



Facteurs inflammatoires et contrôle de la quiescence/activation des cellules souches tumorales de mélanome

Pauline Ostyn

► To cite this version:

Pauline Ostyn. Facteurs inflammatoires et contrôle de la quiescence/activation des cellules souches tumorales de mélanome. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S013 . tel-01452337

HAL Id: tel-01452337

<https://theses.hal.science/tel-01452337>

Submitted on 1 Feb 2017

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

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

Université Lille Nord de France

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED-446)

Présentée par

Pauline OSTYN

**Facteurs inflammatoires et contrôle de la quiescence/activation des
cellules souches tumorales de mélanome**

Soutenue le 27 septembre 2016 devant la commission d'examen :

Président du jury : Pr Xuefen LE BOURHIS

Rapporteur : Pr Olivier HERAULT

Rapporteur : Dr Elisabeth DUPIN

Directeur de thèse : Pr Pierre FORMSTECHE

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier toutes les personnes qui ont contribué à cette thèse.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Professeur Pierre Formstecher pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour m'avoir encadrée, conseillée et m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse. Merci du temps que vous m'avez consacré.

Un grand merci au Docteur Renata Polakowska pour tout ce qu'elle m'a enseigné durant toutes ces années. Merci d'avoir eu confiance en moi. Vous m'avez toujours soutenue et sans vous je ne serai pas là aujourd'hui. Merci de votre gentillesse, de vos précieux conseils et de votre disponibilité.

Pour l'honneur qu'ils me font en faisant partie de ce jury, je remercie profondément le Professeur Xuefen Le Bourhis qui a accepté de le présider, le Docteur Elisabeth Dupin et le Professeur Olivier Herault qui ont bien voulu juger ce travail.

Je remercie le CHRU de Lille et la Région Nord-Pas de Calais pour m'avoir accordé une allocation pour les trois années de thèse.

Un grand merci au Docteur Yasmine Touil qui m'a encadrée et consacrée énormément de temps depuis mon arrivée. Merci pour tes nombreux conseils, ton aide, ta disponibilité, ta gentillesse et ton sourire si réconfortant dans les moments difficiles.

Un grand merci au Docteur Raja El Machhour pour tous tes conseils. Merci de m'avoir fait partager ton expérience. Tu as toujours été disponible pour moi, pour m'apporter ton soutien et pour m'encourager. Merci pour ton sourire toujours présent même quand les manips ne fonctionnaient pas.

Merci au Docteur Pilar Flamenco et au Docteur Jérôme Vandomme pour tous vos conseils, votre aide et votre bonne humeur. Et merci pour tous les bonbons !

Un grand merci à mes voisines de bureau Bernadette et Pascaline. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée, pour votre bonne humeur et votre sourire. Merci pour votre soutien dans les moments difficiles et votre écoute. Merci de m'avoir transmis votre expérience et pour tous vos conseils. Vous allez pouvoir remettre RFM dans la salle de culture et déplacer le rouleau de scotch !

Un grand merci au Docteur Audrey Vincent pour le temps quelle m'a consacré, son aide et son expertise dans l'étude des modifications épigénétiques.

Merci à tous les membres du laboratoire, et en particulier à Mélanie et Céline pour toutes ces discussions dans les couloirs qui vont me manquer. Un grand merci à Nathalie Jouy pour toutes ces longues journées passées devant le trieur. Merci de m'avoir initiée à la cytométrie et de m'avoir consacré autant de temps.

Un grand merci à ma famille qui a toujours été là pour moi. Un grand merci à Marielle pour ton aide au cours de mes études. Avec une pensée particulière pour une personne qui n'est plus là aujourd'hui et n'a pas pu partager cette aventure avec moi et qui me manque tous les jours.

Un grand merci à mon grand frère pour son soutien, ses encouragements et ses précieux conseils toutes ces années. Merci de m'avoir fait découvrir le running, cela n'a pas été facile tous les jours mais courir à la citadelle par tous les temps m'a bien aidé. Merci pour toutes ces superbes courses auxquelles nous participons tous les deux, surtout celle à Paris ! Team Glycerin13 !

Un grand merci à mes parents pour leur soutien tout au long de mes études. Vous m'avez toujours soutenue et encouragée durant toutes ces années. Votre soutien moral m'a été d'une grande aide. Grâce à vous je n'ai jamais baissé les bras. Merci de toujours m'avoir écoutée, même sans comprendre ce que je disais, et conseillée dans les bons et les mauvais moments.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES ABREVIATIONS	9
RESUME	13
INTRODUCTION.....	15
A. La peau humaine.....	19
I. Généralités et fonctions	19
II. L'épiderme	20
1. Origine embryonnaire	20
2. Structure et fonctions	21
III. La jonction dermo-épidermique	22
IV. Le derme	23
1. Origine embryonnaire	23
2. Structure et fonctions	23
V. L'hypoderme	23
VI. Les annexes cutanées	23
VII. La peau humaine reconstruite <i>in vitro</i>	24
B. Les mélanocytes, la mélanogenèse et le mélanome	27
I. Les mélanocytes.....	27
II. La mélanogenèse	29
1. La mélanine	29
2. La biosynthèse de la mélanine	30
3. La mélanogenèse	31
4. Contrôle moléculaire de la mélanogenèse	33
III. Le mélanome	37
1. Epidémiologie	37
2. Développement.....	37
3. La mutation BRAF	40
4. Les traitements	43
a. La chirurgie	43
b. La chimiothérapie	43
c. Les thérapies ciblées	44
Inhibition de BRAF mutée : le vemurafenib.....	44
La combinaison d'inhibiteurs de BRAF et de MEK : Dabrafenib et Trametinib	46
d. L'immunothérapie	46

e. Association thérapeutique.....	48
C. Les cellules souches	51
I. Les cellules souches normales	51
1. Propriétés fondamentales	51
Modèle hiérarchique classique : cellules souches et différenciation terminale	51
Plasticité et reprogrammation cellulaire	54
Quiescence et activation des cellules souches.....	55
2. Les cellules souches adultes dans la peau.....	59
II. Les cellules souches cancéreuses.....	60
1. Mise en évidence	60
2. Les cellules souches cancéreuses dans le mélanome	62
III. La niche	63
IV. Caractérisation	65
1. Les marqueurs de surface.....	66
2. Les tests fonctionnels.....	66
Les Label Retaining Cells (LRC)	66
Le traçage génétique.....	66
La clonogénicité (CFU)	67
La formation de sphères (SFU)	67
La side population	67
L'activité Aldéhyde déshydrogenase	67
V. Signification médicale des cellules souches cancéreuses	68
D. La dormance tumorale.....	71
I. Notions générales	71
La dormance angiogénique	73
La dormance immunologique	73
La dormance cellulaire	73
II. Les voies de signalisation régulant la quiescence/activation des cellules souches tumorales.....	76
1. La voie PI3K/AKT.....	76
2. FOXO.....	77
3. La voie p38 MAPK	79
E. Inflammation et cancer	81
I. Notions générales.....	81
II. Les cytokines et le TNF.....	84
OBJECTIFS DE LA THESE.....	91

RESULTATS	95
A. Article n°1: Transient TNF regulates the self-renewing capacity of stem-like label-retaining cells in sphere and skin equivalent models of melanoma.....	97
B. Résultats complémentaires	99
I. Effets du TNF sur la quiescence/activation des cellules souches de mélanome	99
II. Effets du TNF sur la quiescence / activation des cellules souches de mélanom <i>in vivo</i>	101
1. Greffe d'équivalents de peau, traités ou non au TNF, à des souris immunodéficientes BALB/c-nude	101
2. Injection de cellules de mélanome, traitées ou non au TNF, à des souris immunodéficientes CB17 SCID	102
III. Effets d'anticancéreux sur l'induction des cellules souches et de la quiescence	104
1. Effet du PLX4032 sur la formation de mélanosphères	104
2. Effet du PLX4032 sur le pool de cellules H2B-GFP positives	105
3. Effet du PLX4032 sur le statut prolifératif des cellules de mélanome.....	106
4. Effet du PLX4032 sur l'expression d'un marqueur de cellules souches de mélanome	108
5. Effet du PLX4032 : quelles sont les voies de signalisation impliquées ?	109
IV. Effets de l'association de l'inflammation et des anticancéreux sur l'induction des cellules souches et de la quiescence	114
1. Effet de l'association du TNF et du PLX4032 sur le statut prolifératif des cellules de mélanome	114
2. Effet de l'association du TNF et du PLX4032 sur le pool de cellules H2B-GFP positives	115
3. Effet de l'association du TNF et du PLX4032 sur l'expression d'un marqueur de cellules souches de mélanome	117
4. Effet de l'association du TNF et du PLX4032 sur la formation de mélanosphères	118
5. Effet de l'association du TNF et du PLX4032 : quelles sont les voies de signalisation impliquées ?	119
V. Effets d'un environnement pro-inflammatoire sur la quiescence/activation des cellules souches de mélanome	123
1. Production d'un environnement pro-inflammatoire	123
2. Effet d'un environnement pro-inflammatoire sur les cellules de mélanome en culture en deux dimensions	123
3. Effet d'un environnement pro-inflammatoire sur les cellules de mélanome en culture en trois dimensions	124

4. Les cellules H2B-GFP positives : un enrichissement en cellules souches ? Quel est l'effet des surnageants ?	126
5. Effet d'un environnement pro-inflammatoire sur les LRC dans le modèle des équivalents de peau.....	127
6. Effet d'un environnement pro-inflammatoire sur l'expression du CD47.....	129
7. Effet de l'inhibition du CD47	131
DISCUSSION	133
CONCLUSION	145
PERSPECTIVES	146
AUTRES TRAVAUX	149
A. Article n°2: Melanoma dormancy in a mouse model is linked to GILZ/FOXO3A dependant quiescence of disseminated stem-like cells.....	151
B. Article n°3: Nerve Growth Factor and proNGF Simultaneously Promote Symmetric Self-Renewal, Quiescence, and Epithelial to Mesenchymal Transition to Enlarge the Breast Cancer Stem Cell Compartment.....	153
C. Article n°4: Insulin-like Growth Factor 1 Receptor and p38-Mitogen-Activated Protein Kinase Signals Inversely Regulate Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Activity to Control Human Dental Pulp Stem Cell Quiescence, Propagation, and Differentiation	155
DISCUSSION	157
ANNEXES	161
Présentations aux congrès.....	163
MATERIELS ET METHODES	175
A. Traitements appliqués aux cellules.....	177
B. Cytométrie en flux.....	177
1. Phénotypage des cellules	177
2. Etude de la phase G0 du cycle cellulaire.....	177
3. Exclusion de la rhodamine 123	178
4. Exclusion du CFSE	178
C. Etude de l'expression de gènes au niveau protéique - Phospho Array - Western blot	178
D. Production des surnageants.....	179
E. Phagocytose des cellules de mélanome par des macrophages.....	179
F. Greffe d'équivalents de peau à des souris immunodéficientes BALB/c-nude.....	179
G. Injection de cellules de mélanome à des souris immunodéficientes CB17 SCID ...	180
H. Analyses statistiques	180
BIBLIOGRAPHIE.....	181

LISTE DES ABREVIATIONS

- ABC = ATP-Binding Cassette
- ABCB5 = ATP-binding cassette sub-family B member 5
- ACTH = Adrenocorticotrophic hormone
- ADN = Acide Désoxyribonucléique
- ALDH = Aldehyde Dehydrogenase
- AIM-1 = Absent in melanoma 1 protein
- AMP-c = Adenosine monophosphate cyclique
- AMPK = AMP-activated protein kinase
- AP-1 = Activator protein-1
- APRIL = A proliferation-inducing ligand
- ARN = Acide Ribonucléique
- ATM = Ataxia telangiectasia mutated
- ATP = Adenosine triphosphate
- BAFF = B-cell activating factor
- BCL2 = B-cell lymphoma protein 2
- BMP = Bone morphogenetic protein
- BMPR1A = Bone morphogenetic protein receptor, type IA
- BrdU = Bromodeoxyuridine
- CBP = CREB-binding protein
- CD = Cluster of differentiation
- CDK = Cyclin-dependent kinase
- CDKN2A = Cyclin-dependent kinase 2A
- CFU = Colony forming unit
- CKI = Cyclin-dependent kinase inhibitor
- CRE = cAMP response element
- CREB = c-AMP Response Element-binding protein
- CTLA-4 = Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
- DHI = 5,6-dihydroxyindole
- DHICA = 5,6-dihydroxyindole -2-carboxylic acid
- Dil = 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate
- DNMT = ADN méthyltransférases (DNMT)
- EDA-A1 = Ectodysplasin A1
- EDN3 = Endothelin 3

- ERK = Extracellular signal-regulated kinase
- ET-1 = Endothelin 1
- FACS = Fluorescence-activated cell sorting
- FADD = Fas-Associated protein with Death Domain
- FDA = Food and Drug Administration
- FGF = Fibroblast growth factor
- FOX = Forkhead box
- FOXO = Forkhead box protein O
- 5FU = 5-Fluorouracile
- GM-CSF = Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
- GFP = Green Fluorescent Protein
- GILZ = Glucocorticoid-induced leucine zipper
- GTP = Guanosine triphosphate
- H2B = Histone 2B
- HDAC = Histone deacetylase
- HGF = Hepatocyte growth factor
- HIF = Hypoxia Inducible Factor
- HMT = Histones méthyl transférase
- IFN = Interferon
- I κ B α = Inhibitor of kappa B alpha
- IKK = I κ B kinase
- IGF = Insulin Growth Factor
- IL = Interleukine
- IP = Iodure de Propidium
- iPSC = induced Pluripotent Stem cell
- IRS = Inner rout sheath
- JAK = Janus-activated Kinase
- JARID1B = Jumonji/ARID domain-containing protein 1B
- JNK = c-Jun N-terminal kinases
- KID = Domaine kinase inductible
- Klf4 = Krüppel-like factor 4
- L-DOPA = L-3,4-dihydroxyphenylalanine
- LRC = Label Retaning Cell
- MAPK = Mitogen-Activated Protein Kinases
- MART1 = Melanoma antigen recognized by T-cells

- MC1R = Melanocortin 1 Receptor
- MEK = MAPK/ERK Kinase
- MEKK = MAPK/ERK Kinase Kinase
- MGMT = O6-methylguanine DNA methyltransferase
- MITF = Microphthalmia- associated Transcription Factor
- MKK = Mek Kinase Kinase
- α -MSH = α -Melanocyte-stimulating hormone
- NFAT = Nuclear factor of activated T-cells
- NF κ B = Nuclear Factor-kappa B
- NF κ Bi = Nuclear Factor-kappa B inhibitor
- Oct4 = Octamer-binding transcription factor 4
- ORS = Outer root sheath
- PAH = Phenylalanine hydroxylase
- PD-1 = Programmed cell death-1
- PDK1 = Phosphoinositide-dependent kinase 1
- PD-L1 = Programmed cell death ligand-1
- PI3K = Phosphatidylinositol 3-kinases
- PI3Ki = Phosphatidylinositol 3-kinases inhibitor
- PIP = Phosphatidylinositol-4-phosphate
- PIP2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
- PKA = Protein kinase A
- PMEL = Premelanosome protein
- polyHEMA = Poly(2-hydroxyethylmetacrylate)
- POMC = Proopiomelanocortin
- PTEN = Phosphatase and tensin homolog mutated in multiple advanced cancers 1
- p38 MAPK = p38 mitogen-activated protein kinase
- RANKL = Receptor activator of NF κ B ligand
- RASSF1A = RAS association domain family protein 1A
- Rb = Rétinoblastome
- RIP = receptor interacting protein
- RNS = Espèces réactives de l'azote
- ROS = Espèces réactives de l'oxygène
- RTK = Récepteur de tyrosine kinase
- SCF = Stem Cell Factor
- SCID = Severe combined immunodeficiency

- SFU = Sphere Forming Unit
- Shh = Sonic hedgehog
- SPARC = Secreted protein, acidic, cysteine-rich
- STAT = Signal transducer and activator of transcription
- TAK1 = TGF- β -activated kinase 1
- TBX2 = T-Box transcription factor 2
- TGFB = Transforming growth factor B
- TRPM1 = transient receptor potential cation channel M1
- TFEB = Transcription factor EB
- TNF = Tumor Necrosis Factor
- TNFR = Tumor Necrosis Factor Receptor
- TNM = Tumor, Nodes, Metastasis
- TRADD = Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain
- TRAF2/TRAF5 = TNFR-associated factor 2/5
- TRAIL = TNF-related apoptosis-inducing ligand
- TWEAK = TNF-related weak inducer of apoptosis
- TYR = Tyrosinase
- TYRP1 = Tyrosinase-related protein 1
- TYRP2 = Tyrosinase-related protein 2
- UV = Ultraviolet
- VEGF = vascular endothelial growth factor
- VEGI = vascular endothelial cell-growth inhibitor
- ZEB 1 = Zinc finger E-box-binding homeobox

RESUME

Une tumeur est composée de plusieurs sous-populations cellulaires. L'une d'entre elles, celle des cellules souches tumorales, est à l'origine du développement des tumeurs. Une des propriétés majeures de ces cellules est la capacité d'entrer dans un état de quiescence. De ce fait, elles sont résistantes aux thérapies anticancéreuses conventionnelles qui visent les cellules cyclantes et peuvent ainsi persister pendant de nombreuses années. Ce phénomène est appelé dormance tumorale. L'activation de ces cellules souches tumorales quiescentes conduit à la récurrence de la maladie. Le passage de l'état quiescent à l'état activé serait réversible, cependant les mécanismes responsables ne sont pas encore connus. Notre hypothèse est que les facteurs inflammatoires stimulent la transition des cellules de l'état quiescent à l'état activé. Dans ce but, nous avons étudié les effets de la principale cytokine pro-inflammatoire, le TNF, sur le compartiment des cellules souches de mélanome et leur activation. Pour cela, nous avons utilisé un système d'expression, inducible par la tétracycline, qui nous a permis d'identifier et d'étudier les cellules quiescentes H2B-GFP positives et cela dans les modèles *in vitro* des mélanosphères et des équivalents de peaux humaines reconstruites, afin de se rapprocher de l'organisation tumorale *in vivo*. Grâce à des tests fonctionnels, comme la formation de mélanosphères et de colonies, et diverses techniques telles que la cytométrie en flux, la microscopie à fluorescence et l'analyse de l'expression de gènes au niveau protéique, nous avons mis en évidence que les cellules H2B-GFP positives (« label retaining cells ») au sein des mélanosphères montrent un enrichissement en marqueurs de cellules souches du mélanome (ABCB5, VEGFR). De plus, nous avons montré que le TNF agit sur le compartiment des cellules souches. En effet, un traitement au TNF augmente le pourcentage de cellules exprimant des marqueurs de cellules souches de mélanome, inhibe la différenciation des cellules de mélanome (inhibition de l'expression de Melan-A dans les mélanosphères et diminution de la pigmentation des équivalents de peau), active les cellules souches quiescentes et induit des effets qui perdurent après le retrait du TNF. Notre étude a montré que ces effets seraient causés par une activation de la voie PI3K/AKT par le TNF.

Un grand nombre de données suggérant qu'une sous-population de cellules cancéreuses est capable d'entrer en quiescence en réponse à une thérapie anticancéreuse, nous avons également étudié les effets de la première thérapie ciblée du mélanome : le vemurafenib, sur le compartiment des cellules souches. Nos résultats ont montré que le vemurafenib augmente le compartiment des cellules souches de mélanome (augmentation du pourcentage de cellules exprimant un marqueur de cellules souches de mélanome : ABCB5) et induit leur quiescence (augmentation du pourcentage de cellules H2B-GFP+ et en phase

GO du cycle cellulaire). Nous avons également montré que le vemurafenib stimule l'activation de protéines régulant la quiescence des cellules souches.

Nous espérons que nos recherches apporteront de nouvelles connaissances sur les mécanismes qui contrôlent l'activation des cellules souches cancéreuses quiescentes et ainsi offrir de nouvelles perspectives pour le traitement du cancer.

Introduction

Introduction

Mon travail de thèse a porté essentiellement sur les cellules souches tumorales de mélanome, dont j'ai étudié la quiescence et l'activation et la relation avec la dormance tumorale. J'ai accordé un intérêt particulier au rôle du TNF, une cytokine inflammatoire majeure, dans ce contrôle, ainsi qu'aux effets de médicaments anticancéreux utilisés dans le traitement du mélanome. J'ai utilisé diverses approches expérimentales pour ces travaux, dont le recours au modèle de la peau humaine reconstruite *in vitro*.

J'ai également contribué à des travaux sur les cellules souches normales et tumorales dans d'autres modèles que la peau.

Il m'a semblé que pour permettre au lecteur de mieux comprendre mes travaux un chapitre d'introduction s'imposait et devait comporter :

- un rappel de notions essentielles sur l'organisation structurelle et fonctionnelle de la peau
- une description des mélanocytes, de la mélanogenèse et du mélanome
- une partie consacrée aux cellules souches normales et cancéreuses et aux principales voies de signalisation qui les contrôlent
- une partie sur la dormance tumorale
- des notions essentielles sur les liens entre inflammation et cancer

A - LA PEAU HUMAINE

I – Généralités et fonctions

La peau est un organe complexe qui couvre la totalité du corps. Elle exerce plusieurs fonctions vitales, dont la principale est la protection contre les agressions physiques, chimiques et biologiques. Elle contribue aussi au maintien de la température du corps et à la transmission d'informations sensorielles (température, toucher, douleur). C'est également un organe aux propriétés immunitaires très importantes (Nestle *et al.*, 2009), qui héberge divers types de cellules immunocompétentes (cellules présentatrices d'antigène et lymphocytes T). La peau est organisée en 3 parties: l'épiderme, qui est la couche externe (et ses appendices associés : les follicules pileux et les glandes sudoripares et sébacées), le derme (séparé de l'épiderme par la jonction dermo-épidermique) et l'hypoderme, qui est la couche la plus profonde (figure 1). Les mélanocytes sont présents au niveau de l'épiderme et des follicules pileux. L'épaisseur de la peau varie selon la localisation, de 50µm à 4mm. On observe également des variations au niveau de la distribution des appendices épidermiques et de la densité des mélanocytes (Kanitakis, 2002). Embryologiquement, l'épiderme et ses appendices sont d'origine ectodermique, tandis que le derme et l'hypoderme sont d'origine mésodermique. Les mélanocytes dérivent des cellules de la crête neurale. Les cellules souches multipotentes adultes présentes dans le « bulge » des follicules pileux jouent un rôle essentiel dans le renouvellement de l'épiderme suite à une blessure et de ses appendices. En conditions normales, les cellules souches unipotentes de la couche basale de l'épiderme sont responsables du renouvellement physiologique de l'épiderme (Ito *et al.*, 2005).

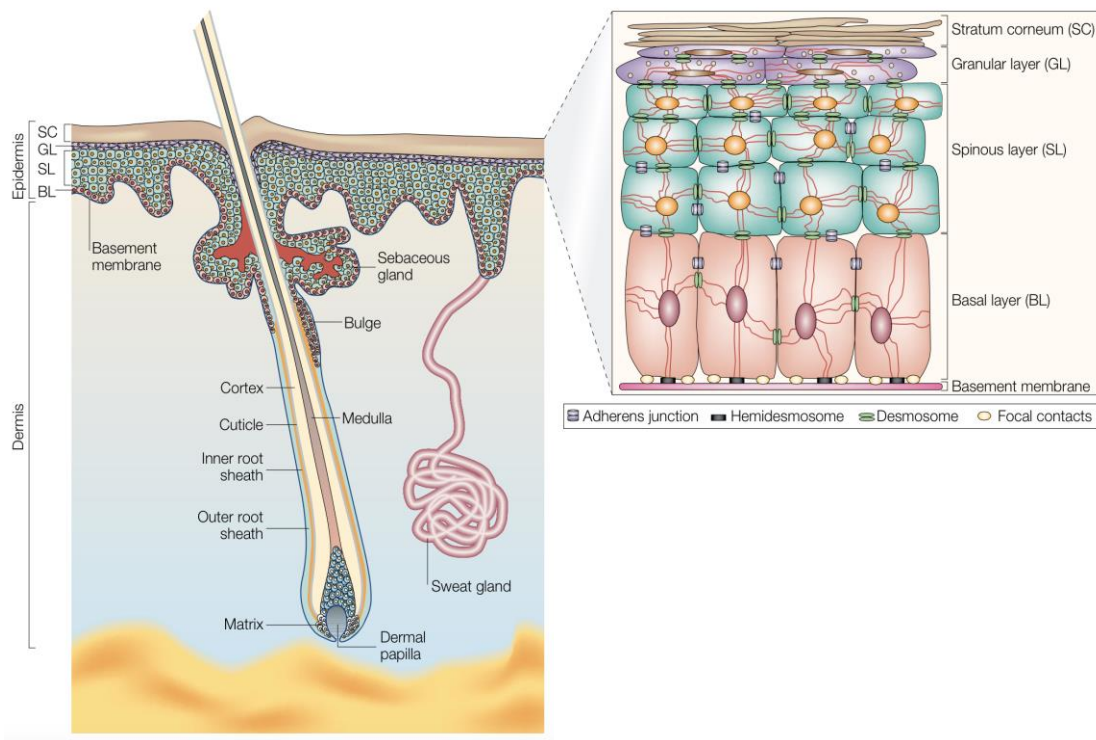


Figure 1 : La peau et ses appendices (Fuchs & Raghavan, 2002).

La peau est composée de l'épiderme (lui-même subdivisé en 4 couches : basale, épineuse, granuleuse et cornée), le derme et l'hypoderme. On y trouve également des appendices tels que les follicules pileux et les glandes sudoripares et sébacées.

II - L'épiderme

1 – Origine embryonnaire

Au cours de la quatrième semaine du développement embryonnaire, l'embryon est totalement recouvert par une assise cellulaire, l'ectoderme, qui prolifère afin de donner naissance à une nouvelle couche externe, le périoderme. La couche sous-jacente devenant ainsi la couche basale de l'épiderme, qui à la onzième semaine de développement prolifère afin de former une couche intermédiaire, remplacée au cinquième mois par les trois couches externes de l'épiderme mature en même temps que l'élimination du périoderme (Fuchs, 2007).

2 – Structure et fonctions

L'épiderme a pour rôle de prémunir contre les infections, d'éviter la déshydratation et de permettre la ré-épithélialisation après une blessure. Il constitue une barrière contre les microbes et les agressions quotidiennes (Fuchs, 2007).

