2005).
59. E. Quintana *et al.*, Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell*. **18**, 510–23 (2010).
60. M. Ohanna *et al.*, Secretome from senescent melanoma engages the STAT3 pathway to favor reprogramming of naive melanoma towards a tumor-initiating cell phenotype. *Oncotarget*. **4**, 2212–24 (2013).
61. R. Santini *et al.*, SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Oncogene* (2014).
62. J. Mo *et al.*, The in-vitro spheroid culture induces a more highly differentiated but tumorigenic population from melanoma cell lines. *Melanoma Res*. **23**, 254–63 (2013).
63. A. D. Boiko, Isolation of melanoma tumor-initiating cells from surgical tissues. *Methods Mol. Biol*. **961**, 253–9 (2013).

64. M. Sztiller-Sikorska *et al.*, Sphere formation and self-renewal capacity of melanoma cells is affected by the microenvironment. *Melanoma Res.* **22**, 215–24 (2012).
65. B. K. Sharma, V. Manglik, E. G. Elias, Immuno-expression of human melanoma stem cell markers in tissues at different stages of the disease. *J. Surg. Res.* **163**, e11–5 (2010).
66. P. Gazzaniga *et al.*, CD133 and ABCB5 as stem cell markers on sentinel lymph node from melanoma patients. *Eur. J. Surg. Oncol.* **36**, 1211–4 (2010).
67. G. Civenni *et al.*, Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer Res.* **71**, 3098–109 (2011).
68. A. a Bahnassy *et al.*, Aberrant expression of cancer stem cell markers (CD44, CD90, and CD133) contributes to disease progression and reduced survival in hepatoblastoma patients: 4-year survival data. *Transl. Res.*, 1–11 (2014).
69. T. Schatton *et al.*, Identification of cells initiating human melanomas. *Nature.* **451**, 345–9 (2008).
70. K. Ueda, ABC proteins protect the human body and maintain optimal health. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 401–9 (2011).
71. V. Vasiliou, K. Vasiliou, D. W. Nebert, Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum. Genomics.* **3**, 281–90 (2009).
72. C. F. Higgins, ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67–113 (1992).
73. F. J. Sharom, ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics.* **9**, 105–27 (2008).
74. H. Glavinas, P. Krajcsi, J. Cserepes, B. Sarkadi, The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr. Drug Deliv.* **1**, 27–42 (2004).
75. A. M. George, P. M. Jones, Perspectives on the structure e function of ABC transporters : The Switch and Constant Contact Models. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **109**, 95–107 (2012).
76. K. P. Hopfner *et al.*, Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell.* **101**, 789–800 (2000).
77. J. A. Sheps, S. Ralph, Z. Zhao, D. L. Baillie, V. Ling, The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol.* **5**, R15 (2004).
78. G. a Altenberg, The engine of ABC proteins. *News Physiol. Sci.* **18**, 191–5 (2003).