Il s'agit d'un épithélium malpighien stratifié, dérivé de l'ectoderme, non vascularisé, qui est composé de plusieurs types cellulaires dont la majorité sont des kératinocytes (plus de 80%), les autres cellules étant des mélanocytes, des cellules de Langerhans et des cellules de Merkel. Son épaisseur varie de 0,06 à 1mm selon la localisation. Il est constitué de 4 couches continues (du bas vers le haut) : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (figure 2).

L'épiderme est en constant renouvellement. Pour cela, les kératinocytes basaux, mitotiquement actifs, se détachent de la membrane basale et migrent vers les couches supérieures de l'épiderme tout en se différenciant (Blanpain & Fuchs, 2006 ; Blanpain *et al.*, 2007). Ils deviennent ainsi plus denses au niveau de la couche épineuse, se chargent en granules lipidiques au niveau de la couche granuleuse et finissent par perdre leur noyau et se chargent en kératine au niveau de la couche cornée, qui représente le résultat final de la différenciation des kératinocytes (processus durant environ 28 jours) et est formée de kératinocytes morts complètement différenciés en cornéocytes, constituant la barrière épidermique et qui seront par la suite éliminés par desquamation (Fuchs, 2007 ; Brohem *et al.*, 2011). La croissance et le renouvellement de l'épiderme doivent être soigneusement contrôlés, une prolifération insuffisante provoque un épiderme trop fin et une perte de la protection, et trop de prolifération engendre des maladies dont le psoriasis et des cancers (Fuchs, 2007).

Au plan moléculaire, la progression des kératinocytes vers la différenciation terminale s'accompagne de changements graduels d'expression de divers gènes : expression des kératines 5 et 14 dans les cellules indifférenciées de la couche basale remplacée par celle des kératines 1 et 10 dans les couches granuleuses et épineuses, expression successive de la profilaggrine, de la filaggrine et enfin de l'involucrine dans la couche cornée (figure 2). Au sein de la couche basale se trouvent des cellules souches épidermiques qui produisent une descendance de cellules d'amplification transitoire qui prolifèrent puis s'engagent dans la différenciation selon un modèle généralement considéré comme hiérarchique. La voie de signalisation Notch joue un rôle majeur dans la transition des cellules de la couche basale à la couche épineuse (Hsu *et al.*, 20014).

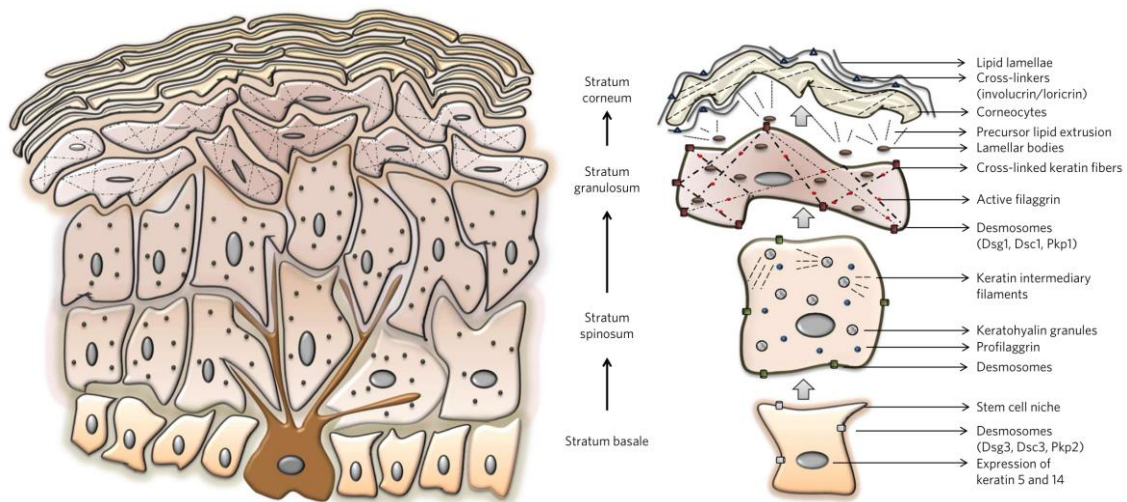


Figure 2: Architecture stratifiée de l'épiderme et étapes de la différenciation des kératinocytes au cours de leur migration de la couche basale à la couche cornée (Natarajan et al., 2014).

En plus des kératinocytes, l'épiderme contient également des mélanocytes, des cellules de Langerhans, des cellules dendritiques épidermiques $Ty\delta$ et des cellules de Merkel. Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques, ce sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles, elles constituent environ 3 à 6% des cellules de l'épiderme. Les cellules de Merkel possèdent des caractéristiques neuroendocrines et épithéliales, elles semblent fonctionner comme des mécanorécepteurs. Elles se situent au niveau de la couche basale de l'épiderme (Kanitakis, 2002).

III - La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique est une membrane basale complexe synthétisée par les kératinocytes basaux et les fibroblastes dermiques qui sépare l'épiderme du derme. Elle possède un rôle fondamental de support mécanique pour l'adhérence de l'épiderme au derme et régule les échanges métaboliques entre les deux compartiments. Elle sert de support pour la migration des kératinocytes lors de la cicatrisation des plaies et est traversée par divers types cellulaires (cellules de Langerhans...) au cours de processus immunologiques et inflammatoires (Kanitakis, 2002).

IV - Le derme

1 – Origine embryonnaire

Il dérive du mésenchyme primitif sous-jacent à l'ectoderme superficiel. Au troisième mois de développement, la jonction dermo-épidermique devient sinueuse et conduit à la formation des papilles dermiques (Kanitakis, 2002).

2 – Structure et fonctions

Le derme est un tissu conjonctif de soutien, vascularisé, d'épaisseur variable, compressible et élastique qui soutient et protège l'épiderme, ses appendices et les plexus nerveux et vasculaires qui le traversent. Il est constitué de plusieurs types cellulaires : des fibroblastes (cellules fondamentales du derme), des cellules dendritiques et des mastocytes (cellules mononuclées ayant pour origine la moelle osseuse), des vaisseaux et terminaisons nerveuses ainsi que d'une matrice extracellulaire composée de collagène et de fibres élastiques (Kanitakis, 2002).

Le derme superficiel (ou papillaire) est composé de fibres de collagène disposées en faisceaux lâches et de fibres élastiques minces perpendiculaires à la jonction dermo-épidermique. Le derme profond (ou réticulé) est composé de faisceaux de collagène parallèles à la surface de la peau et d'épaisses fibres élastiques. La majorité (plus de 90%) des fibres qui constituent le derme sont des fibres de collagène de type 1 et 3, elles sont responsables de la résistance mécanique de la peau (Kanitakis, 2002 ; Forni *et al.*, 2012).

V - L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif lâche constitué d'adipocytes, de vaisseaux sanguins, de nerfs et de fibres de collagène. Il est impliqué dans l'isolation thermique et la protection mécanique. Il est également très souple et permet le glissement de la peau sur les plans profonds (Kanitakis, 2002).

VI - Les annexes cutanées

L'épiderme comprends des annexes, d'origine ectoblastique, qui sont les glandes cutanées (glandes sudoripares eccrines et apocrines et glandes sébacées) et les phanères (poils et ongles). Les glandes sébacées sont pour la plupart annexées aux poils et constituent les follicules pilo-sébacés, dont certains sont également annexés aux glandes sudoripares

apocrines. Les glandes sudoripares eccrines sont, elles, toujours indépendantes des poils. Parmi ces annexes nous ne décrivons que le follicule pileux du fait de son rôle essentiel comme réservoir des cellules souches épidermiques et des cellules souches de mélanocytes (figures 1 et 3).

Les follicules pileux sont totalement formés au cinquième mois du développement. Ils sont constitués à partir d'épaississements de la couche germinative de l'ectoderme qui bourgeonnent afin de donner naissance à des bourgeons pileux, qui s'enfoncent dans le derme sous la forme de cordon cellulaire et dont l'extrémité renflée constitue le « bulge », la réserve de cellules souches épidermiques et mélanocytaires. Les cellules dermiques environnantes, appelées papilles dermiques, s'invaginent ensuite à l'intérieur du bulbe où elles interagissent avec les cellules ectodermiques présentes afin de former la matrice du poil, responsable de la formation de la tige du poil. La prolifération de cette matrice, vers la surface de l'épiderme, transforme les cellules dérivées du cordon en gaines épithéliales interne et externe. Le poil, qui fait saillie à l'extérieur, est ainsi constitué de deux parties : la racine du poil (partie intra-épidermique) et la tige du poil (partie extra-épidermique). Par la suite, la gaine épithéliale externe forme un bourgeon secondaire qui s'enfonce dans le derme afin de former une glande sébacée. De plus, des cellules mésenchymateuses se transforment en myoblastes au niveau du derme sous-jacent et forment ainsi le muscle arrecteur du poil. Le cycle de vie des poils est divisé en trois phases : anagène (phase de croissance où le poil s'allonge), catagène (arrêt de l'activité mitotique de la matrice) et télogène (phase de repos) aboutissant au remplacement du poil télogène qui tombe, par un nouveau follicule anagène (Fuchs, 2007 ; Forni *et al.*, 2012 ; Myung & Ito, 2012). Le renouvellement de l'épiderme et des poils ainsi que leur pigmentation par les mélanocytes sont assurés à partir des différents types de cellules souches épidermiques et mélanocytaires présentes dans le « bulge » du follicule pileux. Les cellules souches du « bulge » migrent vers la couche basale de l'épiderme et vers la racine du poil. Les cellules souches du follicule pileux sont également à l'origine de la formation des glandes sébacées (Tiede *et al.*, 2007 ; Kanitakis, 2002 ; Blanpain & Fuchs, 2014).

VII – La peau humaine reconstruite *in vitro*

La peau, malgré sa complexité, est l'un des premiers organes à avoir été reconstruit *in vitro*. Le modèle de peau humaine reconstruite consiste à faire pousser des kératinocytes sur un support de fibroblastes dermiques. La matrice de collagène, apportée par les fibroblastes, associée à une exposition à l'air, permet d'obtenir une différenciation des kératinocytes et un développement stratifié de l'épiderme mimant parfaitement la structure de la peau normale.

Introduction

L'incorporation de différents types cellulaires, dont les mélanocytes, permet d'obtenir un équivalent de peau plus proche de la physiologie (Auxenfans *et al.*, 2009 ; MacNeil, 2007). Il est également possible d'ajouter divers facteurs diffusibles ou d'utiliser des sous-populations de cellules tumorales éventuellement génétiquement modifiées, dont le rôle dans la biologie de la peau normale ou pathologique peut ainsi être facilement étudié (Kalish *et al.*, 2009). Ce modèle a dans un premier temps été utilisé pour la recherche et la thérapie cellulaire. Aujourd'hui, il est de plus en plus utilisé afin d'étudier des maladies de la peau, dont les cancers et notamment le mélanome (Semlin *et al.*, 2011). L'incorporation de cellules de mélanome dans des équivalents de peau en culture a ainsi été utilisée par quelques équipes afin d'étudier l'invasion tumorale et les interactions des mélanocytes malins avec les kératinocytes (Eves *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2011).

Parmi les populations cellulaires présentes dans la peau, il en est une, minoritaire mais très importante, ayant un rôle de protection de l'ADN, il s'agit des mélanocytes.

B – LES MELANOCYTES, LA MELANOGENESE ET LE MELANOME

I – Les mélanocytes

Les mélanocytes sont la population cellulaire de l'épiderme responsable de la pigmentation de la peau, des cheveux et des yeux. Ce sont des cellules de forme ovale ou fusiforme, au noyau basophile et contenant des mélanosomes (organites cytoplasmiques permettant la synthèse de mélanine, pigment naturel). Leur distribution est régulière entre les kératinocytes basaux (ratio : 1 mélanocyte pour 10 kératinocytes basaux) et leur densité varie de 500 à 2 000 cellules par mm² (Kanitakis, 2002 ; Uong & Zon, 2010 ; Cichorek *et al.*, 2013).

Les mélanocytes dérivent de progéniteurs de la crête neurale, induite pendant la gastrulation, qui donne naissance à de nombreux types cellulaires dont les ostéocytes, les chondrocytes ou encore les neurones sensoriels. Ces cellules de la crête neurale, initialement multipotentes, restreignent leur potentiel de développement en fonction de leur localisation anatomique et de facteurs intrinsèques. Après induction, les progéniteurs de la crête neurale ou cellules souches subissent une transition épithélium-mésenchyme permettant leur migration. Par la suite, les cellules souches multipotentes de la crête neurale se développent en progéniteurs bipotents (cellule gliale ou mélanocyte) puis en précurseurs non pigmentés : les mélanoblastes (Uong & Zon, 2010 ; Dupin & Sommer, 2012 ; Mort *et al.*, 2015). Tous les mélanocytes ne proviennent pas directement des cellules souches de la crête neurale. Certains sont issus de la dédifférenciation de cellules de Schwann en mélanoblastes. En effet, *in vitro*, des cellules de Schwann, isolées d'un embryon, peuvent être reprogrammées en mélanocytes ou en myofibroblastes. De plus, le phénotype des mélanocytes est instable. Privés de leur environnement naturel et en présence de mitogènes spécifiques (EDN3), les mélanocytes sont capables de revenir à leur état ancestral (Dupin, 2011 ; Dupin & Coelho-Aguiar, 2013). Dans les zones dépourvues de follicules pileux, les mélanoblastes migrent au niveau de la couche basale de l'épiderme, achèvent leur différenciation en mélanocytes et produisent de la mélanine (Kanitakis, 2002 ; Uong & Zon, 2010 ; Cichorek *et al.*, 2013). Dans les régions pourvues de follicules pileux, les mélanoblastes peuvent également migrer au niveau de ces follicules où ils sont répartis en deux populations. La première se différencie en mélanocytes et est responsable de la coloration des cheveux. La deuxième, localisée dans la partie inférieure permanente des follicules pileux, n'achève pas le processus de différenciation et constitue un pool de cellules souches de mélanocytes (figure 3). Cette population cellulaire est responsable du maintien du système de pigmentation des follicules pileux (Osawa, 2008). Les mélanocytes sont des

cellules qui prolifèrent très lentement et qui résistent à l'apoptose grâce à une production importante de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Yamaguchi *et al.*, 2007). La densité et la différenciation des mélanocytes sont influencées par l'environnement, notamment les rayons UV et les facteurs sécrétés par les kératinocytes et fibroblastes voisins (figure 3).

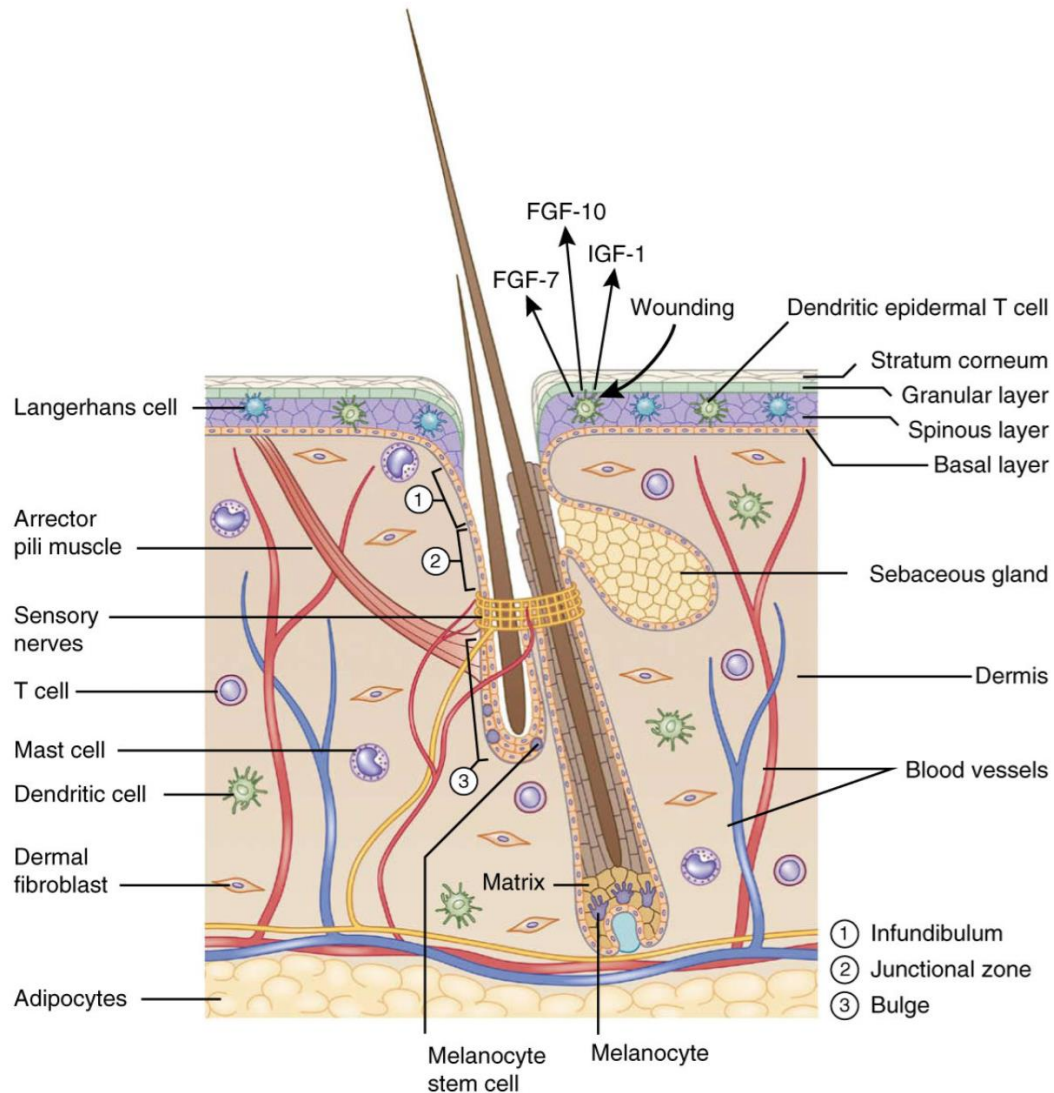


Figure 3 : Localisation des mélanocytes et des cellules souches de mélanocytes dans les follicules pileux (Hsu *et al.*, 2014).

Les mélanocytes sont situés dans la couche basale de l'épiderme ainsi qu'au niveau de la partie la plus inférieure du follicule pileux. Les cellules souches de mélanocytes sont, elles, situées au niveau du « bulge » du follicule pileux (Nishimura, 2011).

II – La mélanogénèse

L'une des principales fonctions des mélanocytes est d'assurer la protection des kératinocytes des rayons UV en produisant de la mélanine grâce à la mélanogénèse (figure 5). Les rayons UV sont absorbés par la mélanine et leur énergie est convertie en chaleur, une forme d'énergie moins toxique, réduisant les dégâts à l'ADN. Ce processus se déroule au sein des mélanosomes et aboutit à la synthèse de phéomélanine (pigment jaune/rouge) et/ou eumélanine (pigment photoprotecteur brun/noir) en fonction des substrats et enzymes présents (Cichorek *et al.*, 2013).

1 – La mélanine

La mélanine est un polymère responsable de la coloration de la peau, des cheveux et des yeux chez l'homme. Il existe deux types de mélanine : l'eumélanine et la phéomélanine (figure 4). Toutes deux dérivent de la tyrosine.

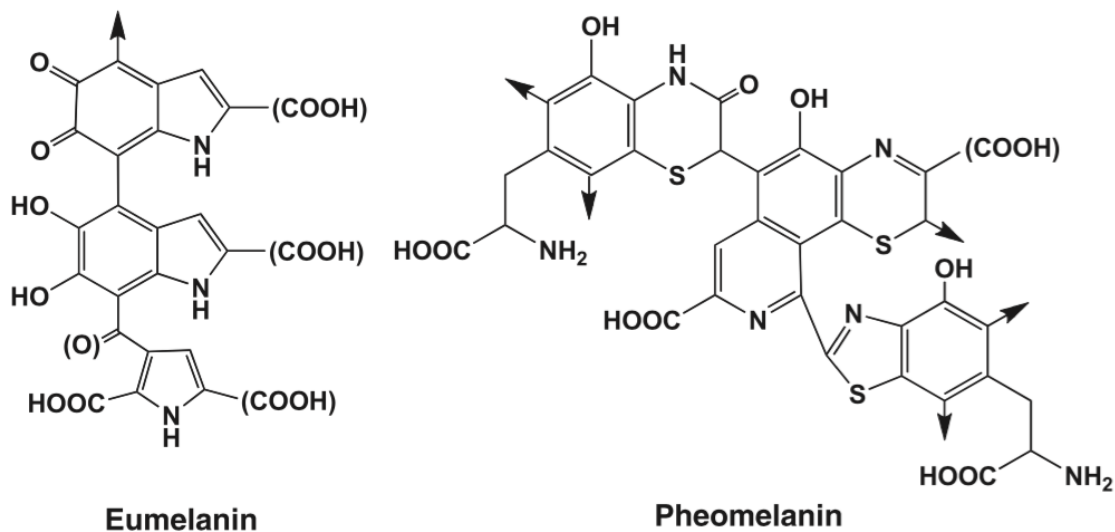


Figure 4 : Structure de l'eumélanine et de la phéomélanine (Ito & Yakamatsu., 2008).

L'eumélanine est un polymère très hétérogène constitué de différents états d'oxydation d'unités 5,6-dihydroxyindole (DHI) et d'acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA) et d'unités pyrroliques issues de leur clivage par peroxydation. La structure de la phéomélanine se compose essentiellement d'unités benzothiazine.

2 – La biosynthèse de la mélanine

La mélanogénèse débute par la conversion de L-phenylalanine en L-tyrosine par la PAH (phenylalanine hydroxylase). La tyrosine présente dans les mélanosomes est ensuite hydroxylée en L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) grâce à l'activité de la tyrosinase, qui permet également l'oxydation de la L-DOPA en Dopaquinone (figure 5). La tyrosinase est une glycoprotéine située au niveau de la membrane des mélanosomes. Elle possède un domaine interne (qui contient la région catalytique représentant 90% de la protéine), transmembranaire et cytoplasmique (d'environ 30 acides aminés). En présence de cystéine, la Dopaquinone réagit avec la cystéine pour former du 2- ou 5-cysteinylDOPA, qui sera ensuite oxydé et polymérisé en phéomélanine soluble. En absence de cystéine, la Dopaquinone subit une cyclisation en Dopachrome, qui soit, perd un groupement acide carboxylique afin de former le DHI (5,6-dihydroxyindole) qui sera par la suite oxydé et polymérisé en eumélanine insoluble, soit est converti en DHICA (DHI-2-carboxylic acid) sous l'action de TYRP2/DCT (Tyrosinase-related protein 2) puis en eumélanine sous l'action de la tyrosinase et de TYRP1 (Tyrosinase-related protein 1). La peau est ainsi constituée d'un mélange de ces différents types de mélanines (Cichorek *et al.*, 2013).

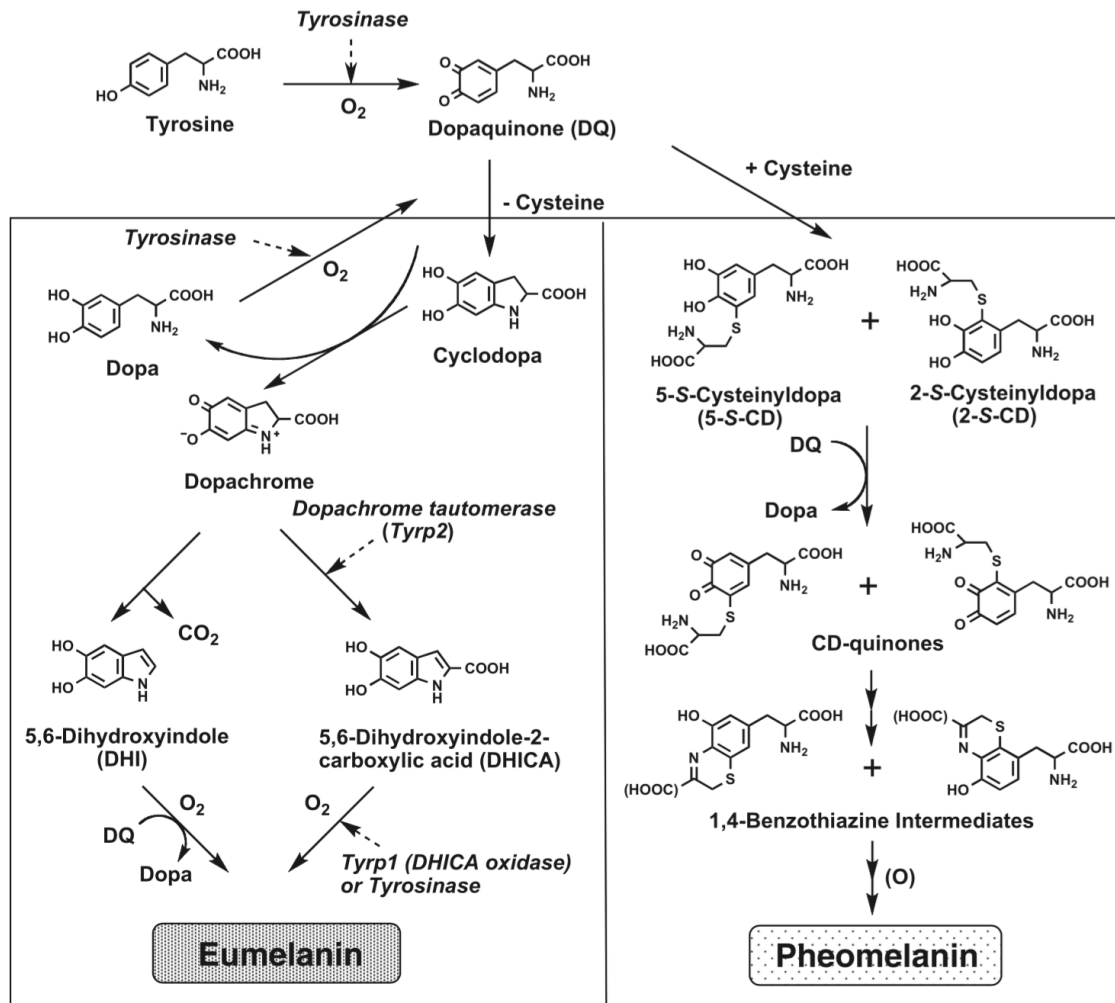


Figure 5 : Les voies de biosynthèse menant à la production d'eumélanine et de phéomélanine (Ito & Yakamatsu., 2008).

Les activités de la tyrosinase, de Tyrp1 et de Tyrp2, sont impliquées dans la production d'eumélanine, tandis que la tyrosinase et la cysteine sont nécessaires à la production de phéomélanine.

3 – La mélanogénèse

La mélanogénèse se déroule au sein d'organites, formés spécifiquement au sein des mélanocytes, les mélanosomes. Ces derniers présentent quatre stades de maturation. Les mélanosomes de stade I (ou pré-mélanosomes) se développent à partir du réticulum endoplasmique. Ils possèdent une matrice amorphe et des vésicules internes qui se forment suite à l'invagination de la membrane. Les eumélanosomes de stade II ont une matrice fibrillaire organisée et structurée et expriment l'enzyme tyrosinase mais ne synthétisent pas de mélanine, contrairement aux phéomélanosomes de stade II, qui eux, en synthétisent déjà. Le dépôt de la mélanine sur la matrice fibrillaire se produit dans les eumélanosomes de

stade III et, au stade IV, ces derniers sont entièrement mélanisés et leur matrice interne est masquée par des dépôts de mélanine (Park *et al.*, 2009).

Le processus de synthèse de mélanine débute par l'activation de p53 (figure 6). Ce dernier induit la transcription du gène *POMC* (proopiomelanocortin), qui sera ensuite clivé en α -MSH (melanocyte stimulating hormone) et ACTH (adrenocorticotrop hormone). Une fois libérée par les kératinocytes, l' α -MSH se lie à son récepteur, MC1R (Melanocortin 1 receptor), situé à la surface des mélanocytes. La liaison de l' α -MSH sur MC1R déclenche une augmentation de l'AMPc dans les mélanocytes, qui provoque l'activation de la protéine kinase A (PKA), qui induit la phosphorylation de CREB (cAMP response element), un facteur de transcription. CREB induit l'expression de MITF (microphthalmia-associated factor) qui provoque la synthèse de mélanine à partir de tyrosine dans les mélanosomes (Garibyan & Fisher, 2010 ; Videira *et al.*, 2013). Ces derniers se dirigent ensuite vers les dendrites des mélanocytes, grâce à l'action de protéines microtubulaires (kinésine et dynéine) et se lient aux filaments d'actine. Dans l'épiderme, chaque mélanocyte interagit, via ses dendrites, avec 30 à 40 kératinocytes, permettant le transfert des mélanosomes matures vers le cytoplasme des kératinocytes. Ce transfert peut s'effectuer de différentes manières : exocytose, cytophagocytose, fusion de membranes plasmiques ou transport par vésicules membranaires (Videira *et al.*, 2013). L'exocytose implique la fusion de la membrane des mélanosomes avec la membrane plasmique des mélanocytes suivie de la libération des mélanosomes dans l'espace intercellulaire et de leur phagocytose par les kératinocytes voisins. La cytophagocytose est la phagocytose des extrémités des dendrites des mélanocytes, qui, dans les kératinocytes, fusionnent avec les lysosomes et sont transportés au niveau supranucléaire où les membranes des phagolysosomes se rompent et libèrent les mélanosomes. La fusion des membranes plasmiques des kératinocytes et des mélanocytes crée un espace à travers lequel les mélanosomes sont transférés des mélanocytes vers les kératinocytes. Enfin, le transport par vésicules membranaires implique l'excrétion de vésicules contenant des mélanosomes des mélanocytes suivie par leur phagocytose par les kératinocytes ou leur fusion avec la membrane plasmique des kératinocytes (Park *et al.*, 2009). Une fois au niveau du noyau des kératinocytes, la mélanine protège leur ADN des futures expositions aux rayons UV (Garibyan & Fisher, 2010).

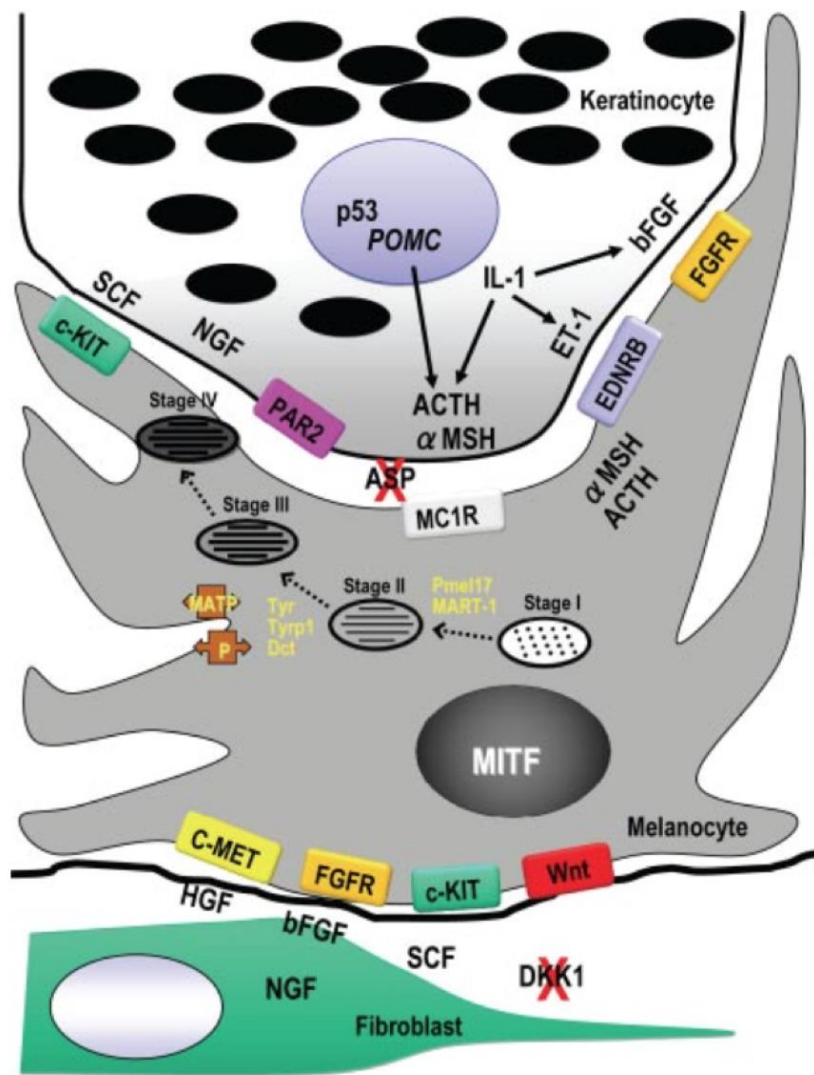


Figure 6 : Récepteurs, ligands et autres facteurs régulant la pigmentation de la peau humaine (Yamaguchi *et al.*, 2007).

Le comportement des mélanocytes est influencé de manière positive ou négative par les kératinocytes épidermiques et les fibroblastes dermiques voisins.

4 – Contrôle moléculaire de la mélanogenèse

Des mécanismes extrinsèques régulent la pigmentation de la peau, et notamment les rayons UV (figure 7). Il existe deux types de pigmentation induite par les UV : les pigmentations immédiate et retardée. La pigmentation immédiate est causée par les UVA, elle apparaît quelques minutes après l'exposition et disparaît quelques minutes à quelques jours plus tard et n'est pas dépendante de l'augmentation de la synthèse de mélanine mais à l'oxydation de la mélanine pré-existante et la redistribution des mélanosomes dans les couches

supérieures de l'épiderme. La pigmentation retardée se produit trois à quatre jours après l'exposition aux UV (principalement les UVB) et disparaît en quelques semaines. Elle résulte de l'augmentation du niveau de mélanine épidermique, surtout l'eumélanine. L'exposition aux UV augmente également la prolifération et/ou le recrutement des mélanocytes, le nombre de dendrites des mélanocytes, le transfert des mélanosomes aux kératinocytes et les niveaux de TNF et d'IL-1, des cytokines qui inhibent la mélanogenèse (Park *et al.*, 2009 ; Videira *et al.*, 2013 ; Sulaimon & Kitchell, 2003).

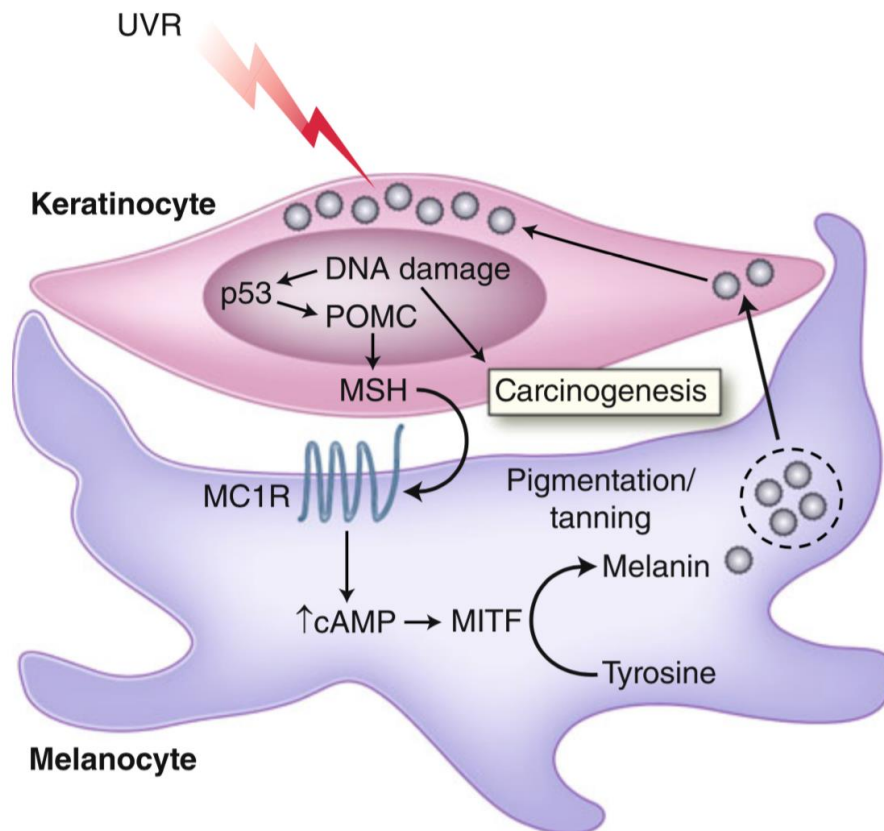


Figure 7 : Dialogue entre kératinocytes et mélanocytes (Garibyan & Fisher, 2010).

Les rayons UV provoquent le bronzage de la peau et peuvent induire, en cas d'exposition excessive, une carcinogenèse.

La pigmentation de la peau est régulée par différents mécanismes intrinsèques. La voie principale qui contrôle la mélanogenèse est la voie faisant intervenir POMC et l' α -MSH. Cependant, une autre voie peut également être impliquée et fait intervenir KIT et SCF. KIT est un récepteur à activité tyrosine kinase de type III qui lie le SCF (Stem Cell Factor) produit par les kératinocytes (Khaled *et al.*, 2003). Les différentes voies de la mélanogenèse convergent toutes vers MITF (Microphthalmia-associated transcription factor), un facteur de transcription qui contrôle les enzymes de la pigmentation et joue un rôle dans le contrôle du

cycle cellulaire et l'apoptose des kératinocytes (figure 8). MITF fait partie de la famille de facteur de transcription MiT, qui comprend trois autres membres : TFEB (transcription factor EB), TFE3 et TFEC. L'expression de MITF est restreinte à certains tissus cellulaires spécifiques, les autres membres de cette famille ont eux une expression plus ubiquitaire. De plus, MITF est le seul membre fonctionnellement essentiel au développement normal des mélanocytes (Levy *et al.*, 2006). MITF se lie à des éléments consensus conservés au niveau des promoteurs des gènes : les M-box (M-(AGTCATGTGCT)) et E-box (E-(CATGTG)). Il existe neuf isoformes de MITF. L'isoforme MITF-M contrôle la transcription de la tyrosinase, de TYRP1 et DCT dans les mélanocytes (Park *et al.*, 2009). Il régule également d'autres gènes aux fonctions moins définies dont MART1 (melanoma antigen recognized by T-cells) (Levy *et al.*, 2006). L'activité et la stabilité de MITF sont régulées par son état de phosphorylation. Après sa phosphorylation, MITF se lie aux séquences M-box ou E-box afin d'activer la transcription de gènes, cependant sa phosphorylation diminue ensuite sa stabilité et favorise sa dégradation par le protéasome (Park *et al.*, 2009). MITF est, de plus, un oncogène amplifié dans certains mélanomes et régule de manière transcriptionnelle de nombreux gènes qui contrôlent la prolifération et la survie. En effet, TBX2 (T-Box transcription factor 2), qui induit la répression du promoteur de p19^{arf}, est impliqué dans la pigmentation et est une cible de MITF. MITF est également capable de réguler la progression du cycle cellulaire en agissant sur l'expression de CDK2. Le gène anti-apoptotique BCL2, de même que HIF1 α , p21, p16^{INK4a}, l'histone acétyltransférase CBP/p300 et c-MET sont également des cibles de MITF (Levy *et al.*, 2006).

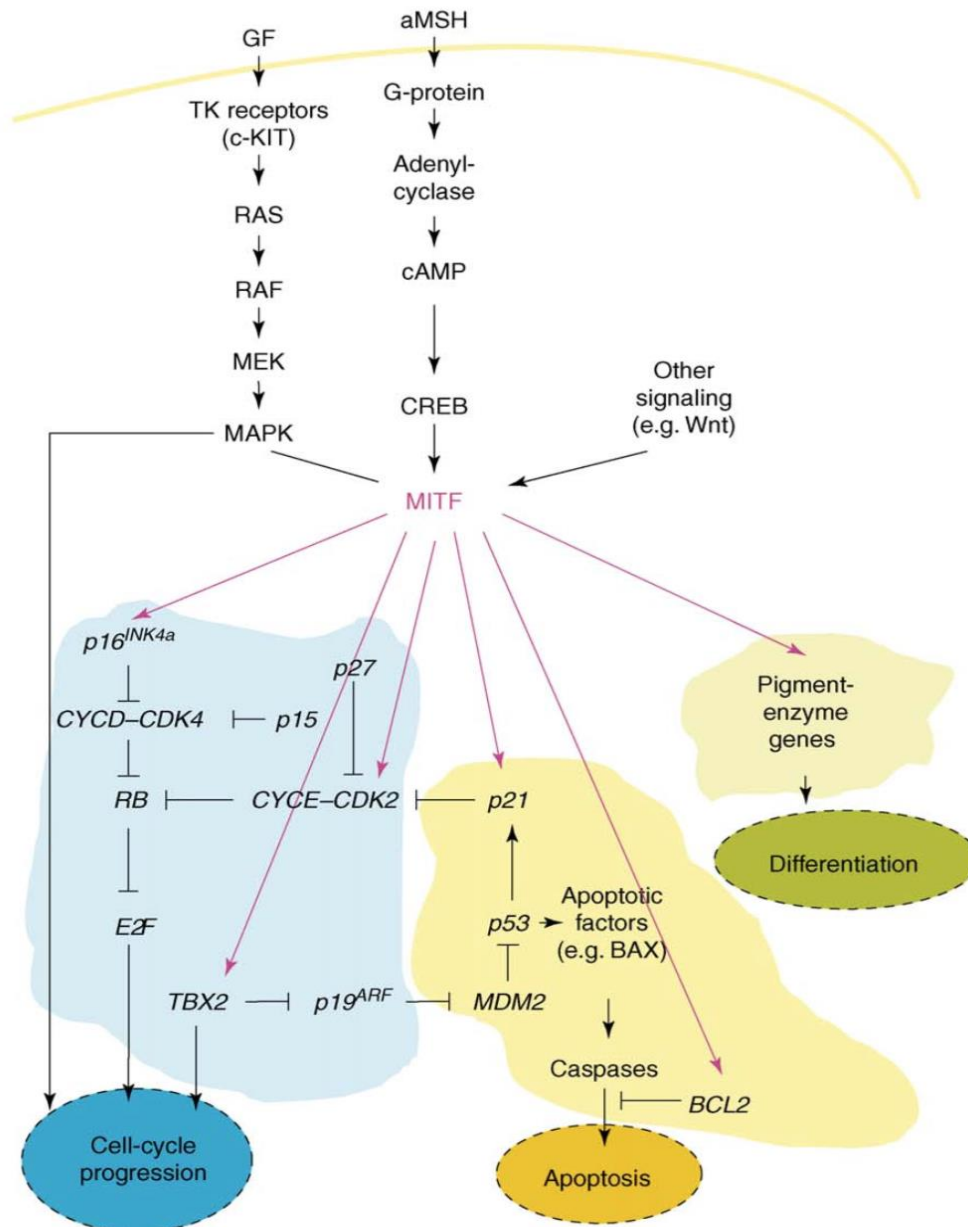


Figure 8 : Les cibles de MITF (Levy et al., 2006).

MITF est impliqué dans l'induction de mélanome, la différenciation des mélanocytes, la progression du cycle cellulaire et la survie. MITF possède de nombreux gènes cibles (flèches roses) dont certains sont impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (p21, p16^{INK4a}), la prolifération cellulaire (TXB2, CDK2), la survie cellulaire (BCL2) ou la différenciation (TYR, TYRP1, DCT, MART1, AIM-1 et PMEL17). D'autres voies de signalisation (flèches noires) sont connectées à MITF dont des facteurs de croissance (GF) qui conduisent à l'activation de récepteurs de tyrosine kinase (TK) suivie d'une cascade de phosphorylation et de l' α -MSH.

Certains facteurs permettent d'inhiber la mélanogenèse. Parmi eux, on distingue les sphingolipides, qui favorisent la dégradation de MITF, ou BMP-4 qui diminue l'expression de la tyrosinase dans les mélanocytes. Les rayons UV provoquent la synthèse, par les kératinocytes, d'IL-1 et d'ET-1 (endothelin-1), qui ont des effets opposés sur la mélanogenèse. En effet, ET-1 stimule la mélanogenèse et la prolifération des mélanocytes, tandis que l'IL-1 a l'effet inverse et inhibe également la prolifération de certaines cellules de mélanome. Une autre cytokine influence également la mélanogenèse. Il s'agit du TNF, présent dans l'épiderme et le derme de la peau humaine saine. Cette cytokine diminue l'activité de la tyrosinase de manière dose dépendante et inhibe la prolifération des mélanocytes (Slominski *et al.*, 2004).

Sous l'effet de mutations, les mélanocytes peuvent subir une transformation maligne conduisant au développement d'un cancer très agressif : le mélanome.

III – LE MELANOME

1 – Epidémiologie

Le mélanome malin est le plus dangereux des cancers de la peau. Il est très métastatique et résistant aux thérapies conventionnelles (Shain & Bastian, 2016). Il ne représente que 3% des cancers de la peau mais est responsable de plus de 75% des décès dus à un cancer de la peau. En France, le mélanome se situe au 11^{ème} rang des cancers les plus fréquents, avec environ 11 000 nouveaux cas diagnostiqués et environ 1 700 décès recensés en 2012 (INCa). L'incidence du mélanome, qui augmente avec l'âge, est la plus élevée en Australie et Nouvelle Zélande. Le mélanome primaire est curable dans 95% des cas, s'il est diagnostiqué tôt (avant l'invasion dans le derme) et après exérèse chirurgicale, une atteinte des ganglions lymphatiques diminue ce pourcentage de 50%. En présence de métastases, le pronostic est très mauvais avec une médiane de survie de 6 à 9 mois (Foletto & Haas, 2014 ; Schatton *et al.*, 2008 ; Shenenberger, 2012 ; Giblin & Thomas, 2007 ; Tronnier *et al.*, 2013). Une amélioration récente a fait jour grâce à l'introduction des thérapies ciblées et de l'immunothérapie.

2 – Développement

Le mélanome résulte de la transformation maligne de mélanocyte ou de son précurseur indifférencié (cellule souche de mélanocyte), qui est attribuée, dans plus de 80% des cas, à des expositions intermittentes aux rayons UV et coups de soleil, particulièrement pendant

l'enfance, et dans 8 à 12% des cas, à une prédisposition génétique (antécédents de mélanome dans la famille). Les UVA et UVB sont capables de favoriser le développement et la progression du mélanome, mais seuls les UVB agissent directement sur l'ADN. Les UVA, qui pénètrent plus efficacement dans la peau, agissent de façon indirecte en induisant la production d'espèces réactives de l'oxygène qui causent des dommages à l'ADN, provoquant ainsi des mutations (Hoerter *et al.*, 2012).

La classification des mélanomes (déterminée par la classification TNM) s'effectue selon différents critères : l'épaisseur de la tumeur (en mm), le degré d'envahissement ganglionnaire, la présence d'ulcération, la profondeur de pénétration ainsi que la localisation des métastases (Shenenberger, 2012 ; Schatton *et al.*, 2008).

Histologiquement, il existe 5 stades de progression du mélanome : nevi bénin sans modifications dysplasiques, nevi dysplasique, phase de croissance horizontale, phase de croissance verticale, formation de métastases. (Schatton *et al.*, 2008 ; Shain & Bastian, 2016). Le mélanome se développe initialement dans l'épiderme puis envahit le derme (Grichnik, 2008).

Le pronostic de survie globale à 5 ans est évalué selon l'indice de Breslow, qui correspond à l'épaisseur de la tumeur initiale (en mm), ainsi que de l'indice de Clark, qui indique le niveau d'invasion en profondeur (Schatton *et al.*, 2008).

L'évaluation des lésions cutanées se fait par dermatoscopie, en cas de lésion suspecte, une biopsie est réalisée. Afin de permettre un diagnostic précoce, une règle dite de « l'ABCDE » (Shenenberger, 2012) a été conçue en 1985 puis modifiée en 2004 afin de reconnaître les signes suspects, c'est à dire une asymétrie (A), des bords irréguliers (B), un changement de couleur (C), une augmentation du diamètre (D) et une évolution (E).

Il existe différents types de mélanome (figure 9). Le mélanome d'extension superficielle est le plus fréquent, il représente 70 à 80% des cas de mélanome. Il est causé par des coups de soleil importants ou des expositions intermittentes aux rayons UV. Il se présente sous la forme de grains de beauté irréguliers ou des taches de couleurs noires ou marron et est caractérisé par une phase de croissance horizontale lente avant de devenir invasif. Il apparaît le plus fréquemment sur le cou et la partie supérieure du tronc chez l'homme et la partie inférieure des jambes chez la femme (Bataille, 2013). Le mélanome nodulaire est la forme qui évolue le plus rapidement. Il représente 4 à 18% des cas. Il peut atteindre toutes les parties du corps y compris celles non exposées au soleil et touche le plus fréquemment la tête, le cuir chevelu, le cou et le tronc. Le mélanome de Dubreuilh apparaît le plus souvent chez les personnes âgées de 60 à 80 ans. Il représente 5 à 10% des cas et est lié à des

expositions chroniques au soleil. Il est caractérisé par une évolution lente et se présente sous la forme de taches pigmentées allant du marron foncé au noir. Enfin, le mélanome acro-lentigineux se développe sur des zones non exposées au soleil telles que la paume des mains, la plante des pieds ou sous les ongles. Il apparaît sous forme de lésions foncées planes puis sous forme de nodules (Schatton *et al.*, 2008 ; Shenenberger, 2012 ; Giblin & Thomas, 2007 ; Lo & Fisher, 2014).

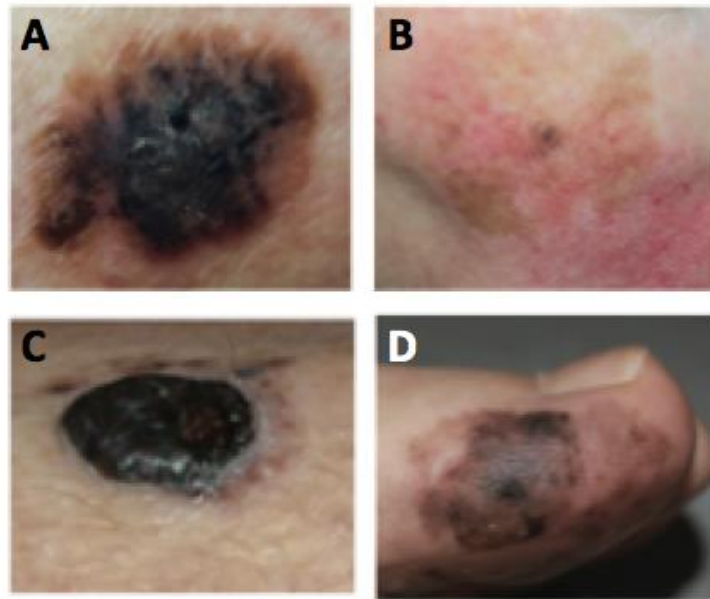


Figure 9 : Les différents types de mélanome (Lo & Fisher 2014).

A : mélanome d'extension superficielle. B : mélanome de Dubreuilh. C : mélanome nodulaire. D : mélanome acro-lentigineux.

La transformation des mélanocytes en cellules de mélanome, leur invasion et le développement de métastases implique un switch phénotypique des cellules, ressemblant à la transition épithélium-mésenchyme. Ce mécanisme jouerait un rôle important dans l'acquisition des propriétés métastatiques dans de nombreuses tumeurs solides en altérant l'intégrité des jonctions cellule-cellule, en induisant une perte de la polarité et de marqueurs épithéliaux, résultant en une perte de contact entre cellules voisines. Grâce à ce processus, les cellules tumorales acquièrent un phénotype mésenchymateux et présentent des propriétés d'invasion et de migration leur permettant d'interagir avec la matrice extracellulaire et d'envahir les tissus voisins. La transition épithélium-mésenchyme s'accompagne de la perte d'expression de marqueurs épithéliaux, tel que l'E-cadhérine, et de l'acquisition de marqueurs mésenchymateux, tels que la N-cadhérine ou l'ostéonectine (SPARC). Plusieurs répresseurs de l'E-cadhérine ont à ce jour été identifiés. Il s'agit de SNAIL, un facteur de transcription, SLUG (SNAI2), ZEB1, ZEB2, E47 (TCF3), TCF4 et Twist. De plus, un des

mécanismes induisant la transition épithélium-mésenchyme dans de nombreux cancers est l'activation de la voie de signalisation MAP/ERK, qui active SNAIL afin d'inhiber l'expression de l'E-cadhérine et le phénotype de type épithélial (Li *et al.*, 2015).