79. C. F. Higgins, K. J. Linton, The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 918–26 (2004).
80. A. M. George, P. M. Jones, An asymmetric post-hydrolysis state of the ABC transporter ATPase dimer. *PLoS One.* **8**, e59854 (2013).
81. K. J. Linton, Structure and Function of ABC Transporters ABC Transporters are Ubiquitous. *Physiology.* **22**, 122–130 (2007).
82. K. P. Locher, Structure and mechanism of ABC transporters, (2004).
83. P. M. Jones, A. M. George, Mechanism of the ABC transporter ATPase domains: catalytic models and the biochemical and biophysical record. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 39–50 (2012).
84. P. M. Jones, A. M. George, Opening of the ADP-bound active site in the ABC transporter ATPase dimer: evidence for a constant contact, alternating sites model for the catalytic cycle. *Proteins.* **75**, 387–96 (2009).
85. M. Dean, a Rzhetsky, R. Allikmets, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**, 1156–66 (2001).
86. M. Dean, T. Annilo, Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **6**, 123–42 (2005).
87. M. Dean, Y. Hamon, G. Chimini, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* **42**, 1007–1017 (2001).
88. R. L. Juliano, V. Ling, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **455**, 152–62 (1976).
89. J. A. Endicott *et al.*, Simultaneous expression of two P-glycoprotein genes in drug-sensitive Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 4075–81 (1987).
90. V. Ling, N. Kartner, T. Sudo, L. Siminovitch, J. R. Riordan, Multidrug-resistance phenotype in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Treat. Rep.* **67**, 869–74 (1983).
91. R. Allikmets, B. Gerrard, A. Hutchinson, M. Dean, Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1649–55 (1996).
92. T. Kawanobe *et al.*, Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **418**, 736–41 (2012).
93. K. Moitra *et al.*, Molecular evolutionary analysis of ABCB5: the ancestral gene is a full transporter with potentially deleterious single nucleotide polymorphisms. *PLoS One.* **6**, e16318 (2011).
94. N. Y. Frank, M. H. Frank, ABCB5 gene amplification in human leukemia cells. *Leuk. Res.* **33**, 1303–5 (2009).

95. K. G. Chen, J. C. Valencia, J.-P. Gillet, V. J. Hearing, M. M. Gottesman, Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 740–9 (2009).
96. K. G. Chen *et al.*, Principal expression of two mRNA isoforms (ABCB 5 $\alpha$  and ABCB 5 $\beta$ ) of the ATP-binding cassette transporter gene ABCB 5 in melanoma cells and melanocytes. *Pigment Cell Res.* **18**, 102–12 (2005).
97. N. Y. Frank *et al.*, Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* **278**, 47156–65 (2003).
98. N. Terada *et al.*, Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* **416**, 542–5 (2002).
99. Q.-L. Ying, J. Nichols, E. P. Evans, A. G. Smith, Changing potency by spontaneous fusion. *Nature.* **416**, 545–8 (2002).
100. B. J. Wilson *et al.*, ABCB5 Maintains Melanoma-Initiating Cells through a Proinflammatory Cytokine Signaling Circuit. *Cancer Res.* **74**, 4196–207 (2014).
101. S. Singh, K. C. Nannuru, A. Sadanandam, M. L. Varney, R. K. Singh, CXCR1 and CXCR2 enhances human melanoma tumorigenesis, growth and invasion. *Br. J. Cancer.* **100**, 1638–46 (2009).
102. B. J. Wilson *et al.*, ABCB5 Maintains Melanoma-Initiating Cells through a Proinflammatory Cytokine Signaling Circuit. *Cancer Res.* **74**, 4196–207 (2014).
103. F. M. Burnet, Immunological aspects of malignant disease. *Lancet.* **289**, 1171–1174 (1967).
104. R. A. Gatti, R. A. Good, Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer.* **28**, 89–98 (1971).
105. A. Corthay, Does the immune system naturally protect against cancer? *Front. Immunol.* **5**, 197 (2014).
106. G. P. Dunn, L. J. Old, R. D. Schreiber, The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 329–60 (2004).
107. T. Schatton *et al.*, Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells. *Cancer Res.* **70**, 697–708 (2010).
108. I. Vásquez-Moctezuma *et al.*, ATP-binding cassette transporter ABCB5 gene is expressed with variability in malignant melanoma. *Actas Dermosifiliogr.* **101**, 341–8 (2010).
109. N. Y. Frank *et al.*, ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res.* **65**, 4320–33 (2005).

110. M. V Keniya *et al.*, Drug Resistance Is Conferred on the Model Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Expression of Full-Length Melanoma-Associated Human ATP-Binding Cassette Transporter ABCB5. *Mol. Pharm.* **11**, 3452–62 (2014).
111. K. L. Kusser, T. D. Randall, Simultaneous detection of EGFP and cell surface markers by fluorescence microscopy in lymphoid tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **51**, 5–14 (2003).
112. A. Dhaka, T. J. Earley, J. Watson, A. Patapoutian, Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *J. Neurosci.* **28**, 566–75 (2008).
113. G. Trichas, J. Begbie, S. Srinivas, Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC Biol.* **6**, 40 (2008).
114. L. M. Houdebine, J. Attal, Internal ribosome entry sites (IRESs): reality and use. *Transgenic Res.* **8**, 157–77 (1999).
115. R. B. Lorsbach *et al.*, Role of RUNX1 in adult hematopoiesis: analysis of RUNX1-IRES-GFP knock-in mice reveals differential lineage expression. *Blood.* **103**, 2522–9 (2004).
116. D. Dankort *et al.*, A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev.* **21**, 379–84 (2007).
117. N. Dhomen *et al.*, Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell.* **15**, 294–303 (2009).
118. S. Heimerl, A. K. Bosserhoff, T. Langmann, J. Ecker, G. Schmitz, Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. *Melanoma Res.* **17**, 265–73 (2007).
119. A. Zembowicz, M. C. Mihm, Dermal dendritic melanocytic proliferations: an update. *Histopathology.* **45**, 433–51 (2004).
120. V. G. Prieto, C. R. Shea, Immunohistochemistry of Melanocytic Proliferations (2011).
121. L. Larue, F. Beermann, Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment Cell Res.* **20**, 485–97 (2007).
122. M. Chartrain *et al.*, Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. *PLoS One.* **7**, e36762 (2012).
123. J. Berkelhammer, R. W. Oxenhandler, R. R. Hook, J. M. Hennessy, Development of a new melanoma model in C57BL/6 mice. *Cancer Res.* **42**, 3157–63 (1982).
124. A. Slominski *et al.*, Hair follicle pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 13–21 (2005).
125. A. Slominski, R. Paus, R. Costantino, Differential expression and activity of melanogenesis-related proteins during induced hair growth in mice. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 172–9 (1991).

126. B. J. Wilson *et al.*, ABCB5 identifies a therapy-refractory tumor cell population in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* **71**, 5307–16 (2011).
127. R. Jing *et al.*, Two distinct phenotypes in pigmented cells of different embryonic origins in eyes of pale ear mice. *Exp. Eye Res.* **119**, 35–43 (2014).
128. R. M. Hoffman, M. Yang, Whole-body imaging with fluorescent proteins. *Nat. Protoc.* **1**, 1429–38 (2006).
129. E. S. Swenson, J. G. Price, T. Brazelton, D. S. Krause, Limitations of green fluorescent protein as a cell lineage marker. *Stem Cells.* **25**, 2593–600 (2007).
130. W. D. Eldred, C. Zucker, H. J. Karten, S. Yazulla, Comparison of fixation and penetration enhancement techniques for use in ultrastructural immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **31**, 285–92 (1983).
131. S. Yoshida, Stem cells in mammalian spermatogenesis. *Dev. Growth Differ.* **52**, 311–7 (2010).
132. I. Falciatori *et al.*, Identification and enrichment of spermatogonial stem cells displaying side-population phenotype in immature mouse testis. *FASEB J.* **18**, 376–8 (2004).
133. H. Chen, E. Stanley, S. Jin, B. R. Zirkin, Stem Leydig cells: from fetal to aged animals. *Birth Defects Res. C. Embryo Today.* **90**, 272–83 (2010).
134. A. C. A. Dankers *et al.*, Endocrine disruptors differentially target ATP-binding cassette transporters in the blood-testis barrier and affect Leydig cell testosterone secretion in vitro. *Toxicol. Sci.* **136**, 382–91 (2013).
135. X. Wu, R. Arumugam, N. Zhang, M. M. Lee, Androgen profiles during pubertal Leydig cell development in mice. *Reproduction.* **140**, 113–21 (2010).