Dans le mélanome, la perte de l'expression de l'E-cadhérine et l'acquisition de l'expression de la N-cadhérine et de SPARC sont associées au développement des métastases. De plus, SPARC active et maintient l'expression de SLUG afin de favoriser l'invasion des cellules de mélanome. Par la suite SLUG active ZEB1 inhibant ainsi l'expression de l'E-cadhérine. Cependant, d'autres mécanismes que ceux caractérisés par la transition épithélium-mésenchyme peuvent également provoquer ce switch de phénotype. En effet, la perte de l'expression de LEF1 et l'acquisition de l'expression de TCF4 sont associées à la progression tumorale impliquant la transition d'un phénotype prolifératif à invasif. Le complexe β -caténine/LEF1 est régulé par la voie de signalisation Wnt et conduit à l'activation de Mitf (Li *et al.*, 2015)..

3 - La mutation BRAF

La voie RAS/RAF/MEK/ERK est l'une des voies de signalisation clé qui intègre des signaux extracellulaires. ERK1 et ERK2 sont deux isoformes de sérine/thréonine kinase activées via la phosphorylation des deux résidus thréonine et tyrosine au sein de leur séquence TEY, située dans leur domaine d'activation, par la kinase MEK. Une fois activé, ERK phosphoryle des substrats cytoplasmiques, membranaires et nucléaires, dont la plupart sont des protéines kinases. RAF peut activer quelques protéines autres que MEK, cependant, le seul substrat de MEK est ERK, et aucune autre protéine qu'ERK ne peut activer ses substrats. Une des principales fonctions d'ERK est d'induire la prolifération cellulaire. En effet, une forte activité d'ERK, de même que sa translocation dans le noyau, sont nécessaires tout au long de la phase G1 du cycle cellulaire afin de permettre l'entrée en phase S. L'étape clé qui permet aux cellules quiescentes d'entrer en cycle est la formation du complexe Cycline D-CDK4/6. De même, l'inhibition des CKI (inhibiteurs de CDK) est également nécessaire. L'activation d'ERK permet d'augmenter l'activité des CDK, d'induire l'expression de la Cycline D1 et d'inhiber les CKI. De plus, une faible activité de RAS conduit à une entrée en cycle des cellules, tandis qu'une très forte activité de RAS provoque un arrêt du cycle cellulaire par induction de l'expression d'un inhibiteur du cycle : p21cip1, dont l'accumulation, par une forte activité d'ERK, inhibe le complexe Cycline E/CDK2 et bloque ainsi l'entrée en phase S (Chambard *et al.*, 2007).

Dans 50% des cas de mélanome, les cellules cancéreuses présentent une mutation au niveau du gène BRAF (figures 10 et 11). Cette mutation, présente dans le domaine kinase,

consiste, dans plus de 80% des cas, en une substitution d'une valine par un acide glutamique au niveau du 600^{ème} codon (BRAF^{V600E}). Le domaine kinase de la protéine mutée est constitutivement actif donnant ainsi un signal de survie et de prolifération aux cellules cancéreuses (Foletto & Haas, 2014 ; Lo & Fisher, 2014 ; Regad, 2013 ; Ilieva *et al.*, 2014, Hu-Lieskovan *et al.*, 2014). En effet, contrairement à la protéine BRAF WT, la protéine BRAF mutée est active même sous forme de monomère et n'a pas besoin de l'induction de la dimérisation par la protéine NRAS-GTP (Spagnolo *et al.*, 2014). Dans 20% des cas il s'agit d'une substitution d'une valine par une lysine : BRAF^{V600K}, et dans 5 à 7% des cas d'une substitution d'une valine par une arginine : BRAF^{V600R} (Fedorenko *et al.*, 2015).

D'autres mutations sont également retrouvées, notamment la mutation du gène NRAS qui touche 15 à 25% des patients atteints de mélanome ou encore une amplification de la protéine AKT3 ou la perte de la protéine PTEN par délétion ou silencing épigénétique (Sullivan & Fisher, 2014 ; Lo & Fisher, 2014). D'autres mutations affectent des gènes suppresseurs de tumeur tels que CDKN2A et CDK4 ou des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Regad, 2013).

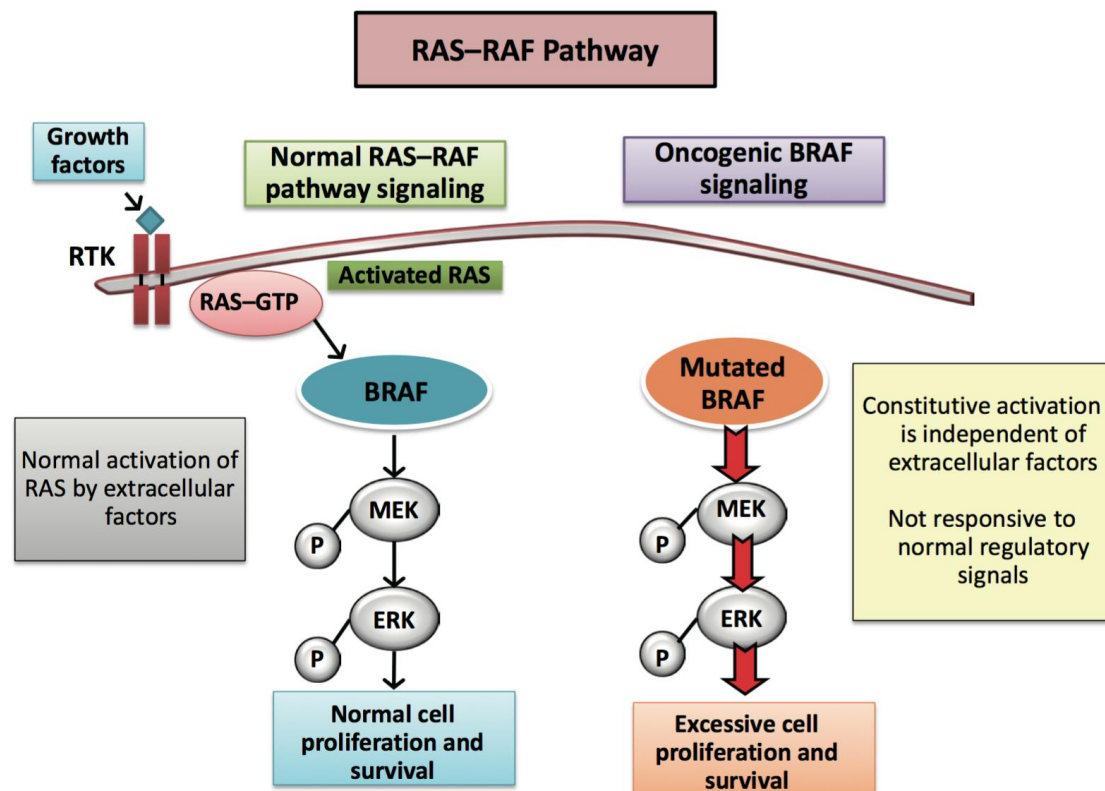


Figure 10 : La voie de signalisation MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Munoz-Couselo *et al.*, 2015).

BRAF est mutée dans 50% des mélanomes. Dans ce cas, cette kinase, physiologiquement activée par RAS, se retrouve constitutivement active et induit une prolifération excessive des cellules.

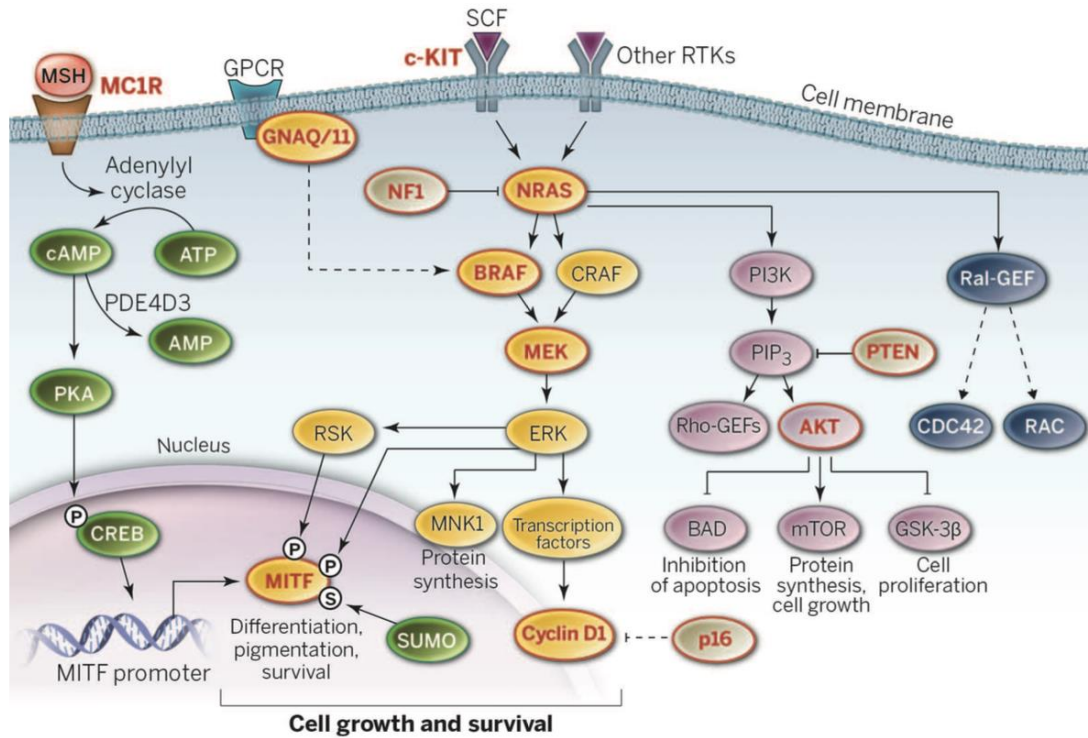


Figure 11 : Les voies de signalisation dans le mélanome (Lo & Fisher, 2014).

La voie de signalisation MAPK favorise la croissance cellulaire et la survie et est constitutivement active dans la plupart des mélanomes. Les membres de la famille RAS sont activés par des récepteurs de tyrosine kinase (RTK) et des signaux via des protéines effectrices dont la kinase RAF ou la PI3K. Les oncogènes BRAF et NRAS sont mutés dans plus de 50% et environ 30% des mélanomes respectivement. La voie de signalisation de c-KIT est essentielle pour le développement des mélanocytes et est associée aux mélanomes causés par des expositions chroniques au soleil. MITF, le principal facteur impliqué dans la régulation des mélanocytes, est exprimé en réponse aux signaux de MC1R, dont la perte d'expression est associée à une augmentation du risque de développer un mélanome. Les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs identifiés dans le mélanome sont inscrits en rouge. Les lignes en pointillés représentent des composants de la voie non cités.

4 - Les traitements

Le traitement est influencé par le stade de la maladie et la présence ou non de métastases (Marzuka *et al.*, 2015). La difficulté étant le traitement du mélanome métastatique, pour lequel le seul traitement a été pendant de nombreuses années la chimiothérapie, très peu efficace sur ce cancer très résistant. Le traitement du mélanome métastatique a été révolutionné par l'introduction récente des thérapies ciblées puis de l'immunothérapie ciblant les points de contrôle immunologiques.

a - La chirurgie

L'excision chirurgicale est le premier traitement d'un mélanome. L'indice de Breslow permet de déterminer la marge de l'excision, qui permet d'assurer la suppression complète de la tumeur primaire et des cellules de mélanome résiduelles et ainsi diminuer le risque de rechute. En cas d'un indice de Breslow de 1 ou plus, une biopsie du ganglion sentinelle est réalisée (Shenenberger, 2012). En présence de métastases, un traitement par chimiothérapie, thérapie ciblée ou immunothérapie est effectué.

b - La chimiothérapie

La première chimiothérapie approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) en 1975 pour le traitement du mélanome métastatique fut la dacarbazine. Il s'agit d'un agent alkylant qui conduit à la dénaturation de l'ADN et à la mort de la cellule. Pendant de nombreuses années, la dacarbazine a été la première ligne de traitement pour les patients atteints de mélanome métastatique et elle est toujours considérée aujourd'hui comme le choix de chimiothérapie par défaut pour la plupart des patients atteints de mélanome. Ce traitement s'accompagne d'effets secondaires importants. Lorsqu'elle est utilisée seule, la dacarbazine a un taux de réponse partielle ne dépassant pas 25%, un taux de réponse complète de 5%, un taux de rémission de moins de 12%, et n'améliore pas la survie. Depuis, d'autres agents cytotoxiques sont apparus. Le témozolamide, un dérivé de la dacarbazine délivré par voie orale, présente un taux de réponse similaire dans le mélanome métastatique mais a l'avantage de passer la barrière hémato-encéphalique et est ainsi devenu la première ligne de traitement pour les métastases cérébrales. Le fotemustine, un autre agent alkylant, présente un taux de réponse globale plus élevé comparé à la dacarbazine en traitement de première ligne du mélanome métastatique, avec une tendance à l'amélioration de la survie globale d'où son approbation comme traitement de première ligne en Europe et en Australie (Foletto & Haas, 2014 ; Tronnier *et al.*, 2013 ; Davey *et al.*, 2016).

c – Les thérapies ciblées

La découverte de la grande hétérogénéité génétique des mélanomes a permis d'améliorer le traitement des patients présentant des mutations « drivers » pouvant être ciblées par des médicaments spécifiques. La plupart d'entre elles impliquent la voie de signalisation ERK qui, dans 90% des mélanomes, est activée par des mutations oncogéniques (Munoz-Couselo *et al.*, 2015). Plusieurs drogues ont à ce jour été approuvées par la FDA pour le traitement des mélanomes métastatiques non résecables. (Holderfield *et al.*, 2014 ; Menzies & Long, 2014).

Inhibition de BRAF mutée : le Vemurafenib

Il s'agit d'un inhibiteur spécifique de la protéine BRAF mutée V600E, approuvé par la FDA en 2011, pour les mélanomes métastatiques (stades 3 et 4) et en cas de rechute du mélanome. Il est indiqué en monothérapie pour des patients adultes présentant un mélanome métastatique après confirmation de la présence de la mutation BRAF^{V600E}. Sous vemurafenib, la survie sans progression est de 5,3 mois (vs 1,6 mois pour la dacarbazine), la survie globale est de 13,2 mois (vs 9,6 pour la dacarbazine), le taux de réponse est de 48% (vs 5% pour la dacarbazine) et conduit à une régression tumorale complète ou partielle chez la plupart des patients. Il s'accompagne d'effets secondaires principalement cutanés : alopecie, éruptions cutanées, kératoses des extrémités, photosensibilité et apparition d'un autre cancer de la peau. Si l'effet thérapeutique du vemurafenib est spectaculaire chez les patients présentant une mutation de BRAF, il est malheureusement transitoire et tous les patients rechutent, du fait de l'apparition d'une résistance (Foletto & Haas, 2014 ; Tronnier *et al.*, 2013 ; Holderfield *et al.*, 2014 ; Ilieva *et al.*, 2014 ; Lo & Fisher, 2014 ; Spagnolo *et al.*, 2014 ; Davey *et al.*, 2016).

Cette résistance peut être intrinsèque, causée par la présence de mutations des cellules de mélanome avant le début du traitement, ou acquise, causée par l'apparition de nouvelles mutations dans les cellules de mélanome exposées au traitement (Munoz-Causelo *et al.*, 2015).

Environ 15% des patients traités à l'aide d'inhibiteurs de BRAF ne présentent pas de régression tumorale complète du fait d'une résistance intrinsèque (Munoz-Causelo *et al.*, 2015). Les mécanismes impliqués sont l'amplification ou la surexpression de cycline D1 ou des altérations du gène suppresseur de tumeur PTEN (Munoz-Causelo *et al.*, 2015).

Introduction

La plupart des patients qui répondent à la thérapie développeront un mécanisme de résistance acquise conduisant à la progression de la maladie (Munoz-Causelo *et al.*, 2015). Cette résistance s'explique dans plus de 70% des cas par une réactivation de la voie des MAPK médiée par divers mécanismes : mutations sur NRAS (Q61K), amplification de BRAF, mutations activatrices de MEK1 (C121S et P124L), mutation de MEK2 (Q60P), surexpression de COT. Plusieurs mécanismes peuvent exister chez un même patient et au sein d'une même tumeur (Menzies & Long., 2014 ; Holderfield *et al.*, 2014 ; Sullivan & Fisher, 2014 ; Fedorenko *et al.*, 2015 ; Ilieva *et al.*, 2014). La résistance peut également être causée par une activation d'autres voies de signalisation comme la voie PI3K/AKT, indépendante de la voie des MAPK, (figure 12) et caractérisée par des mutations d'AKT ou une perte de PTEN (Munoz-Causelo *et al.*, 2015).

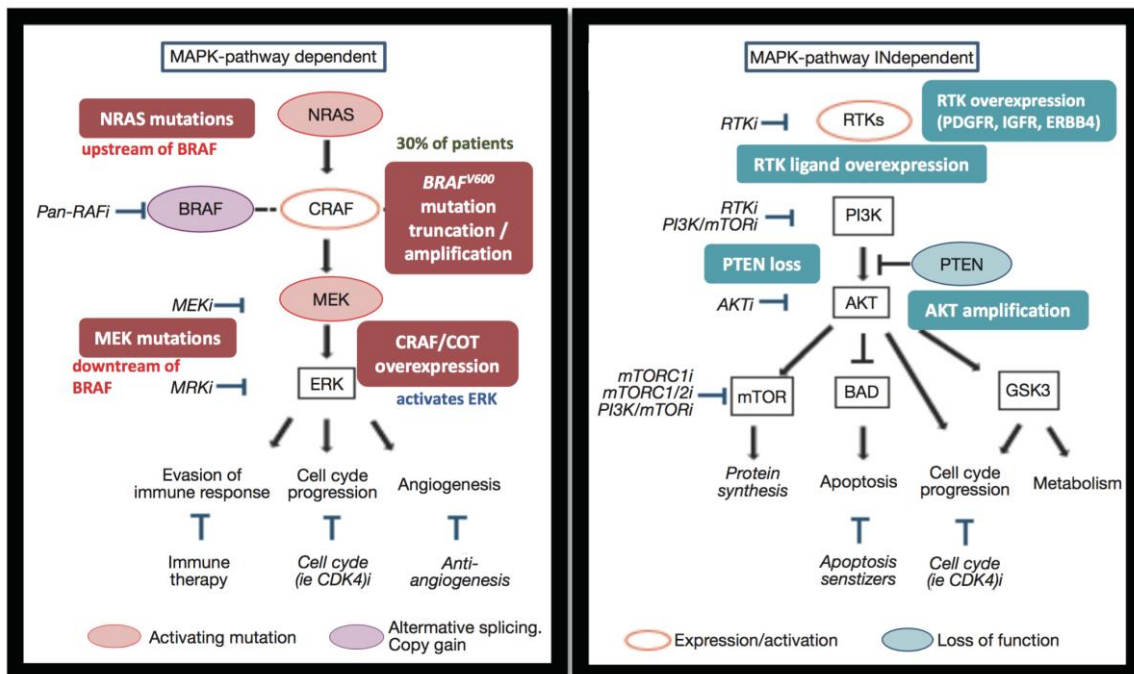


Figure 12 : La résistance acquise aux inhibiteurs de BRAF (Munoz-Couselo *et al.*, 2015).

Suite à un traitement par un inhibiteur de BRAF, de nombreuses mutations, dépendantes ou non de la voie des MAPK, peuvent intervenir et provoquer la résistance des cellules au traitement. La conséquence est une réactivation de la voie des MAPK. De ce fait, d'autres inhibiteurs, de MEK, de la PI3K, d'AKT... ont été élaborés afin d'empêcher l'apparition de cette résistance.

La combinaison d'inhibiteurs de BRAF et de MEK : Dabrafenib + Trametinib

Ces combinaisons permettent de retarder l'apparition du phénomène de résistance et augmentent l'apoptose des cellules tumorales par rapport à l'utilisation d'un inhibiteur de BRAF ou de MEK seul (Menzies & Long., 2014).

Le Dabrafenib est un inhibiteur de BRAF, ayant la même action que le vemurafenib, approuvé par la FDA en 2013. Ce traitement serait mieux toléré que le vemurafenib. La survie sans progression est de 6,9 mois (vs 2,7 mois pour la dacarbazine). Le Trametinib est un inhibiteur de la kinase MEK1/2, relativement bien toléré, approuvé par la FDA en 2013, qui agit en aval de BRAF dans la même voie de signalisation. Il provoque l'apoptose et diminue la prolifération cellulaire. La survie sans progression est de 4,8 mois (vs 1,5 pour la dacarbazine). La combinaison du dabrafenib avec le trametinib, pour des patients atteints d'un mélanome de stade 3 ou 4, provoque 76% de réponse complète (vs 54% pour le dabrafenib seul), une médiane de 9,4 mois de survie sans progression (vs 5,8 pour le dabrafenib seul) et retarde l'apparition du phénomène de résistance. Les effets secondaires observés lorsque le dabrafenib est administré seul diminuent s'il est combiné au trametinib (Foletto & Haas, 2014 ; Tronnier *et al.*, 2013 ; Menzies & Long, 2014 ; Holderfield *et al.*, 2014 ; Lo & Fisher, 2014 ; Ilieva *et al.*, 2014 ; Spagnolo *et al.*, 2014).

Cette amélioration des résultats du traitement par la combinaison de deux thérapies ciblées est très intéressante mais ne conduit toujours pas à un contrôle durable de la maladie.

d – L'immunothérapie

Des observations de régressions spontanées, de vitiligos associés au mélanome, d'une incidence augmentée en cas d'immunosuppression, ont mis en évidence un lien entre le système immunitaire et le mélanome, d'où l'intérêt d'élaborer des traitements permettant d'induire une réponse immunitaire spécifique ou non. Les premiers d'entre eux furent les vaccinations, qui induisent une réponse immune spécifique. Malgré les différentes méthodes utilisées, ces vaccins n'induisent pas de régression tumorale significative et se sont soldés par des échecs. L'amélioration des vaccins pour le mélanome est actuellement à l'étude, car ils pourraient être combinés aux traitements ciblant les points de contrôle immunologique. L'interleukine et l'interféron, qui induisent une réponse immune non spécifique, ont montré quelques cas de réponses tumorales et de survie à long terme. Cependant, leur utilisation est associée à une toxicité très importante.

L'avancée majeure de l'immunothérapie a été le développement d'un anti-CTLA4 (Cytotoxique T Lymphocyte Antigen-4) l'ipilimumab. Le CTLA-4, qui est exprimé à la surface

des lymphocytes T activés, interagit avec B7, à la surface des cellules présentatrices d'antigène, afin d'aboutir à un signal d'inactivation vis-à-vis du lymphocyte T. L'Ipilimumab, un anticorps monoclonal IgG1, bloque le CTLA-4 et lève ainsi le frein inhibiteur physiologique de la réponse immune et restaure l'activation des lymphocytes. L'Ipilimumab a été approuvé par la FDA en mars 2011 pour les mélanomes métastatiques (stade 3 ou 4) et en cas de rechute précédemment traitée à l'aide d'une autre chimiothérapie. Des études ont montré que la survie globale est de 11,4 mois et l'apparition d'un plateau de la courbe de survie à 3 ans de traitement de 22% qui se maintient à dix ans. Le patient vivant trois ans après le traitement par ipilimumab sera probablement vivant à cinq et sept ans. De plus, la durée de la réponse n'est pas associée à un facteur pronostique connu ni au statut mutationnel de BRAF. Ce traitement s'accompagne d'effets secondaires touchant la peau, le tube digestif, le foie et l'axe hypothalamo-hypophysaire. La plupart sont des manifestations cutanées modérées. Des diarrhées de grade 3-4 touchent 5 à 20% des patients et ont été responsables de décès dans le premier essai pivot. Les oncologues ont dû apprendre à maîtriser ces nouveaux effets secondaires parfois gravissimes et mortels. Un autre anticorps monoclonal anti-CTLA-4 a également été développé, il s'agit du Tremelimumab, un anticorps monoclonal IgG2 dont le développement a été interrompu suite aux résultats négatifs en essai de phase III (Routier *et al.*, 2014 ; Foletto & Haas, 2014 ; Menzies & Long, 2014 ; Hui-Lieskovan *et al.*, 2014 ; Marzuka *et al.*, 2015 ; Davey *et al.*, 2016).

Le succès de l'ipilimumab a été suivi par le développement d'une autre immunothérapie, les inhibiteurs du récepteur PD-1 et de son ligand PD-L1. PD-1 est exprimé à la surface de certains lymphocytes, son principal ligand, PD-L1, est exprimé à la surface des cellules tumorales. La liaison de PD-L1 à PD-1 entraîne l'inactivation des lymphocytes T, essentiellement au sein des tissus périphériques, et notamment au niveau des métastases. Les inhibiteurs de PD-1 et de PD-L1 ont pour objectif de réactiver ces lymphocytes afin de restaurer une réponse immune anti-tumorale. Deux anti-PD-1 sont actuellement disponibles, il s'agit du pembrolizumab et du nivolumab. La durée de réponse du Nivolumab a une médiane de 2 ans et la survie à 1 an est de 62%. Le pembrolizumab, approuvé par la FDA en 2014, présente un taux de réponse de 34%, et s'élève à 40% chez les patients non préalablement traités par ipilimumab. La survie sans progression est de 5,5 mois, le taux de survie à un an est estimé à 69% et à 18 mois de 62%. Pour ces deux anticorps, un plateau de survie durable est observé chez les patients qui répondent. Il est plus important qu'avec l'ipilimumab. Des anticorps dirigés contre PD-L1 sont en cours de développement et présentent des effets encourageants (Routier *et al.*, 2014 ; Menzies & Long, 2014 ; Ilieva *et al.*, 2014 ; Spagnolo *et al.*, 2014 ; Davey *et al.*, 2016).

e – Association thérapeutique

La découverte de mutations, telle que $\text{BRAF}^{\text{V600E}}$, a permis le développement de thérapies ciblées induisant une forte réponse chez la majorité des patients mais de courte durée. La combinaison de thérapies ciblées permet d'augmenter la survie globale mais des mécanismes de résistance se mettent en place et ne permettent pas d'éradiquer la maladie. La révolution des traitements par immunothérapie, telle que l'ipilimumab, permet d'induire une réponse durable mais seulement chez une fraction de patients. La combinaison de l'ipilimumab et du nivolumab a montré un taux de survie à un an de 85% et à deux ans de 79%, un taux de réponse tumorale de 41% et une réponse durable. Cependant, les effets secondaires, et notamment ceux de grade 3, sont beaucoup plus élevés (62% des patients) par rapport à leur utilisation en monothérapie. L'avenir des traitements se tourne maintenant vers la combinaison de thérapie ciblée et d'immunothérapie (figure 13). Des essais cliniques testant la combinaison : vemurafenib et ipilimumab sont en cours. Le but étant d'augmenter le plateau observé sur la courbe de survie de Kaplan-Meier (Sharma & Allison, 2015).

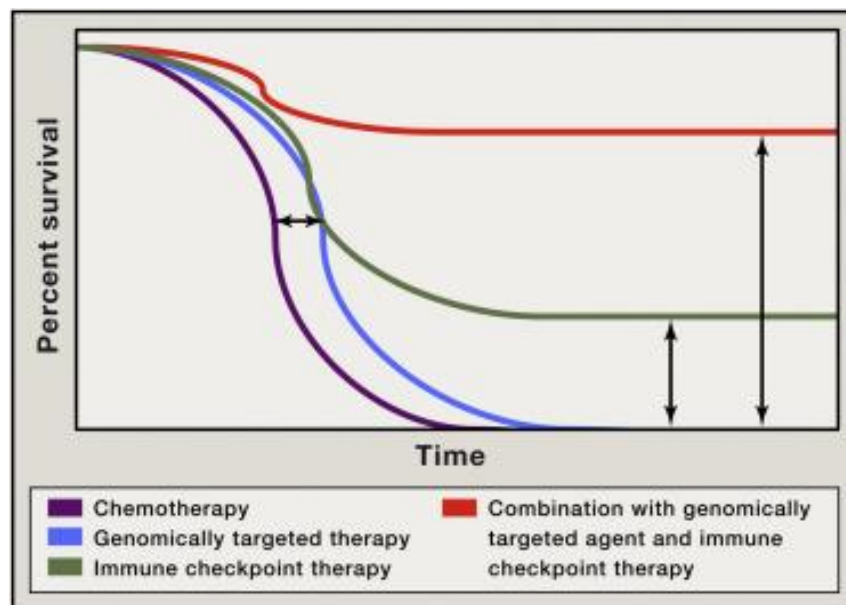


Figure 13 : Amélioration de la survie sans progression grâce aux combinaisons thérapeutiques (Sharma & Allison, 2015).

Représentation de la courbe de survie de Kaplan-Meier avec des thérapies ciblées (ligne bleue) par rapport aux thérapies standard (ligne violette), indiquant une amélioration de la survie globale médiane, mais le manque de réponses durables ; amélioration de la médiane de survie globale et des réponses durables dans une fraction des patients traités avec la thérapie de point de contrôle immunitaire (ligne verte) ; possibilité d'amélioration de la survie globale médiane des réponses durables pour la majorité des patients dans le cadre d'un

traitement combiné avec des thérapies ciblées et les thérapies de point de contrôle immunitaire (ligne rouge).

Certaines cellules de mélanome, responsables du développement de la maladie, ne sont pas éliminées par les traitements anticancéreux. Ces cellules sont des cellules souches tumorales qui possèdent les mêmes propriétés que les cellules souches normales.

C – LES CELLULES SOUCHES

I – Les cellules souches normales

1 – Propriétés fondamentales

Modèle hiérarchique classique : cellules souches et différenciation terminale

Dans le modèle hiérarchique dominant depuis plusieurs décennies, le développement et le renouvellement des tissus différenciés se font à partir des cellules souches, une sous-population de cellules indifférenciées relativement rares, non spécialisées, ayant la capacité de s'autorenouveler et de se différencier en cellules spécialisées (Schatton & Frank, 2008). Cette différenciation est considérée dans la plupart des cas comme terminale et irréversible.

Il existe quatre catégories de cellules souches. Parmi elles, on distingue les cellules souches totipotentes, qui sont issues des premières divisions de l'œuf fécondé et qui sont capables de générer tous les types cellulaires de l'organisme. Les cellules souches pluripotentes ou embryonnaires, qui dérivent de la masse cellulaire interne de l'embryon au stade blastocyste, sont capables de générer les trois feuillets embryonnaires : le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme. Ces cellules ont une capacité d'autorenouvellement illimité et constituent les précurseurs des différentes lignées cellulaires des organes adultes (O'Connor & Crystal, 2006). Les cellules souches multipotentes peuvent, quand à elles, générer plusieurs types cellulaires mais sont spécifiques d'un tissu donné (figure 14). Enfin, les cellules souches unipotentes sont capables de se différencier en un seul type cellulaire (Sell, 2004 ; Lang *et al.*, 2013 ; Schatton & Frank, 2008 ; Li & Clevers., 2010 ; Shahriyari & Komarova, 2013).

Parmi les quatre types de cellules souches existantes, seules les cellules souches totipotentes et pluripotentes sont présentes au stade embryonnaire, les cellules souches multipotentes et unipotentes sont, elles, présentes chez l'adulte (Amabile & Meissner, 2009).

Introduction

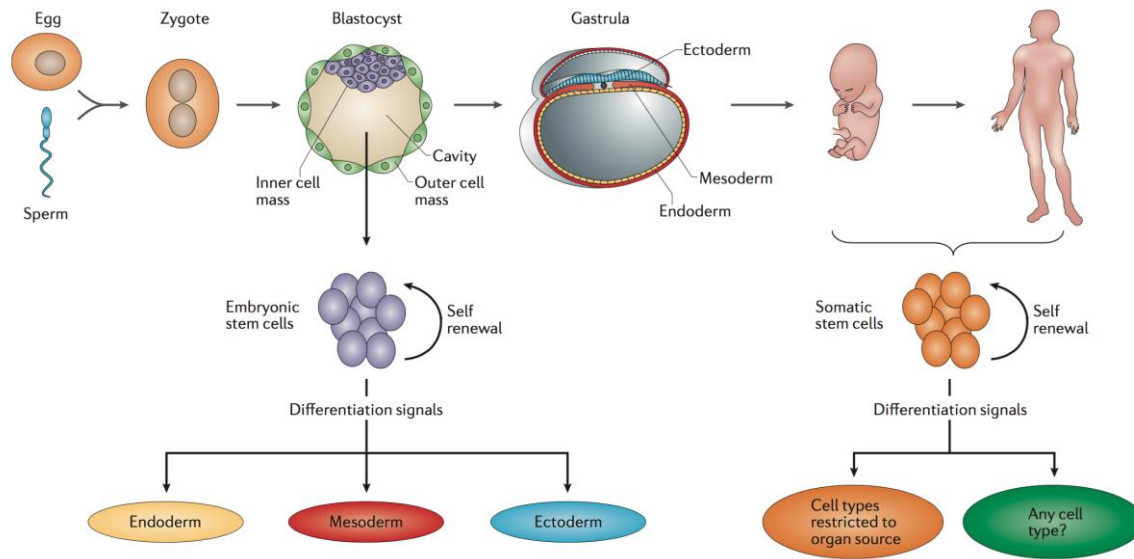


Figure 14 : Les cellules souches embryonnaires et somatiques (O'Connor & Crystal, 2006).

L'embryon est le résultat des divisions du zygote diploïde. Le stade blastocyste est caractérisé par la présence des masses cellulaires externe et interne. Les cellules souches embryonnaires sont issues de la masse cellulaire interne du blastocyste. En culture, elles sont capables de s'autorenouveler sans se différencier et peuvent se différencier en tous les types cellulaires de l'endoderme, du mesoderme et de l'ectoderme, grâce à l'utilisation de signaux appropriés. *In utero*, le blastocyste et les trois feuillets embryonnaires sont formés au cours de la gastrulation. Les cellules souches somatiques sont présentes dans de nombreux tissus fœtaux et postnataux. Elles sont également capables de s'autorenouveler et, en présence des signaux appropriés, de se différencier dans divers types cellulaires de l'organe à partir duquel elles sont dérivées.

Une des principales propriétés des cellules souches est leur capacité d'autorenouvellement (figure 15). Il s'agit d'un processus par lequel une cellule souche se divise de manière symétrique ou asymétrique afin de générer une ou deux cellules souches ayant un potentiel de développement similaire à celui de la cellule mère (He et al., 2009).

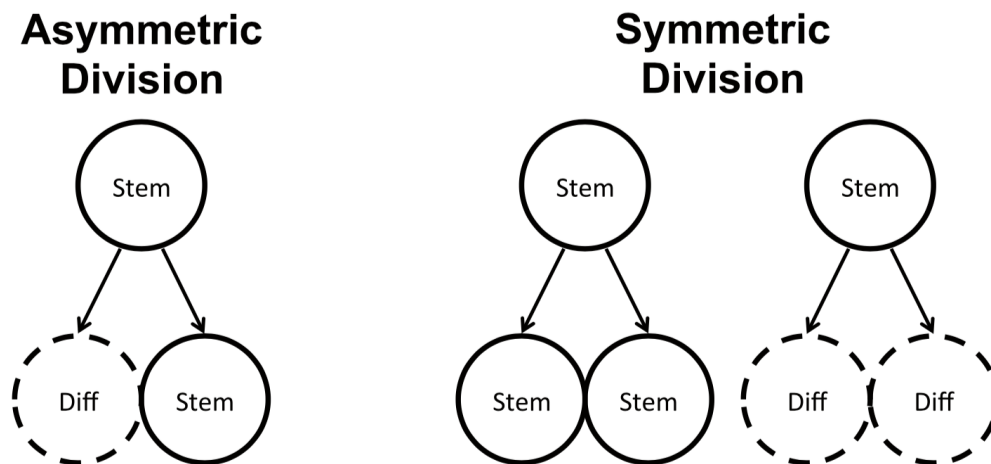


Figure 15 : La division symétrique et asymétrique des cellules souches (Shahriyari & Komarova, 2013).

Dans le cas d'une division asymétrique, une cellule souche produit une cellule souche et une cellule destinée à se différencier. En cas de division symétrique, une cellule souche produit deux cellules souches ou deux cellules destinées à se différencier.

Au cours d'une division asymétrique, la cellule mère polarisée se divise perpendiculairement à son axe de polarité et les composants cellulaires ne sont pas distribués de manière égale entre les deux cellules filles qui sont donc différentes (une cellule souche et une cellule qui va se différencier). Dans le cas d'une division symétrique, la cellule mère se divise parallèlement à son axe de polarité et les deux cellules filles sont ainsi identiques, ce qui conduit à la formation de deux cellules souches ou de deux cellules différenciées (Siller & Doe, 2009 ; Knoblich, 2008).

La capacité d'autorenouvellement est essentielle aux cellules souches afin d'augmenter leur nombre au cours du développement, de maintenir leur nombre dans les tissus adultes et de restaurer leur pool après une blessure (He *et al.*, 2009).

L'autorenouvellement des cellules souches se fait via la machinerie du cycle cellulaire. La voie $p16^{\text{Ink4a}}$ -CDK4/6-Rb-E2F est la principale voie régulatrice de la transition G1-S. En effet, $p16^{\text{Ink4a}}$ est un puissant inhibiteur du cycle cellulaire qui se lie et inactive le complexe Cycline D-CDK4/6 et dont l'expression augmente avec l'âge, diminuant ainsi la capacité d'autorenouvellement. Dans les cellules souches, Bmi1 inhibe $p16^{\text{Ink4a}}$. La perte d'expression de Bmi1 conduit à des défauts de l'autorenouvellement pouvant entraîner des anomalies de développement, un vieillissement avancé ou un cancer (Fuchs & Chen, 2013).

La deuxième propriété fondamentale des cellules souches est de produire des cellules qui vont se différencier.

Les cellules souches ont également des capacités de différenciation, de reprogrammation et présentent une grande plasticité. Au cours du processus de différenciation cellulaire, les cellules deviennent de plus en plus spécialisées, restreignent simultanément leur potentiel de développement et cessent de proliférer. Chez les mammifères, la différenciation est considérée comme unidirectionnelle et le processus de reprogrammation ou transdifférenciation, observé depuis longtemps dans des espèces plus primitives, reste un phénomène rare (Amabile & Meissner, 2009).

Plasticité et reprogrammation cellulaire

Le dogme du caractère irréversible de la différenciation terminale a été complètement remis en cause par la démonstration qu'il était possible de reprogrammer entièrement des cellules différenciées (Jaenisch & Young, 2008 ; Sanchez-Alvarado & Yamanaka, 2014), en utilisant deux grandes approches expérimentales:

- Le transfert de noyaux de cellules épithéliales différenciées dans des ovocytes énucléés a permis de montrer que ces noyaux pouvaient être entièrement reprogrammés et revenir à l'état embryonnaire, puisque les cellules obtenues pouvaient conduire à la formation d'embryons puis d'animaux viables. Cette technique d'abord appliquée en 1962 au modèle des amphibiens par Gurdon, le premier à avoir démontré la possibilité de ce « clonage reproductif », a ensuite été étendue en 1997 aux mammifères avec le clonage d'une brebis, suivi de celui de nombreuses autres espèces. Cette méthode spectaculaire ne se prêtait pas à l'élucidation des mécanismes moléculaires impliqués dans la réacquisition de la totipotence par les cellules différenciées.

- La reprogrammation *in vitro* de cellules différenciées, par transfection de gènes conduisant à la production de cellules pluripotentes induites (iPSC). Les équipes de Takahashi et Yamanaka ont en effet démontré en 2006 qu'il est possible de reprogrammer des fibroblastes murins en cellules souches pluripotentes induites grâce à l'introduction de quatre facteurs de transcription : Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc à l'aide d'un vecteur rétroviral qui permet leur transfection simultanée et efficace. Il en est de même pour les fibroblastes humains grâce aux mêmes facteurs de transcription : Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc ou Oct4, Sox2, Nanog et Lin28. Les cellules souches pluripotentes induites présentent des similitudes avec les cellules souches embryonnaires d'un point de vue morphologique, moléculaire et

fonctionnel, elles possèdent un caryotype normal et expriment des gènes caractéristiques des cellules souches embryonnaires (Okita *et al.*, 2008).

Les nombreux travaux qui ont suivi ont confirmé l'intérêt majeur des iPSC. La possibilité de reprogrammer les cellules en iPSC a suscité un énorme intérêt, par la révolution conceptuelle qu'elle a apportée et par les perspectives qu'elle ouvre, tant sur le plan de la thérapie cellulaire que sur celui de la compréhension des mécanismes du cancer :

- Au plan conceptuel c'est la démonstration de la réversibilité du phénotype des cellules différenciées. Obtenue de manière artificielle par l'expression de gènes transfectés pour produire les iPSC, il semble qu'elle puisse se produire aussi dans certaines circonstances *in vivo* dans des tissus adultes où des cellules différenciées pourraient se dédifférencier en cellules souches. Il a ainsi été montré qu'après destruction des cellules souches adultes de la crypte intestinale ou des voies respiratoires, des cellules souches se formaient à partir des cellules différenciées voisines (Stange *et al.*, 2013 ; Tata *et al.*, 2013).

- L'utilisation des iPSC ouvre des perspectives fascinantes pour la thérapie cellulaire mais il est apparu que certains facteurs de transcription et mécanismes impliqués dans la reprogrammation le seraient aussi dans la tumorigenèse.

Quiescence et activation des cellules souches

Une des propriétés fondamentales des cellules souches adultes est leur quiescence réversible. Ces cellules qui ont un potentiel d'autorenouvellement très élevé se divisent en fait rarement et cette caractéristique est très utilisée pour les détecter *in vitro* et *in vivo*.

L'activation des cellules souches les fait entrer en cycle cellulaire. Le contrôle de cette activation est crucial pour assurer l'homéostasie des cellules souches et la production des cellules différenciées. Le cycle cellulaire actif et la quiescence sont deux états fonctionnels de la cellule très imbriqués.

Les figures 16 et 17 résument les connaissances essentielles sur le cycle cellulaire, sa régulation et ses relations avec la quiescence (Orford et Scadden, 2008 ; Rumman *et al.*, 2015).

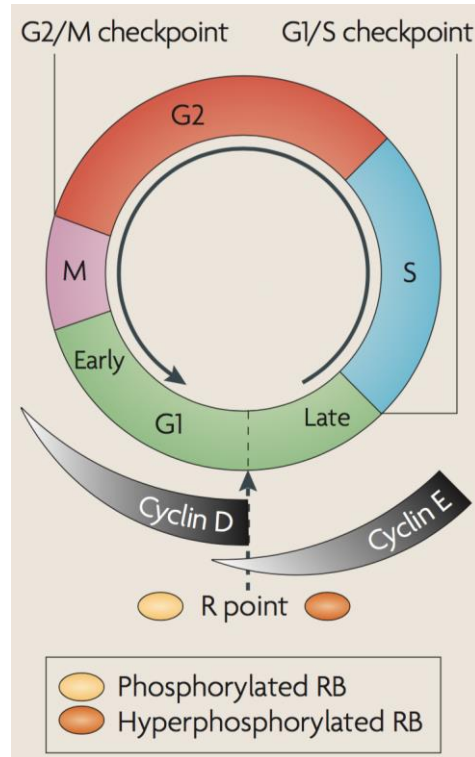


Figure 16 : Le cycle cellulaire (Orford & Scadden, 2008).

Le cycle cellulaire est constitué de quatre phases : G1, S, G2 et M. La progression du cycle cellulaire est très régulée grâce à deux points de contrôle, au niveau des transitions G1/S et G2/M, et au point de restriction qui divise la phase G1 en deux et au delà duquel les cellules s'engagent dans le cycle. Avant ce point de restriction, les cellules peuvent également sortir du cycle et entrer en phase G0, une phase de quiescence. La fin de phase G1 est caractérisée par l'activation du complexe cycline E-CDK2 et l'hyperphosphorylation du gène suppresseur de tumeur rétinoblastome (RB). La transition du début à la fin de phase G1 est régulée par les complexes cycline D/CDK4 et cycline D/CDK6 et l'inactivation de la protéine RB.

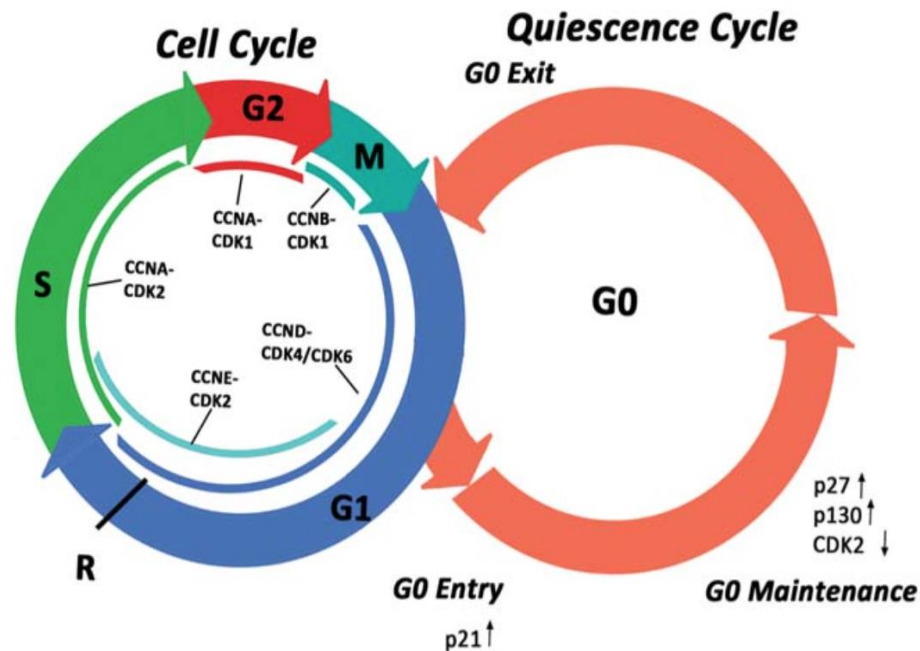


Figure 17 : Le cycle cellulaire et la quiescence (Rumman *et al.*, 2015).

Chaque phase du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M) est régulée par des complexes cycline-CDK (cyclin-dependent kinase). En phase G1, au delà du point de restriction (R), les cellules s'engagent dans le cycle, avant ce point de non retour, elles peuvent sortir du cycle et entrer en quiescence (phase G0). Les mécanismes régulant l'entrée ou la sortie de quiescence sont mal connus. Cependant, p27, p130 et CDK2 peuvent être utilisés comme marqueurs de l'état de quiescence et, selon de récentes études, p21 régulerait l'entrée en G0.

Les éléments essentiels du contrôle du cycle cellulaire sont bien connus. Le cycle cellulaire est contrôlé par l'activation et l'inhibition coordonnées d'une famille hétérodimérique de sérine/thréonine protéine kinase, composée de sous-unité cycline catalytique dépendante de kinase (CDK), et de sous-unité cycline régulatrice. L'activité des CDK repose sur la présence de cyclines spécifiques dont l'expression varie au cours de la progression du cycle cellulaire (Boyer & Cheng, 2008).

Les transitions des phases G1 à S et des phases G2 à M sont très régulées (Cheung & Rando, 2013). En effet, ces deux points de contrôle sont régis par des cyclines dépendantes de kinases (CDK2 pour la transition G1/S et CDK1 pour la transition G2/M). En plus de ces points de contrôle, une combinaison de signaux intrinsèques et extrinsèques régulent le passage du début à la fin de la phase G1, il s'agit du point de restriction (R), découvert en 1974 par Pardee, qui divise la phase G1 en deux, une phase dépendante de mitogènes (début de la phase G1) et une phase indépendante de mitogènes (fin de la phase G1). En

général, les cellules doivent être stimulées par des signaux mitogéniques (par exemple des facteurs de croissance solubles) pour passer la phase G1 et entrer dans le cycle cellulaire. Le point R est le point de non retour pour les cellules après lequel elles s'engagent à entrer dans le cycle cellulaire et où les stimuli mitogéniques ne sont plus nécessaires. En absence de stimulation mitogénique, les cellules peuvent sortir du cycle cellulaire au début de la phase G1 (avant le point de restriction) et entrer en phase G0. La transition début/fin de la phase G1 est régulée par les complexes cycline D/CDK4 et cycline D/CDK6 qui fonctionnent via des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques afin d'inactiver partiellement RB et activer l'expression de la cycline E. Après avoir atteint un niveau seuil d'activité du complexe cycline E/CDK2, la protéine RB est totalement inactivée par hyperphosphorylation et l'activité des complexes cycline D/CDK4 et cycline D/CDK6 n'est plus nécessaire pour que la transition G1/S se produise (Orford & Scadden, 2008). Des signaux antiprolifératifs peuvent bloquer l'activité des CDK en induisant l'expression de deux familles d'inhibiteurs de cyclines dépendantes de kinase (CKI) qui se lient aux CDK ou aux dimers CDK/cycline directement, inhibant ainsi leur activité kinase (Boyer & Cheng, 2008). Il existe deux familles de CKI qui régulent la transition en G1. Les membres de la famille Ink4 sont des inhibiteurs directs des complexes du début de la phase G1 (cycline D/CDK4 et cycline D/CDK6) et les membres de la famille CIP/KIP (p21, p27 et p57) sont des inhibiteurs directs du complexe de fin de phase G1 (cycline E/CDK2). Ces inhibiteurs ralentissent ou préviennent la transition à travers le cycle cellulaire en bloquant l'activité de ces complexes (Orford & Scadden, 2008).

La quiescence cellulaire est connue depuis longtemps, mais son contrôle est encore imparfaitement compris.

La mise en évidence de l'état de quiescence date de 1951 grâce à des travaux d'Howard et Pelc. Ces derniers ont utilisé des techniques de marquage radioactif afin d'étudier le temps de réplication de l'ADN pendant la division cellulaire et ont défini les 4 phases du cycle cellulaire. Le concept de la quiescence vient de l'observation du fait que toutes les cellules dans une population ne prolifèrent pas toutes à la même vitesse. Dans les tissus somatiques, certaines cellules se divisent continuellement tandis que d'autres ne prolifèrent pas au cours de l'homéostasie mais sont capables de répondre à des stimuli externes et peuvent rentrer de nouveau en cycle et proliférer, il s'agit des cellules souches (Cheung & Rando, 2013).

En effet, le profil du cycle cellulaire des cellules souches adultes est caractérisé par une prédominance de cellules en phase G0 et cela pour une longue durée (Boyer & Cheng, 2008). Cependant, la phase de quiescence est réversible (Sang *et al.*, 2008).

La quiescence permet de prévenir l'épuisement du pool de cellules souches et contribue ainsi à protéger ces dernières d'éventuelles mutations qui pourraient causer une transformation maligne (Wilson *et al.*, 2008). Elles s'activent et prolifèrent uniquement afin de compenser une éventuelle perte de cellules (Cheung & Rando, 2013). Dans le système hématopoïétique, il existe plusieurs pools de cellules souches plus ou moins quiescentes, les plus quiescentes étant les cellules qui présentent le plus grand potentiel de reconstitution à long terme et ne sont mobilisées qu'en cas de perte massive des autres compartiments.

Les cellules souches quiescentes sont caractérisées par un niveau d'ARN très bas et n'expriment pas de marqueur de prolifération tel que le Ki67 (Blanpain *et al.*, 2004). Des marqueurs de quiescence sont également utilisés. Il s'agit de marqueurs qui se diluent à chaque division cellulaire. La rétention de marqueur constitue une indication de l'état de quiescence. En effet, les cellules incorporent le marqueur, se divisent et plus elles se divisent plus elles diluent le marqueur. De ce fait, les cellules quiescentes ou se divisant très lentement retiennent le marquage pour une longue période (BrdU, thymidine tritiée, H2B-GFP). De plus, les cellules quiescentes expriment très faiblement les gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire, en revanche, elles surexpriment certains gènes impliqués dans la régulation de la transcription. Une signature moléculaire spécifique de l'état quiescent des cellules souches a été proposée (Cheung & Rando, 2013).

La quiescence des cellules souches est contrôlée par des facteurs intrinsèques (p53, FOXO, ATM, HIF1 α , NFATc1, Fbw7, PTEN, PML et des miRNAs) et extrinsèques venant du microenvironnement de la niche (hypoxie, pH, conditions métaboliques). En effet, l'interaction des cellules souches avec leur niche est cruciale pour le maintien à long terme de la quiescence (Li & Bhatia, 2011). Un concept très intéressant est celui de la quiescence comme état suspendu (« poised » en anglais) sensible à tous ces facteurs qui contrôlent la balance « quiescence-activation » des cellules souches.