# DONNEES SUPPLEMENTAIRES

Numéro	Nom	Séquences	Concentration finale
PG1_F	PG 1_GFPlong_F	CTCACAGACTCTCTACAATAC	250 nM
PG1_R	PG 1_GFPlong_R	ACCCATCATGTGGATGCTGA	250 nM
PG2_F	PG2Braf_F	TGAGTATTTTTGTGGCAACTGC	1 µM
PG2_R	PG2Braf_R	CTCTGCTGGGAAAGCGGC	1 µM
PG11_F	PG11pten_F	CAAGCACTCTGCGAACTGAG	1 µM
PG11_R	PG11pten_R	AAGTTTTTGAAGGCAAGATGC	1 µM
Zfy 11	Sexing primers	GTAGGAAGAATCTTTCTCATGCTG	500 nM
Zfy 12	Sexing primers	TTTTTGAGTGCTGATGGGTGACGG	500 nM
Cre 1	Primer Cre	ACATG TTCAGGGATCGCCAG	500 nM
Cre 2	Primer Cre	CCTGTTTTGCACGTTACCG	500 nM
PG12	Contrôle interne 1	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC	1 µM
PG12	Contrôle interne 2	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT	1 µM
PG12	Transgène_F	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	1 µM
PG12	Transgène_R	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	1 µM

**Tableau 1: Liste des oligonucléotides**

Tableau reprenant les oligonucléotides utilisés pour le génotypage des souris. Les concentrations des oligonucléotides sont adaptées en fonction de la PCR effectuée

Souris	Echantillons	Gène cible	Ct	Moyenne des Ct	$\Delta$ Ct
Mâle 1 (MWT 1)	Duodénum	ABCB5	NA	/	/
			NA		
		18S	12,7	12,7	
			12,7		
	Intestin grêle	ABCB5	NA	/	/
			NA		
		18S	13,4	13,5	
			13,6		
	Colon	ABCB5	NA	/	/
			NA		
		18S	12,1	12,0	
			12,0		
	Testicule	ABCB5	32,9	32,8	22,6
			32,6		
		18S	10,0	10,1	
			10,2		
	Œil	ABCB5	NA	/	/
			NA		
18S		11,5	11,4		
		11,3			
Peau de la queue	ABCB5	NA	/	/	
		NA			
	18S	14,8	14,7		
		14,6			
Mâle 2 (MWT 2)	Intestin	ABCB5	NA	/	/
			NA		
		18S	13,0	13,1	
			13,3		
	Testicule	ABCB5	28,4	28,4	16,7
			28,5		
		18S	11,7	11,8	
			11,8		
	Œil	ABCB5	NA	/	/
			NA		
		18S	13,3	13,3	
			13,3		
Peau de la queue	ABCB5	38,1	37,6	22,7	
		37,2			
	18S	15,1	15,0		
		14,8			
Mâle 3 (MWT 3)	Intestin	ABCB5	NA	36,3	22,2
			36,3		
		18S	14,0	14,1	
			14,1		
	Testicule	ABCB5	29,3	29,1	17,6
			28,8		
		18S	11,8	11,4	
			11,1		
	Œil	ABCB5	NA	/	/
			NA		
18S		12,3	12,3		
		12,3			
/	Contrôle négatif	ABCB5	NA	/	/
			NA		
		18S	36,5	36,7	
			36,9		

**Tableau 2: Résultats de la PCR en temps réelle**

Ce tableau récapitule l'ensemble des données obtenues grâce à la PCR en temps réelle utilisant la technologie Taqman. Pour chaque échantillon, le Ct (*Cycle threshold*), la moyenne des Ct et le  $\Delta$ Ct sont répertoriés dans le cas où l'amplification des gènes cibles (*Abcb5*, 18S) a dépassé la valeur seuil fixée par le programme. Le  $\Delta$ Ct de l'intestin du MWT 2 est coloré en rouge car seulement un seul des duplicats apparaît positif pour l'ARNm d'*Abcb5*. Pour cet échantillon, le NA présent ne permet pas de faire la moyenne de celui-ci.