2 – Les cellules souches adultes dans la peau

La peau est le siège de plusieurs populations de cellules souches adultes capables de s'autorenouveler et de générer un tissu, elles ne se divisent que très rarement et possèdent des marqueurs spécifiques à leur surface. Il s'agit des cellules souches de la crête neurale pluripotentes, des cellules souches épidermiques multipotentes et des cellules souches de mélanocytes (Schatton & Frank, 2008). Ces cellules souches sont situées dans le « bulge » au niveau de la gaine externe des follicules pileux, sous la glande sébacée. Elles s'autorenouvellent afin de maintenir leur nombre constant et migrent, tout en se différenciant, soit vers le follicule pileux, soit vers la glande sébacée, soit vers l'épiderme, afin de former

des follicules pileux, des glandes sébacées ou l'épiderme respectivement (Lander *et al.*, 2012).

Les cellules souches peuvent subir une transformation maligne et dans ce cas être responsables du développement de cancer.

II – Les cellules souches cancéreuses

1 - Mise en évidence

De nombreuses données ont montré l'existence d'une sous-population cellulaire au sein des tumeurs : celle des cellules souches cancéreuses, qui est à l'origine du développement des cancers. Ces cellules présentent des caractéristiques des cellules souches normales, elles sont capables de s'autorenouveler et de se différencier. Elles résistent aux thérapies conventionnelles et sont responsables des rechutes et de la formation des métastases (Tirino *et al.*, 2013 ; Islam *et al.*, 2015).

Ces cellules ont pour la première fois été mise en évidence dans le modèle leucémique grâce aux travaux de Bonnet et Dick en 1997. En effet, ils ont montré que seule la sous-population de cellules au phénotype CD34+CD38- était capable d'initier une leucémie dans des souris immunodéficientes NOD/SCID et de reproduire l'hétérogénéité cellulaire de la tumeur initiale (Bonnet & Dick, 1997). Dans les cancers solides, elles ont pour la première fois été mise en évidence dans le cancer du sein par le groupe d'Al-Hajj en 2003 (Al-Hajj *et al.*, 2003). Elles ont été identifiées et isolées grâce à l'expression de marqueurs phénotypiques : CD44+CD24-. Elles ont depuis été mises en évidence dans de nombreux autres cancers solides.

Le premier modèle de développement tumoral décrit est le modèle stochastique. Ce dernier stipule que toutes les cellules (différenciées ou non) peuvent conduire à la formation de tumeurs par accumulation de mutations et prolifération incontrôlée. Cependant, la découverte des cellules souches cancéreuses et le fait qu'il est difficile pour les cellules différenciées d'accumuler des mutations, car elles se divisent moins et ont une durée de vie plus courte que les cellules souches, a permis d'établir un autre modèle de développement tumoral : le modèle hiérarchique (figure 18). Selon ce modèle, seule une sous-population cellulaire, celle des cellules souches cancéreuses, est capable d'initier la formation de tumeurs, de proliférer de manière indéfinie et de donner naissance à toutes les cellules de la masse tumorale. Dans la réalité, ces deux modèles coexistent (Tirino *et al.*, 2013 ; Islam *et al.*, 2015 ; Lang *et al.*, 2013).

Les cellules souches cancéreuses ne dérivent pas uniquement de cellules souches normales qui accumulent de nombreuses mutations au cours de leur longue durée de vie (figure 19). Elles peuvent également dériver de cellules progénitrices ayant subi des mutations et qui se différencient et acquièrent des propriétés de cellules souches (Tirino *et al.*, 2013 ; Islam *et al.*, 2015 ; Visvader, 2011).

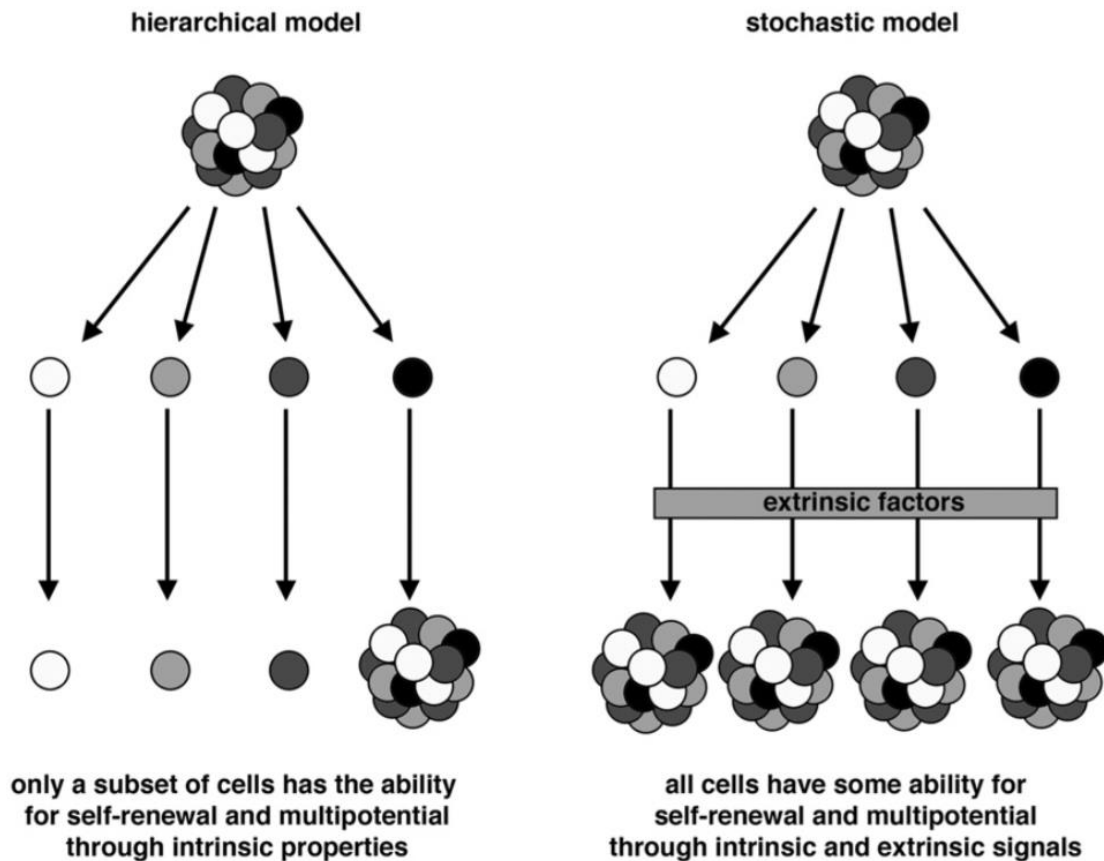


Figure 18 : Cellule d'origine et évolution des cellules souches cancéreuses (Visvader, 2011).

La hiérarchie cellulaire normale comprend des cellules souches qui produisent des progéniteurs communs qui donnent tous les types cellulaires matures constituant un tissu particulier. La cellule d'origine d'une tumeur particulière peut être un progéniteur commun, cependant l'accumulation de mutations épigénétiques par une cellule au sein de la population aberrante au cours de la progression néoplasique peut entraîner l'apparition de cellules souches cancéreuses. Dans ce modèle, seules les cellules souches cancéreuses sont capables d'initier la formation d'une tumeur.

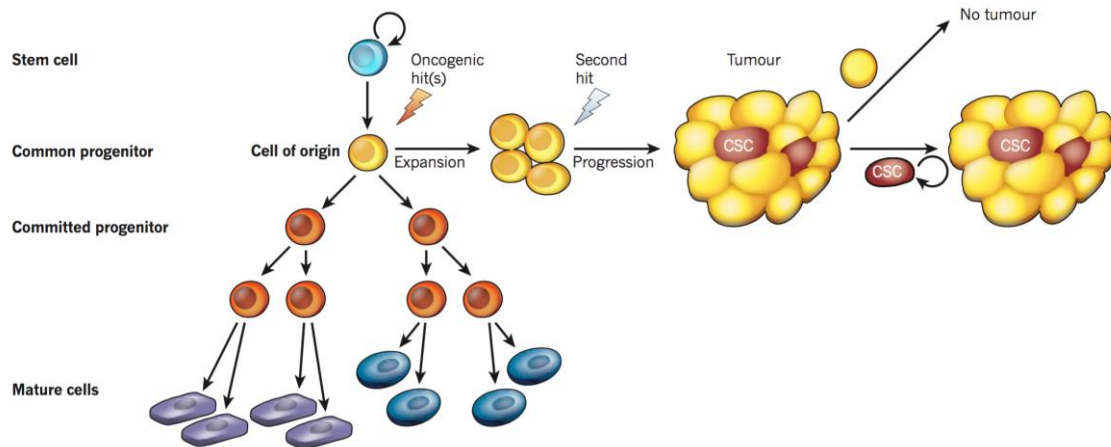


Figure 19 : Modèle de croissance et progression des cellules souches cancéreuses (Lang et al., 2013).

Au sein d'une tumeur, les cellules se divisent de façon symétrique ou asymétrique de manière à produire des progéniteurs pour permettre la croissance tumorale. Dans le modèle hiérarchique, seules les cellules souches cancéreuses ont la capacité de former des tumeurs. Dans le modèle stochastique, toutes les cellules cancéreuses ont la capacité de former des tumeurs en fonction des facteurs présents (facteurs de croissance, protéines extracellulaires).

Les cellules souches cancéreuses ont été mises en évidence dans divers types de cancer dont le mélanome.

2 – Les cellules souches cancéreuses dans le mélanome

La présence de cellules présentant des propriétés de cellules souches a été mise en évidence dans le mélanome par de nombreux groupes (Schatten et al., 2009). Ces cellules sont impliquées dans l'initiation et la progression du mélanome, la chimiorésistance ainsi que la rechute. Elles sont capables de s'autorenouveler et de se différencier en différents types cellulaires (Parmiani, 2016 ; Regad, 2013).

Leur caractérisation a reposé principalement sur l'utilisation de marqueurs de surface parmi lesquels on distingue le CD133. Seules les cellules CD133+ sont capables de former des tumeurs dans des souris immunodéprimées, ainsi que des mélanosphères. De même, l'expression de pompes d'efflux de type ABC, tel qu'ABCB5 (qui leur confère la propriété de chimiorésistance), l'expression du CD20 (un marqueur des cellules B) ou de p75 (un marqueur des cellules de la crête neurale) sont liées aux cellules souches de mélanome.

Cependant, l'expression de ces marqueurs s'est montrée variable en fonction des conditions expérimentales conduisant à une remise en question de l'existence des cellules souches cancéreuses dans le mélanome par certains auteurs (Quintana *et al.*, 2008). L'expression de ces marqueurs est en fait un phénomène dynamique d'où l'impossibilité d'établir des marqueurs absolus pour ces cellules (Boiko *et al.*, 2010). De plus, des travaux du groupe de Roesch ont montré que les cellules tumorales présentent une grande plasticité et que la présence d'une sous-population de cellules tumorales cyclant très lentement est indispensable au développement du mélanome dans la durée. Ces cellules présentent des caractéristiques fonctionnelles de cellules souches (Roesch *et al.*, 2010).

III - La Niche

Le maintien et la survie des cellules souches sont régulés par le microenvironnement : la niche (Jones & Wagers, 2008). De nombreuses niches ont été identifiées dans un grand nombre de modèles dont l'organisation et le rôle dans la régulation de l'activité des cellules souches font l'objet d'excellentes revues. Au niveau de la peau, la niche des follicules pileux : le « bulge » se situe au niveau de la gaine externe des follicules pileux, sous la glande sébacée. La niche est composée de cellules souches, de cellules de soutien, de la matrice extracellulaire, de vaisseaux sanguins et de fibres nerveuses (figure 20). Cependant, toutes les niches ne possèdent pas tous ces composants (Fuchs *et al.*, 2004). La niche régule divers processus biologiques des cellules souches tels que la prolifération, la migration, la différenciation ou le mode de division : symétrique ou asymétrique (Lander *et al.*, 2012). De plus, la niche aide à assurer l'homéostasie des tissus tout en empêchant la tumorigénèse (Goulas *et al.*, 2012). Le maintien de la niche est permis grâce aux interactions entre les cellules souches et les cellules environnantes.

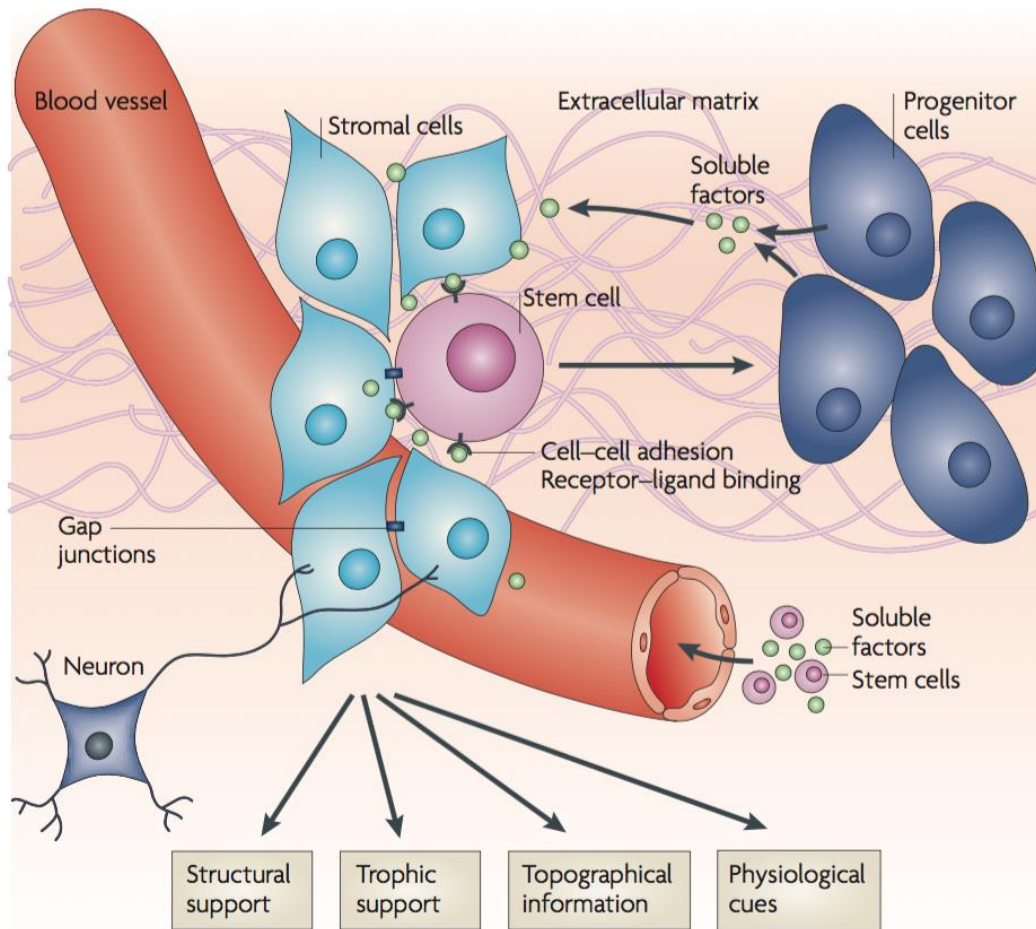


Figure 20 : Composition et fonctions de la niche des cellules souches (Jones & Wagers, 2008).

La niche est une structure complexe et dynamique qui reçoit et transmet des signaux via des médiateurs cellulaires et acellulaires. Elle est composée de cellules souches, de cellules stromales, de facteurs solubles, de la matrice extracellulaire, d'un réseau vasculaire, et de composants pour l'adhérence cellulaire.

De nombreuses études ont mis en évidence les propriétés des niches dans le contrôle des cellules souches. En effet, des signaux provenant de la niche permettent de réguler l'autorenouvellement, la survie et le maintien des cellules souches (Jones & Wagers, 2008). Il s'agit de composés biochimiques, des chimiokines, des cytokines, des facteurs de croissance, des protéases, des molécules d'adhérence (sélectines et intégrines) et des molécules de la matrice extracellulaire (Chen *et al.*, 2011). Les caractéristiques physicochimiques de l'environnement créé par la niche (pH, hypoxie, conditions métaboliques) influent également sur les cellules souches. Les cellules souches ont besoin

d'une niche comme support pour la viabilité, comme support pour contrôler leur activité ainsi que pour coordonner les différents compartiments cellulaires (Lander *et al.*, 2012).

Des dérégulations au sein de la niche peuvent être la cause de diverses pathologies telles qu'une dégénération des tissus, un vieillissement ou une tumorigénèse (Jones & Wagers, 2008).

Les cellules souches cancéreuses, comme les cellules souches normales, ont besoin d'un environnement particulier afin de maintenir leur activité. Les niches cancéreuses ou métastatiques doivent s'organiser rapidement. Les cellules tumorales peuvent préparer à distance leur niche. Pour cela elles sécrètent tout ce dont elles ont besoin pour leur niche ou incitent l'environnement à le faire. Certains facteurs sécrétés ou interactions moléculaires au sein de ces niches sont directement adoptés des niches de cellules souches normales. Dans certains cas, les cellules souches tumorales peuvent rechercher et détourner des niches de cellules souches normales déjà établies. Dans le cancer de la prostate, il a été observé que des cellules cancéreuses ont formé des micrométastases au sein de niches de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse et de ce fait, entrent en compétition avec les cellules souches hématopoïétiques pour les interactions avec la niche. La niche cancéreuse peut également contribuer à la résistance des cellules souches cancéreuses aux thérapies conventionnelles. Cibler les niches cancéreuses ou métastatiques et perturber les effets stimulants qu'elles fournissent constituerait un nouveau moyen de prévenir ou de traiter la maladie métastatique (Lander *et al.*, 2012).

De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans la régulation et le contrôle de l'activité des cellules souches dans leur niche. Certaines voies de signalisation sont spécifiques de certaines niches, d'autres sont communes notamment celles régulant les cellules souches. Les plus étudiées sont les voies Wnt, Notch et Hedgehog. Ces voies de signalisation ont fait l'objet d'études visant à établir de nouveaux traitements anticancéreux mais se sont soldés par des échecs.

IV – Caractérisation

Différentes méthodes permettent d'identifier et d'isoler les cellules souches. Il s'agit de l'expression de marqueurs de surface et des tests fonctionnels.

1 – Les Marqueurs de surface

La plupart des protocoles d'enrichissement en cellules souches reposent sur l'expression par ces dernières d'antigènes de surface pouvant être marqués à l'aide d'anticorps conjugués à des molécules fluorescentes et isolées par FACS (Challen & Little, 2006). Cependant, beaucoup de ces marqueurs sont tissus spécifiques et dépendent de l'état physiologique de la cellule. Il est indispensable d'utiliser d'autres techniques, comme des tests fonctionnels, afin d'identifier et isoler les cellules souches.

2 – Les tests fonctionnels

Les Label Retaining Cells (LRC)

Une des propriétés des cellules souches est qu'elles sont la plupart du temps dans un état de quiescence. De ce fait, des techniques ont été développées afin de mettre en évidence et d'isoler les cellules cyclant très lentement. L'incorporation d'analogues de nucléotides, comme la thymidine tritiée ($^3\text{H-T}$) ou le bromodéoxyuridine (BrdU), dans l'ADN des cellules en phase S du cycle cellulaire permet de mettre en évidence les cellules qui prolifèrent très peu. Des composés lipophiles peuvent également être utilisés, comme le Dil, le PKH6 ou le PKH26, qui sont des molécules fluorescentes utilisées pour marquer la membrane des cellules. Ces différents marqueurs sont dilués à chaque division cellulaire, seules les cellules qui ne se divisent pas ou très peu les gardent, ce sont des label retaining cells (Tirino *et al.*, 2013). Cette technique présente l'avantage de pouvoir être utilisée *in vitro* et *in vivo*. Des discussions récentes ont remis en cause la pertinence de cette technique pour détecter tous les types de cellules souches car certaines d'entre elles se diviseraient activement (Barker *et al.*, 2007). En réalité, des cellules souches peuvent être actives tandis que d'autres se divisent très rarement et constituent la réserve de cellules souches.

Le traçage génétique

Cette technique permet d'identifier tous les descendants d'une cellule. Elle fournit des informations sur le nombre de descendant de la cellule initiale, leur localisation et leur état de différenciation. Cette technique a permis de mettre en évidence le fait que certaines cellules souches peuvent être actives et se divisent (Barker & Clevers, 2010).

La clonogénicité (CFU)

L'étude de l'autorenouvellement des cellules souches est permise grâce à leur capacité à former des colonies *in vitro*. Ce test consiste à ensemencer des cellules isolées à faible densité dans des conditions qui favorisent la prolifération. En général, les colonies dérivées de cellules souches présentent une taille supérieure aux colonies dérivées de cellules non souches (Tirino *et al.*, 2013).

La Formation de sphères (SFU)

Ce modèle a été créé pour l'étude des cellules souches nerveuses et est maintenant utilisé pour l'étude des cellules souches de nombreux tissus. Seules les cellules souches sont capables de proliférer dans un milieu dépourvu de sérum et forment des sphères. Cela permet d'enrichir et d'étudier la population des cellules souches normales et tumorales. De plus, la formation de sphères permet de recréer un environnement qui mime l'organisation 3D des tumeurs (Tirino *et al.*, 2013).

La Side Population

Les cellules souches sont capables d'exclure des colorants vitaux car elles possèdent des transporteurs membranaires de la famille des pompes ABC. Cette augmentation de l'exclusion de colorants, tels que le Hoechst 33342 ou la Rhodamine 123, permet d'identifier une sous-population cellulaire : la side population présentant des caractéristiques de cellules souches (Dontu *et al.*, 2003 a et b). Il existe 49 membres dans la famille des pompes ABC dont une dizaine est impliquée dans l'efflux de xénobiotiques et la résistance aux thérapies actuelles (Tirino *et al.*, 2013).

L'activité aldéhyde déshydrogenase

Les cellules souches présentent une forte activité enzymatique de l'aldéhyde déshydrogenase (ALDH). L'ALDH est une isoenzyme cytosolique impliquée dans la détoxification des aldéhydes intracellulaires par oxydation et conversion du rétinol en acide rétinoïque. Elle est également impliquée dans la résistance à certains agents chimiothérapeutiques (Tirino *et al.*, 2013).

Qu'implique l'existence de cellules souches cancéreuses d'un point de vue clinique ?

V – Signification médicale des cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses étant à l'origine des cancers, leur implication clinique est, de ce fait, très importante (Lobo *et al.*, 2007).

En effet, les traitements actuels manquent de spécificité envers les cellules tumorales. Ils montrent une relative efficacité à éliminer la plupart des cellules cancéreuses se divisant rapidement mais ne sont pas capables d'éradiquer les cellules souches cancéreuses qui, de ce fait, reforment des tumeurs après le traitement (Lobo *et al.*, 2007 ; Mueller *et al.*, 2009 ; Dylla *et al.*, 2008).

Les cellules souches cancéreuses résistent à la chimiothérapie grâce à plusieurs mécanismes : la quiescence, leur capacité de réparation de l'ADN, la diminution de l'apoptose ou encore l'expression de transporteurs de type ABC (Dean, 2009).

Les traitements actuels ne permettent pas d'éliminer toutes les cellules cancéreuses (figure 21). Une combinaison de traitements ciblant toutes les sous-populations cellulaires, y compris celle cyclant lentement, est essentielle afin d'éviter une nouvelle croissance tumorale et empêcher ainsi une rechute (Li *et al.*, 2008). Cependant, il est difficile d'effectuer un criblage d'agents anticancéreux sur la population des cellules souches cancéreuses du fait de la rareté de ces cellules et de la difficulté de les maintenir en culture (Pattabiraman & Weinberg, 2014).

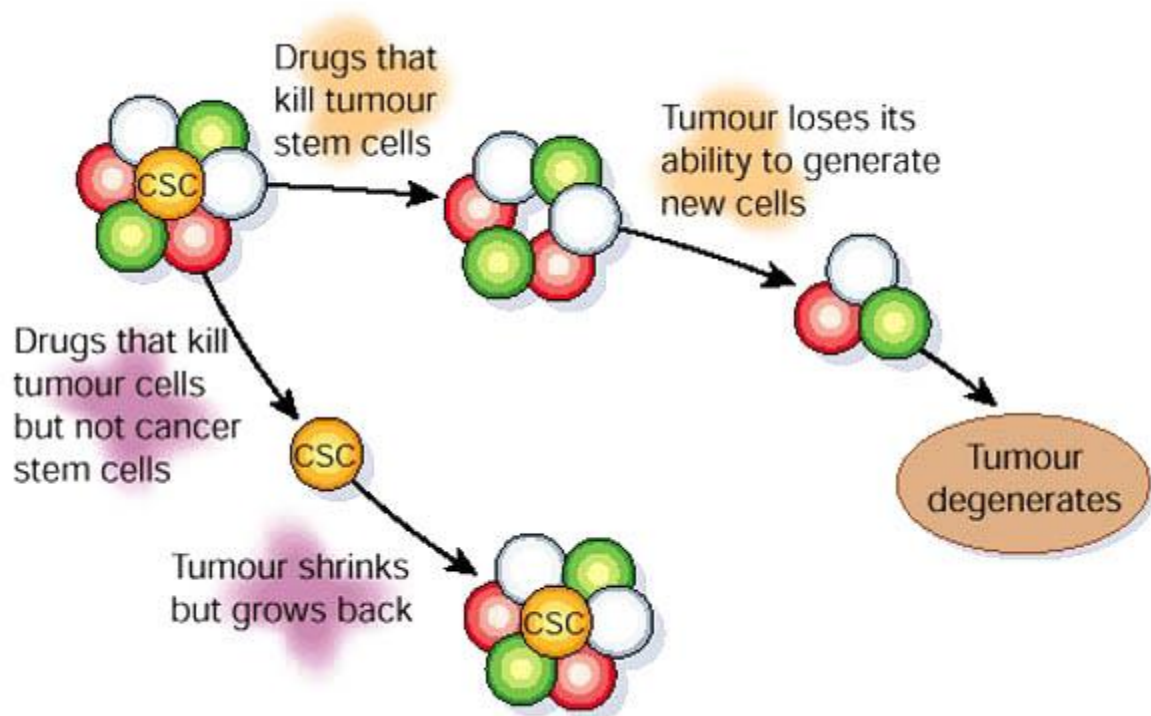


Figure 21 : Thérapies conventionnelles vs thérapies ciblant les cellules souches cancéreuses (Reya et al., 2001).

Les thérapies classiques éliminent les cellules n'ayant pas la capacité de s'autorenouveler et ayant une capacité de prolifération limitée. Les cellules souches cancéreuses ne sont pas éliminées suite à ce traitement et conduisent à la formation de nouvelles tumeurs et ainsi à la récurrence de la maladie. Cependant, les nouvelles stratégies ciblant les cellules souches cancéreuses, empêchent la formation de nouvelles tumeurs et les rechutes.

De nouvelles approches consistent à cibler les voies de signalisation clé des cellules souches cancéreuses. En effet, les cellules souches cancéreuses et les cellules souches adultes normales ont des propriétés communes c'est pourquoi cibler les voies de signalisation activées par Wnt, Notch ou Hedgehog, qui sont des voies essentielles pour l'autorenouvellement des cellules souches normales, constitue une nouvelle approche encourageante car leur inactivation pourrait permettre l'élimination des cellules souches cancéreuses (Pattabiraman & Weinberg, 2014 ; Takebe et al., 2015).

Actuellement, on compte plus de 60 essais cliniques en cours qui testent l'efficacité d'anticorps ou de molécules à éliminer les cellules souches cancéreuses (Kaiser, 2015).

Les cellules souches tumorales résistantes aux traitements sont responsables des rechutes qui peuvent apparaître quelques mois à quelques années après la fin du

traitement. Cette période pendant laquelle les cellules souches tumorales sont indétectables est appelée : dormance tumorale.

D - LA DORMANCE TUMORALE

I – Notions générales

La dormance tumorale est un phénomène clinique qui correspond au temps entre la fin du traitement anticancéreux, et la disparition de la tumeur primaire, et la récurrence de la maladie, locale ou à distance (causée par la formation de métastases). Au cours de cette période, plus ou moins longue, les cellules tumorales résiduelles sont disséminées dans l'organisme et demeurent indétectables et asymptomatiques. L'état de dormance est un état réversible. Par des mécanismes qui à ce jour demeurent inconnus, ces cellules dormantes résiduelles entrent en prolifération et sont ainsi responsables de la rechute de la maladie, une des principales causes de décès de patients atteints de cancer (Aguirre-Ghiso, 2007). Il existe trois circonstances pour lesquelles les cellules tumorales utilisent la dormance pour survivre et s'adapter : la dormance de la tumeur primaire, la dormance métastatique et la dormance induite par les thérapies anticancéreuses. Dans les tumeurs primaires, les cellules cancéreuses alternent entre périodes de prolifération et périodes de quiescence afin d'acquiescer suffisamment de mutations génétiques et de modifications épigénétiques nécessaires à leur transformation maligne. La dormance métastatique permet de fournir aux cellules tumorales disséminées le temps nécessaire à leur adaptation à un nouvel environnement. Enfin, suite à un traitement anticancéreux, les cellules tumorales peuvent entrer en dormance afin de survivre et sont ainsi responsables des rechutes à leur sortie de dormance.

La dormance tumorale est fréquemment observée dans différents cancers dont le mélanome. En effet, plusieurs dizaines d'études ont mis en évidence des rechutes de mélanome plusieurs années après l'excision de la tumeur primaire. L'une d'entre elles a montré que parmi les 1907 patients en rémission depuis plus de dix ans d'un mélanome localisé traité par excision chirurgicale, 217 d'entre eux, soit 11% ont rechutés. Cela montre que bien que le cancer ait été diagnostiqué à un stade précoce, les patients ne sont pas guéris et une récurrence peut apparaître plusieurs années plus tard, confirmant la présence de cellules souches tumorales dormantes (Ossowski & Aguirre-Ghiso, 2010). Un autre fait montrant que les cellules de mélanome peuvent persister dans un état de dormance prolongé provient d'un cas rapporté dans lequel deux receveurs de transplantation rénale, qui ont obtenu un rein provenant du même donneur, ont développé un mélanome au niveau de la transplantation. Il s'est avéré qu'un mélanome de 2,6 mm d'épaisseur avait été diagnostiqué et excisé chez le donneur 16 ans avant la transplantation. Le donneur était considéré comme guéri durant les 15 années qui ont suivi l'excision chirurgicale (Strauss &

Thomas, 2010). Ces données indiquent que des cellules de mélanome ont persisté dans un état dormant dans les reins du donneur pendant 16 ans et que, suite à leur transplantation chez deux receveurs traités par des immunosuppresseurs, les cellules sont sorties de dormance. D'autres cas de transfert de mélanome ont été reportés chez 26 receveurs d'organes dont 21 d'entre eux ont développé un mélanome (Mackie *et al.*, 2003).

De nombreuses études ont démontré trois principaux mécanismes de dormance tumorale (figure 22). Deux d'entre eux impliquent une dormance de la masse tumorale, il s'agit de la dormance angiogénique et de l'immunosurveillance. Le troisième mécanisme implique une dormance cellulaire ou quiescence (Aguirre-Ghiso, 2007).

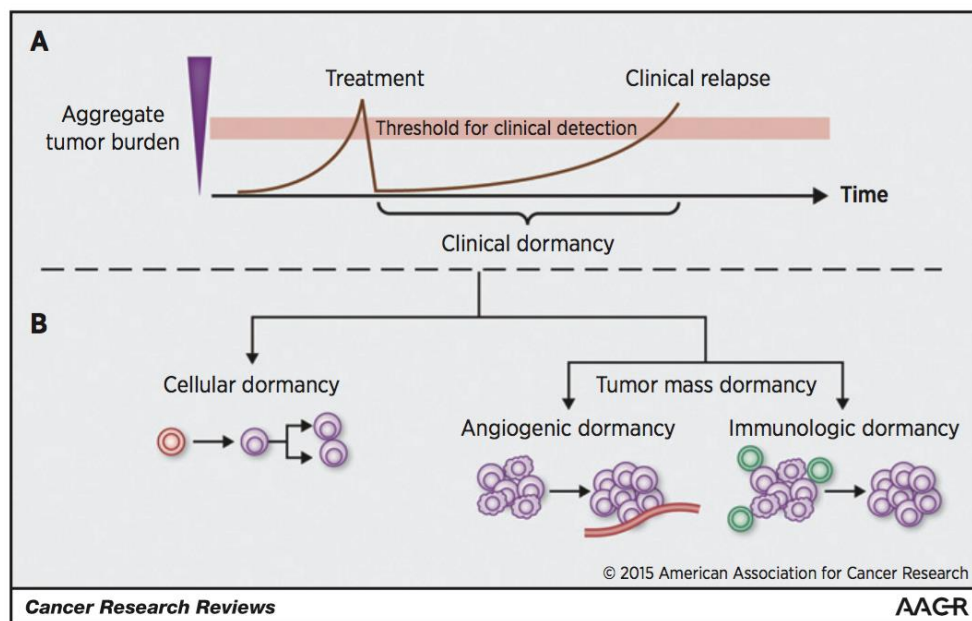


Figure 22 : Mécanismes biologiques de la dormance tumorale (Yeh & Ramaswamy, 2015).

La dormance tumorale est la période de temps, après le traitement, où les cellules résiduelles sont indétectables. Les trois mécanismes de dormance tumorale sont : la quiescence cellulaire, la dormance angiogénique et la dormance immunologique. La progression du cancer est possible lorsque les cellules quiescentes entrent en cycle cellulaire. Dans le cas de la dormance d'une masse tumorale, la progression du cancer est induite lorsque les cellules échappent au système immunitaire ou après le switch angiogénique.

La dormance angiogénique

Au delà d'une certaine taille, la masse tumorale a besoin d'un important apport en oxygène et nutriments que la vascularisation présente ne peut lui fournir et doit donc induire le processus d'angiogenèse (Wang & Lin, 2013). Seulement, lorsque les cellules tumorales ne sont pas capables de recruter des vaisseaux sanguins afin de favoriser la néovascularisation, la tumeur n'obtient pas les nutriments nécessaires à sa prolifération et en conséquence, le nombre de cellules éliminées par apoptose est égal au nombre de cellules en division. De ce fait, la masse tumorale n'augmente pas et la dormance angiogénique se met en place jusqu'au switch angiogénique où la tumeur devient capable de répondre à l'hypoxie et d'induire une néovascularisation. Cet arrêt de la dormance angiogénique est contrôlé par la balance entre les facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF, et antiangiogéniques, tels que la Thrombospondine (Chen *et al.*, 2014 ; Aguirre-Ghiso, 2007 ; Senft & Ronai, 2016).

La dormance immunologique

Le système immunitaire joue également un rôle dans le contrôle de la croissance tumorale via 3 processus distincts : élimination, équilibre et échappement. Des études ont montré que le système immunitaire est capable de cibler et d'éliminer la plupart des cellules tumorales avant qu'elles ne deviennent cliniquement symptomatiques (élimination). Certaines d'entre elles ne sont pas éliminées, cependant, leur croissance est limitée par le système immunitaire d'où un état d'équilibre et de maintien de ces cellules tumorales en dormance (équilibre). Après une longue période d'interactions constantes entre l'immunité et les cellules tumorales, l'immunogénicité des cellules tumorales dormantes peut être modifiée, conduisant au processus d'échappement. Les cellules tumorales commencent à proliférer et causent la rechute (Aguirre-Ghiso, 2007 ; Wang & Lin, 2013).

La dormance cellulaire

La dormance cellulaire est caractérisée par un arrêt des cellules tumorales en phase G0 du cycle cellulaire, elles sont donc dans un état de quiescence. L'arrêt du cycle est réversible et dans certaines conditions (induction par des facteurs de croissance, des cytokines...), elles sont capables d'entrer de nouveau en cycle et de proliférer (Wang & Lin, 2013). Il existe différents mécanismes contrôlant l'entrée et la progression en phase G1 du cycle cellulaire. Certains impliquent l'activation de CDK (cyclines dépendantes de kinases) spécifiques associées à des cyclines qui permettent, par la suite, la progression du cycle cellulaire en phases S, G2 et M. L'inhibition de deux voies de signalisation activées au cours de

l'oncogénèse (PI3K/AKT et RAS-MEK-ERK/MAPK) joue également un rôle important dans la dormance cellulaire (figure 23). Des travaux d'Aguirre-Ghiso ont montré que l'inhibition de la voie RAF-MEK-MAPK(ERK) et l'activation de voies de signalisation impliquées dans le stress, dont la voie p38 MAPK, peuvent induire une dormance cellulaire. En effet, un ratio ERK/p38 élevé induit une prolifération tandis qu'un ratio ERK/p38 faible induit une dormance dont la durée varie en fonction de l'environnement (Aguirre-Ghiso, 2007 ; Yeh & Ramaswamy, 2015 ; Giancotti, 2013). Toutefois, ces mécanismes semblent être dérégulés dans les cellules de mélanome qui n'entrent pas en quiescence malgré une forte expression de p38 (Ossowski & Aguirre-Ghiso, 2010). De plus, la quiescence des cellules souches cancéreuses, négatives pour le marqueur de prolifération Ki67 et pour les marqueurs apoptotiques, contribue à leur survie en réponse aux agents anticancéreux conduisant ainsi à une rechute (Wang & Lin, 2013 ; Senft & Ronai, 2016).

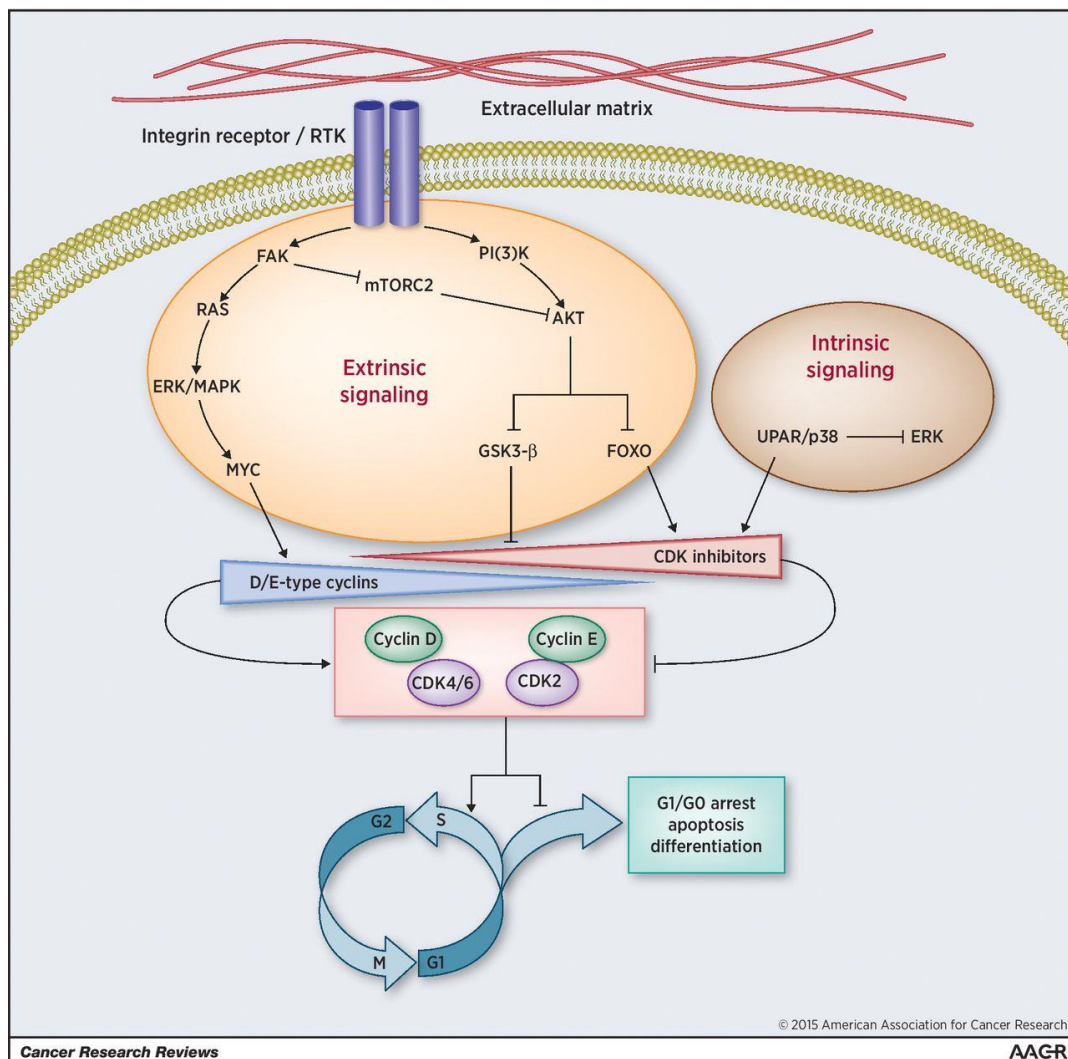


Figure 23: Les voies de signalisation de la dormance cellulaire (Yeh & Ramaswamy, 2015).

La dormance cellulaire est influencée par une combinaison de signaux internes et externes. La signalisation des récepteurs des intégrines joue un rôle important dans le maintien de la progression du cycle cellulaire en induisant l'activation des voies RAS-ERK/MAPK et PI3K/AKT. L'inhibition de la signalisation des intégrines est un facteur important de la dormance cellulaire et peut être influencée par la composition de la matrice extracellulaire. La signalisation intrinsèque par la voie de stress uPAR/p38 peut également induire la dormance cellulaire par inhibition de la voie MAPK.

La dormance tumorale, dont on comprend mieux les mécanismes, apparaît comme une nouvelle caractéristique du cancer qui s'ajoute à celles déjà décrites par Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2000). Cependant, la dormance est un phénotype complexe que les chercheurs tentent de modéliser mathématiquement afin d'en améliorer notre compréhension (Chen *et al.*, 2014).

A l'état de dormance, les cellules sont insensibles aux drogues anticancéreuses actuelles qui ciblent les cellules en prolifération. De plus, des données suggèrent que la dormance pourrait être initiée par des interactions entre des ARN non codants et des modifications épigénétiques (Crea *et al.*, 2015) d'où l'échec des thérapies actuelles à éradiquer la maladie. Les opportunités thérapeutiques qui émergent de la compréhension de la dormance tumorale incluent la possibilité d'induire et/ou de maintenir les cellules tumorales dormantes et d'induire la mort cellulaire des cellules tumorales dormantes résiduelles en ciblant leurs mécanismes de survie et de résistance. En effet, la question est de savoir si sortir les cellules tumorales de leur état de dormance peut faciliter leur élimination avec des thérapies classiques jusqu'ici incapables d'arrêter définitivement leur progression. Les cellules tumorales disséminées résiduelles sont génétiquement hétérogènes et leur sortie de dormance augmenterait les mécanismes génétiques et épigénétiques leur permettant de résister aux thérapies. De plus, la sortie de dormance des cellules tumorales semble induire une récurrence tumorale plus rapide dans des systèmes expérimentaux. De ce fait, maintenir les cellules tumorales disséminées dormantes ou les éradiquer dans leur état de dormance semble être une stratégie alternative moins risquée (Sosa *et al.*, 2014).

L'existence d'un lien entre la dormance tumorale et les cellules souches cancéreuses a été proposée aux vues de certaines caractéristiques que possèdent les cellules souches normales qui sont partagées par les cellules souches cancéreuses et qui pourraient expliquer la formation des métastases. En effet, les cellules tumorales disséminées sont la plupart du temps dans un état de quiescence et sont responsables de la formation de tumeurs. Des caractéristiques qui rappellent celles des cellules souches tumorales (Aguirre-Ghiso, 2007).

II – Voies de signalisation régulant la quiescence/activation des cellules souches tumorales

De nombreux régulateurs des cellules souches et de la quiescence/activation ont été décrits, parmi eux on distingue : la voie de signalisation PI3K/AKT, et un de ses effecteurs FOXO3A, et la voie p38 MAPK.

1 – La voie PI3K/AKT

La voie PI3K joue un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que le métabolisme cellulaire, la prolifération, la progression du cycle cellulaire et la survie (figure 23). La PI3K est activée par des facteurs de croissance et des inducteurs de l'angiogenèse tels que le VEGF. Des amplifications et des mutations de la PI3K sont fréquentes dans divers types de tumeurs solides. Des altérations génétiques des molécules en amont et en aval de la PI3K, telles que des récepteurs de tyrosines kinases ou AKT respectivement, sont également fréquemment observées dans les cancers. La voie de signalisation de la PI3K régule la croissance tumorale par l'activation d'AKT et d'autres cibles (Jiang & Liu, 2009).

Les PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) sont des protéines regroupées dans trois classes : I, II et III, en fonction de leur structure, leurs substrats, leur distribution, leur mécanisme d'activation et leurs fonctions. La classe I joue un rôle vital dans la régulation de la prolifération cellulaire, la croissance et la survie initiée par de nombreux facteurs de croissance et de survie. Cette classe I est elle-même subdivisée en deux classes : IA et IB. Les PI3K de la classe IA sont activées par des récepteurs de tyrosine kinase (RTK) tandis que celles de la classe IB sont activées par des récepteurs couplés à des protéines G (GPCR). La classe IA comprend des hétérodimères composés d'une sous-unité catalytique, la p110, et d'une sous-unité régulatrice, la p85, et utilise le phosphatidylinositol, le PIP (phosphatidylinositol-4-phosphate) et le PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) comme substrats. De plus, il existe trois isoformes de la sous-unité p110 : p110 α , p110 β et p110 δ , et trois isoformes de la sous-unité p85 : p85 α , p85 β et p85 γ . La classe IB comprend des hétérodimères composés de la sous-unité catalytique p110 δ et d'une sous-unité régulatrice p101 ou de ces homologues p84 ou p87PIKAP. La classe II des PI3K inclue : PI3KC2 α , PI3KC2 β et PI3KC2 γ qui utilisent le phosphatidylinositol et le PIP comme substrats. La classe III est composée d'hétérodimères de sous-unités catalytique et régulatrice qui utilisent uniquement le phosphatidylinositol comme substrat (Jiang & Liu, 2009).

AKT (ou PKB) est une des plus importantes cibles de la PI3K. Il existe trois isoformes d'AKT : AKT1, AKT2 et AKT3, codées par des gènes différents mais montrant des

homologies de séquence. Le produit de la PI3K : PIP3, se lie à AKT qui est de ce fait recruté à la membrane cellulaire et se lie à PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) via leurs domaines PH (plekstrin homology). Par la suite, PDK1 phosphoryle et active AKT au niveau de son domaine kinase. Une fois activée, AKT se dirige vers le cytoplasme ou le noyau où elle phosphoryle, active ou inhibe de nombreuses cibles afin de réguler diverses fonctions dont le métabolisme cellulaire, la synthèse de protéines, la survie cellulaire/inhibition de l'apoptose et la progression du cycle cellulaire (Jiang & Liu, 2009 ; Mogi *et al.*, 2003).

L'activation de la PI3K est impliquée dans l'oncogenèse. En effet, de nombreuses dérégulations de la PI3K ou de ses cibles sont très fréquemment retrouvées dans de nombreux cancers. De plus, la surexpression et l'activation d'AKT sont également impliquées dans la carcinogenèse. La PI3K transmet des signaux oncogéniques à AKT afin de réguler la tumorigenèse à travers plusieurs cibles. En effet, AKT active la voie NFκB par la phosphorylation d'IKKα/β. De plus, AKT régule la prolifération et la croissance tumorale en favorisant la progression dans le cycle cellulaire. AKT inhibe la transcription de gènes inhibiteurs du cycle cellulaire induite par FOXO et favorise la transition G1/S (Jiang & Liu, 2009).

2 - FOXO

Les protéines FOX (Forkhead Box) sont caractérisées par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN « forkhead ». On dénombre 50 protéines FOX, regroupées dans 19 familles (FOXA à FOXS) sur la base d'homologie de séquence dans et en dehors du domaine « forkhead ». Les protéines FOX régulent des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation, le métabolisme, la sénescence, la survie ou l'apoptose. Des dérégulations des protéines FOX sont impliquées dans l'initiation et la progression de cancer ainsi que dans la résistance à la chimiothérapie (Lam *et al.*, 2013).

La sous-classe « O » est la plus étudiée des sous-familles de protéines FOX. Ce sont des régulateurs de la prolifération cellulaire et de la survie (figure 23). Elle est constituée de quatre membres : FOXO1, FOXO3A, FOXO4 et FOXO6. Tous sont exprimés par une grande variété de cellules, excepté FOXO6, qui est uniquement exprimé par les cellules nerveuses. Les protéines FOXO, et particulièrement FOXO3A, agissent en aval de plusieurs voies oncogéniques dont ERK, IKKβ ou PI3K/AKT, qui séquestrent FOXO au niveau du cytoplasme et induisent sa dégradation. A l'opposé, la phosphorylation de FOXO par AMPK (AMP-activated protein kinase), CDK2 (cyclin-dependent kinase 2), JNK (c-Jun N-terminal kinase) ou p38 MAPK, favorise sa translocation dans le noyau et augmente sa capacité de régulation de l'arrêt de la prolifération, de la différenciation ou de la mort cellulaire. D'autres

modifications post-traductionnelles peuvent affecter FOXO. Il s'agit de la méthylation ou de l'acétylation provoquant la translocation cytoplasmique et la dégradation de FOXO. Au contraire, la déacétylation de FOXO permet l'activation de gènes spécifiques conférant une résistance au stress oxydant et aux agents anticancéreux cytotoxiques (Lam *et al.*, 2013).

Les protéines FOXO sont des régulateurs négatifs du cycle cellulaire. L'une des premières fonctions de FOXO est de participer à la régulation de la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire, en induisant une inhibition des cyclines de type D, par augmentation de la transcription de répresseurs de ces cyclines. Par exemple, la surexpression des formes nucléaires actives de FOXO1 et FOXO3A inhibe l'activité de CDK4 et induit un arrêt en phase G1. Au contraire, une forte activité de la voie PI3K/AKT, associée à une inhibition de FOXO, induit l'expression de cycline D1 et des complexes Cycline D1-CDK4/6 et une entrée précoce en phase S. La régulation de l'expression des cyclines D n'est pas le seul mécanisme par lequel FOXO contrôle la transition G1/S. En effet, FOXO peut également agir au niveau des inhibiteurs de cyclines dépendantes de kinase (CKI). Par exemple, FOXO peut provoquer une augmentation de la transcription de p21^{cip1} et de p27^{kip1} (Ho *et al.*, 2008).

FOXO contrôle également la transition G2/M du cycle cellulaire. En effet, l'activation de FOXO3A au cours de la phase S provoque un arrêt du cycle en G2/M. De plus, les protéines FOXO induisent l'expression de gènes tels que : cycline B ou polo-like kinase, qui sont très importants pour la progression en phases G2 et M. De même, la surexpression de FOXO1 diminue l'expression de gènes essentiels à la transition G2/M (Ho *et al.*, 2008).

L'activation des protéines FOXO conduit à une entrée des cellules en phase G0 du cycle cellulaire, tandis que son inactivation, par activation d'AKT, provoque l'entrée des cellules en cycle cellulaire et leur prolifération (Kops *et al.*, 2002). En effet, dans les cellules souches hématopoïétiques, AKT est inactif et les protéines FOXO, localisées dans le noyau de ces cellules, maintiennent leur quiescence. Suite à une stimulation par des cytokines, AKT devient actif et provoque l'export des protéines FOXO dans le cytoplasme des cellules, qui sortent de quiescence (Miyamoto *et al.*, 2007).

Une dérégulation de FOXO3A peut provoquer une perturbation de la différenciation pouvant conduire au développement de certains cancers (Ho *et al.*, 2008). Dans le modèle des leucémies myéloïdes chroniques, une étude a montré que les inhibiteurs de tyrosine kinase induisent un arrêt des cellules leucémiques en phase G1 via l'inhibition de la voie PI3K/AKT et la réactivation des protéines FOXO. L'inactivation des protéines FOXO dans les cellules leucémiques provoque leur entrée en cycle et permet leur apoptose en réponse à des inhibiteurs de tyrosine kinase (Pellicano *et al.*, 2014).

3 – La voie p38MAPK

La famille des MAPK (mitogen-activated protein kinase) est divisée en trois groupes : la sous-famille ERK (extracellular-signal-regulated kinases), la sous-famille JNK (c-Jun N-terminal kinases) et la sous-famille p38 MAPK. Cette dernière est impliquée dans l'inflammation, l'apoptose, et joue un rôle important dans la réponse cellulaire à des signaux externes, en particulier le stress. Elle est activée par des stress environnementaux ou des cytokines pro-inflammatoires liées à l'inflammation, telles que le TNF ou l'IL-1 (Oeztuerk-Winder & Ventura, 2012 ; Nebreda & Porras, 2000 ; Adam *et al.*, 2009).

Il existe quatre isoformes de p38 MAPK, divisées en deux sous-groupes, selon leur profil d'expression, leur spécificité de substrat et leur sensibilité aux inhibiteurs pharmacologiques. Le premier sous-groupe est composé de p38 α et p38 β , exprimés de façon universelle, et le deuxième comprend p38 γ et p38 δ , au profil d'expression tissu-spécifique. Toutes sont activées par la kinase MKK6. D'autres kinases peuvent les activer, notamment MKK3, qui active p38 α , p38 γ et p38 δ , ou MKK4, qui active uniquement p38 α . Les substrats de p38 sont essentiellement des protéines kinases et des facteurs de transcription. L'activation de la voie p38 MAPK par des cytokines ou un stress cellulaire favorise l'inhibition de la croissance cellulaire et induit l'apoptose. Les différentes isoformes ont des fonctions redondantes, spécifiques ou opposées en fonction du type cellulaire et de la nature du stimulus. De plus, l'activation de p38 est nécessaire à l'inhibition d'oncogènes, son inactivation permet la progression tumorale (Oeztuerk-Winder & Ventura, 2012 ; Nebreda & Porras, 2000 ; Adam *et al.*, 2009).

L'isoforme p38 α est le membre le plus abondant de cette famille. Il est essentiel au développement embryonnaire et intervient dans de nombreuses fonctions cellulaires dont : la prolifération, la différenciation, la mort cellulaire, la migration ou la réponse au stress, via divers mécanismes comme la régulation de la transcription, la synthèse de protéines, la stabilisation d'ARNm ou le remodelage de la chromatine. Au niveau de la peau, p38 régule la caspase 14 afin de permettre la différenciation des kératinocytes (Oeztuerk-Winder & Ventura, 2012).

Un autre facteur à prendre en compte, en plus de tous ces régulateurs et voies de signalisation, est l'inflammation. En effet, la principale cause de développement d'un mélanome est l'exposition aux rayons UV, qui provoquent des mutations ainsi que la production d'un environnement inflammatoire.

E – INFLAMMATION ET CANCER

I - Notions générales

L'inflammation, un mécanisme de défense de l'hôte, est une réponse immédiate du corps à une lésion tissulaire causée par une infection microbienne ou d'autres stimuli nocifs. L'inflammation aiguë est caractérisée par une vasodilatation, une fuite de la vascularisation et une infiltration de lymphocytes au niveau du site de l'infection, afin d'éliminer le pathogène, et est suivie d'une phase de réparation des tissus endommagés. L'inflammation aiguë a un rôle bénéfique contre les infections et les lésions. Cependant, une résolution inadéquate de l'inflammation ou des réactions inflammatoires incontrôlées provoquent un état d'inflammation chronique, qui constitue un facteur de développement de cancer (Kundu & Surh., 2012).

Une minorité de cancers sont causés par des mutations germinales. La majorité d'entre eux (90%) sont liés à des mutations somatiques et à des facteurs environnementaux, la plupart du temps associés à une inflammation chronique. En effet, plus de 20% des cancers sont liés à des infections chroniques, 30% sont attribués au tabac et aux polluants inhalés (silice et amiante) et 35% sont attribués à des facteurs alimentaires (Grivennikov *et al.*, 2010).

Il existe plusieurs types d'inflammation, qui diffèrent par leurs causes, leurs mécanismes, leurs issues ou leurs intensités, et qui peuvent favoriser le développement et la progression de cancer. Parmi elles, on distingue les infections bactériennes, comme celle d'*Helicobacter pylori* qui est associée au développement de cancers gastriques et de lymphomes de la muqueuse gastrique, celles des *Bacteroides* liées au développement de cancers du colon, et les infections parasitaires, comme celle de *Schistosoma* liée au développement de cancer de la vessie. On distingue également les infections par des virus, comme celui de l'hépatite B (HBV) ou C (HCV), qui augmentent le risque de carcinomes hépatocellulaires en conduisant les cellules hépatiques à surexprimer des gènes qui favorisent l'apparition du cancer. Enfin, il existe d'autres types d'inflammations chroniques qui précèdent le développement tumoral et qui peuvent être causées par des dérégulations de l'immunité ou de l'auto-immunité. Il s'agit, par exemple, de maladies inflammatoires de l'intestin qui augmentent le risque de cancers colorectaux. Cependant, toutes les maladies inflammatoires chroniques n'augmentent pas le risque de développer un cancer, certaines d'entre elles, comme le psoriasis, réduisent ce risque (Grivennikov *et al.*, 2010 ; Tanno & Matsui., 2011).

L'existence d'un lien entre le cancer et l'inflammation a pour la première fois été décrite en 1863 par Rudolf Virchow. Ses observations selon lesquelles les cellules inflammatoires

infiltrant les tumeurs l'ont conduit à l'hypothèse selon laquelle le cancer provient de sites inflammatoires (discuté in Landskron *et al.*, 2014). Depuis, de nombreuses études ont démontré un lien entre le cancer et l'inflammation grâce à diverses évidences. Tout d'abord, les maladies inflammatoires augmentent le risque de développer plusieurs types de cancer et les anti-inflammatoires non stéroïdiens diminuent le risque de développement et la mortalité de certains cancers. Des cellules inflammatoires et immunitaires, des chimiokines et des cytokines sont présentes dans le microenvironnement de toutes les tumeurs humaines dès les premiers stades de développement, jusqu'à la formation des métastases. De plus, cibler les médiateurs de l'inflammation (des chimiokines ou des cytokines, comme le TNF ou IL-1 β), des facteurs de transcription clés (NF κ B ou STAT3), ou des cellules inflammatoires, diminue l'incidence et la propagation des cancers, tandis que la surexpression de cytokines inflammatoires favorise le développement de tumeurs (Mantovani *et al.*, 2008). De plus, les cellules immunitaires affectent les cellules tumorales via la production de cytokines, de chimiokines, de facteurs de croissance, de prostaglandines, d'espèces réactives de l'oxygène et d'espèces réactives de l'azote et la plupart des tumeurs solides déclenchent une réponse inflammatoire intrinsèque qui conduit à un environnement protumorigène. Enfin, les radiations et la chimiothérapie, en causant la mort par nécrose des cellules tumorales et des tissus environnants, déclenchent à leur tour une réaction inflammatoire (Grivennikov *et al.*, 2010).

La connexion entre l'inflammation et le cancer consiste ainsi en deux voies (figure 24) : une voie extrinsèque et une voie intrinsèque (Mantovani *et al.*, 2008).

Introduction

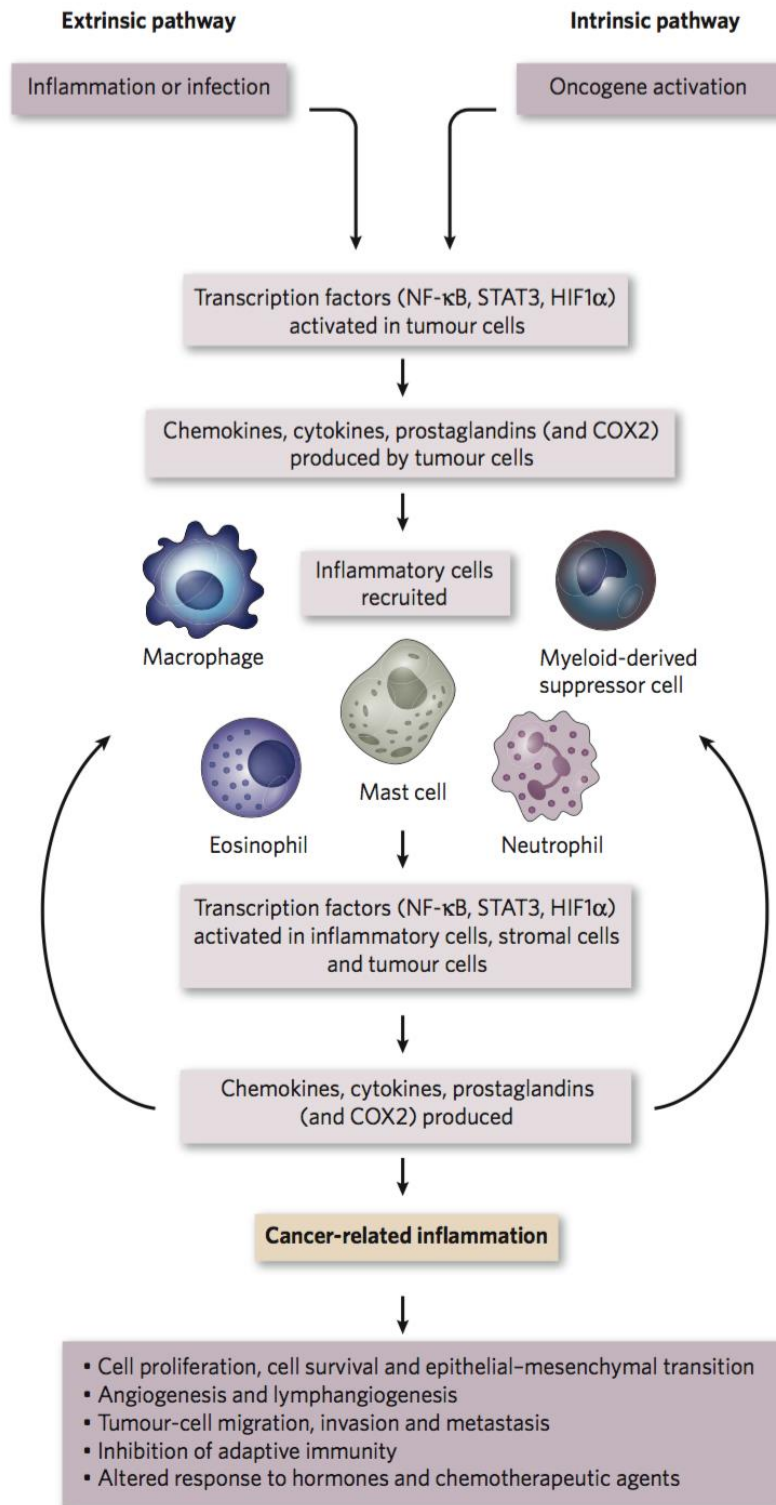


Figure 24 : Les voies reliant l'inflammation et le cancer (Mantovani *et al.*, 2008).

La voie intrinsèque est activée par des mutations génétiques et cause une néoplasie. Elle implique l'activation d'oncogènes et l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur. Les cellules ainsi transformées produisent des médiateurs inflammatoires générant un environnement inflammatoire au niveau de la tumeur. En ce qui concerne la voie

extrinsèque, les conditions inflammatoires et infectieuses augmentent le risque de développer un cancer. Les deux voies convergent et provoquent une activation de facteurs de transcription (NFκB, STAT3, HIF1α) dans les cellules tumorales. Ces facteurs de transcription coordonnent la production de médiateurs de l'inflammation dont des cytokines, des chimiokines ou la cyclooxygénase-2. Ces facteurs recrutent et activent des leucocytes. Ils activent les mêmes facteurs de transcription dans les cellules inflammatoires, stromales et tumorales, provoquant une forte production de médiateurs de l'inflammation, générant ainsi un environnement tumoral inflammatoire.

Les mécanismes par lesquels l'inflammation contribue à la carcinogenèse sont : l'induction d'une instabilité chromosomique, des altérations de modifications épigénétiques, une augmentation de la prolifération cellulaire, une diminution de l'apoptose, une stimulation de la néovascularisation intratumorale et une invasion à travers la membrane basale associée à la tumeur favorisant la formation de métastases. Au cœur de ces processus biochimiques, on retrouve une expression élevée, une surproduction ou une activité anormale de divers médiateurs de l'inflammation tels que : des cytokines, des chimiokines, la cyclooxygenase-2, des prostaglandines ou de l'oxyde nitrique (Kundu & Surh., 2012 ; Mantovani *et al.*, 2008).

Une fois la tumeur établie, le microenvironnement renforce l'inflammation chronique. En effet, le microenvironnement tumoral est composé de cellules de l'immunité innée (macrophages, neutrophiles, mastocytes, cellules dendritiques et natural killer), de cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes T et B), de cellules cancéreuses et de leur stroma (fibroblastes, cellules endothéliales, péricytes et cellules mésenchymateuses) qui communiquent entre elles par des contacts directs ou via la production de cytokines et de chimiokines qui agissent de manière autocrine ou paracrine afin de contrôler la croissance tumorale. L'expression des divers médiateurs de l'immunité, de même que l'abondance et l'état d'activation des différents types cellulaires du microenvironnement tumoral déterminent si l'immunité anti-tumorale se met en place ou si l'inflammation va favoriser la formation de tumeurs (Grivennikov *et al.*, 2010 ; Raposo *et al.*, 2015).

II - Les cytokines et le TNF

Parmi les facteurs qui sont impliqués dans le lien entre l'inflammation et le cancer, on distingue les cytokines. Ces dernières sont des protéines de faible poids moléculaire qui régulent plusieurs processus physiologiques : la prolifération, la survie, la migration cellulaire, la mort, la différenciation et la réponse immunitaire. Certaines d'entre elles stimulent ou aggravent l'inflammation, d'autres atténuent la réponse inflammatoire. De plus, elles participent à la formation de tumeurs. En effet, en réponse à une inflammation, des

cytokines sont sécrétées par des cellules immunitaires et inflammatoires provoquant une activation de facteurs de transcription (NFκB, STAT3, AP-1) dans les cellules pré-malignes afin d'induire des gènes qui stimulent la prolifération cellulaire et la survie. De plus, la production de facteurs de croissance et de cytokines sont capables de conférer un phénotype de cellules souches et d'augmenter le pool de cellules souches (Grivennikov *et al.*, 2010 ; Kundu & Surh., 2012 ; Landskron *et al.*, 2014 ; Tanno & Matsui., 2011).

La principale cytokine pro-inflammatoire décrite est le TNF. La superfamille du TNF (Tumor Necrosis Factor) est composée de 19 ligands et de 29 récepteurs jouant un grand nombre de rôles différents dans le corps. Tous les membres de cette famille présentent une activité pro-inflammatoire, notamment par l'activation du facteur de transcription NFκB, certains ont également un rôle dans la différenciation. La plupart d'entre eux possèdent des effets à la fois bénéfiques et potentiellement dangereux. Le TNF est, par exemple, lié à la prolifération et la différenciation des cellules B en condition physiologique, mais il est également impliqué dans une grande variété de maladies, dont les cancers, les troubles cardiovasculaires, neurologiques, pulmonaires, métaboliques et auto-immuns (Aggarwal *et al.*, 2012).

Les membres de cette famille sont : le TNF (TNFα étant identique au TNFβ), lymphotoxine-B, CD40L, FasL, CD30L, 4-1BBL, CD27L, OX40L, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), LIGHT, RANKL (receptor activator of NFκB ligand), TWEAK (TNF-related weak inducer of apoptosis), APRIL (a proliferation-inducing ligand), BAFF (B-cell activating factor), VEGI (vascular endothelial cell-growth inhibitor), EDA-A1 (ectodysplasin A), EDA-A2 et GITRL. Ces différents ligands et leurs récepteurs sont exprimés par diverses cellules du système immunitaire. Cependant, d'autres types cellulaires les expriment également, en conditions physiologiques et pathologiques (Aggarwal *et al.*, 2012).

Le terme « tumor necrotizing factor » fut pour la première fois utilisé en 1962 pour l'activité de régression tumorale de sarcome 37 induite par le sérum de souris traitées à l'aide d'un polysaccharide *Serratia marcescens*. Cette activité fut attribuée au TNF en 1975 par Carswell (Carswell *et al.*, 1975).

Les récepteurs de la superfamille du TNF sont classés en deux catégories : ceux possédant un domaine de mort intracellulaire et ceux qui ne le possèdent pas. Ce domaine de mort, composé de 45 acides aminés, est nécessaire au recrutement d'autres protéines permettant d'induire la mort cellulaire. Six récepteurs possèdent ce domaine de mort. Il s'agit de TNFR1 (ou DR1), Fas (ou DR2), DR3 (récepteur de VEGI), DR4 (récepteur de TRAIL), DR5 (récepteur de TRAIL) et DR6. Les récepteurs possédant le domaine de mort sont exprimés par la plupart des cellules, ceux ne le possédant pas sont exprimés par un nombre restreint de types cellulaires. En ce qui concerne les deux récepteurs du TNF, TNFR1, qui possède

un domaine de mort, est exprimé par tous les types cellulaires tandis que l'expression de TNFR2, sans domaine de mort, est limitée aux cellules immunitaires, endothéliales et nerveuses (Aggarwal *et al.*, 2012 ; Nenu *et al.*, 2015).

Le TNF peut se présenter sous deux formes, l'une soluble, l'autre transmembranaire. Une fois lié à son récepteur, le TNF peut induire cinq signaux différents dont l'activation de : NFκB, des voies apoptotiques, ERK, p38 MAPK et JNK (Aggarwal *et al.*, 2012).

La liaison du TNF à son récepteur TNFR1 induit le recrutement de la protéine TRADD (TNFR-associated death domain) grâce à son domaine de mort (figure 25). La protéine TRADD recrute ensuite la protéine FADD (Fas-associated protein with death domain) ce qui conduit à une activation séquentielle des caspases 8 et 3 et à l'apoptose. Le TNF peut également activer les mitochondries afin de libérer des ROS, le cytochrome C et Bax, conduisant à l'activation des caspases 9 et 3 et à l'apoptose. De manière paradoxale, le TNF peut activer NFκB qui, à son tour, régule l'expression de protéines associées à la survie cellulaire et à la prolifération. L'activation de NFκB par le TNF est permise par le recrutement de TNFR1, TRADD, TRAF2/TRAF5 (TNFR-associated factor 2/5), RIP (receptor interacting protein), TAK1 (TGF-β-activated kinase 1), IKK (IKB kinase), la phosphorylation, l'ubiquitination et la dégradation d'IκBα (inhibitor of nuclear factor-κBα) et enfin, la translocation nucléaire de NFκB (p50 et p65). Les effets pro-inflammatoires du TNF sont médiés via des protéines régulées par NFκB telles que : l'IL-6, l'IL-8, l'IL-18, des chimiokines ou la cyclooxygénase-2, tous des médiateurs de l'inflammation. Le TNF peut également induire sa propre expression grâce à l'activation de NFκB. Il peut aussi induire la prolifération cellulaire via l'activation d'autres facteurs de transcription tels qu'AP-1, grâce au recrutement de TNFR1, TRADD, TRAF2, MEKK1 (MAP/ERK kinase kinase 1), MKK7 (MAP kinase kinase 7) et JNK. La voie p38 MAPK peut aussi être activée par le TNF via TRADD, TRAF2 et MKK3. La liaison du TNF à son récepteur TNFR2 permet d'activer les voies NFκB et MAPK via la liaison directe de TNFR2 à TRAF2 (Aggarwal *et al.*, 2012 ; Nenu *et al.*, 2015).

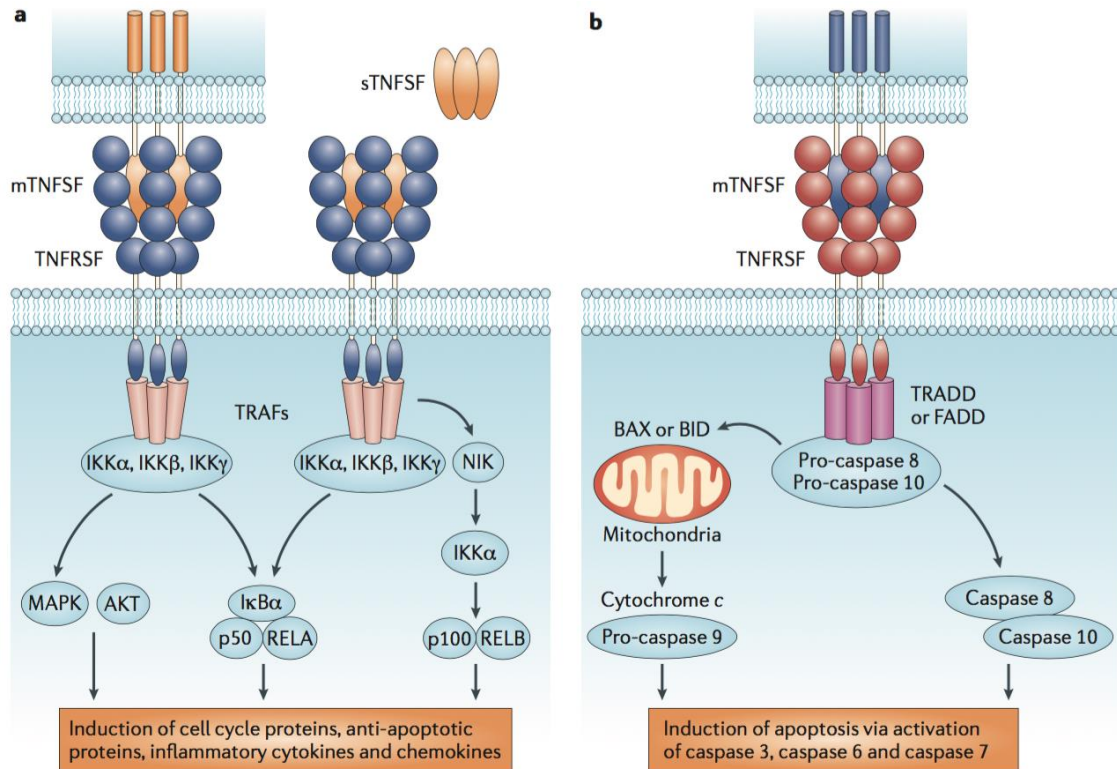


Figure 25 : Activités induites par les membres de la superfamille du TNF : pro-inflammatoires et mort cellulaire (Croft *et al.*, 2013).

Les membres de la superfamille du TNF (TNFSF), sous formes soluble ou transmembranaire, se fixent sur leurs récepteurs (TNFRSF) et induisent des signaux de survie et d'inflammation (a) ou l'apoptose (b).

Bien qu'il possède une activité anti-tumorale, son activité pro-inflammatoire puissante empêche son administration systémique à des patients atteints de cancer. Il peut toutefois être utilisé en clinique. Il est notamment utilisé dans le traitement de sarcomes des tissus mous et de mélanomes des membres, à l'aide d'une technique appelée la perfusion de membre isolé. Cette technique consiste à dériver chirurgicalement la circulation sanguine d'un membre ce qui permet d'interrompre tous les échanges entre la circulation sanguine du membre et le reste du corps. De fortes doses de TNF et de chimiothérapie sont ensuite administrées dans la circulation du membre isolé, évitant ainsi les effets secondaires (Aggarwal *et al.*, 2012 ; Deroose *et al.*, 2011 ; Hoekstra *et al.*, 2014).

L'implication de la superfamille du TNF dans diverses pathologies humaines fait d'elle une cible pour le développement de nouvelles thérapies. En effet, les anti-TNF constituent l'une des premières thérapies par anticorps monoclonaux ayant montré un réel succès. Plusieurs

antagonistes dirigés contre des membres de la superfamille du TNF ou de ces récepteurs sont à ce jour approuvés par la FDA et d'autres en sont encore aux phases cliniques.

Ces agents, au départ développés pour traiter les maladies inflammatoires de l'intestin, sont maintenant utilisés dans le cas d'arthrite psoriasique, de rectocolite hémorragique, de polyarthrite rhumatoïde, de spondylarthrite ankylosante ou de la maladie de Crohn. Il s'agit de l'Etanercept, une protéine de fusion (récepteur du TNF-p75) soluble, de l'Infliximab, un anticorps anti-TNF chimérique (souris-humain), de l'Adalimumab et du Golimumab, des anticorps monoclonaux anti-TNF humanisés, et du Certolizumab, un fragment Fab pégylé d'un anticorps monoclonal du TNF humanisé. Le ciblage du TNF est un succès considérable dans les maladies auto-immunes induites par l'inflammation (Croft *et al.*, 2013).

Est-ce que le TNF est une cible dans les cancers ? Il semblerait qu'à faible concentration, il présente des effets pro-tumoraux dans des modèles expérimentaux, qui n'ont pas été confirmés chez l'homme, et qu'à forte concentration, il présente une activité anti-tumorale.

Il semblerait que les patients traités à l'aide d'anti-TNF pour une maladie inflammatoire chronique présenteraient un risque plus élevé de développer un cancer. En effet, il a été reporté plusieurs cas de patients atteints d'une maladie inflammatoire chronique traités à l'aide d'anti-TNF et qui ont développé un mélanome. Les méta-analyses réalisées indiquent que cette surincidence reste modeste, mais nécessite un suivi des patients (Croft *et al.*, 2013 ; Piérard-Franchimont *et al.*, 2011 ; Lebrech *et al.*, 2015 ; Kouklakis *et al.*, 2013 ; Fellermann, 2013). Néanmoins, une question se pose : que se passe-t-il dans les cellules tumorales ?

Dans le modèle du cancer du sein, le TNF a pour effet d'activer de nombreuses voies de signalisation (p38, ERK ou NFκB) et de générer des cellules au phénotype CD44+/CD24-, un phénotype associé aux cellules souches dans ce modèle (Bhat-Nakshatri *et al.*, 2010). De plus, les cellules cancéreuses de sein répondent au TNF en induisant des caractéristiques de cellules souches via un mécanisme impliquant la surexpression de SLUG. De même, le traitement des cellules de cancer du sein au TNF augmente leur capacité à former des sphères (Storci *et al.*, 2010).

Dans le cas du mélanome, les cellules cancéreuses expriment une grande variété de cytokines, de chimiokines et de leurs récepteurs dont le niveau d'expression et le rôle changent avec la progression du mélanome. Une étude de Moretti *et al* a démontré que les nevi et mélanomes primaires de moins d'un millimètre d'épaisseur expriment de faibles quantités de TNF, TGF-β, IL-8 et c-kit, tandis que les mélanomes à des stades avancés expriment en très grande quantité : l'IL-1α, l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-8, le TNF, le TGF-β, le GM-CSF,

Introduction

le SCF et leurs récepteurs. De plus, les cellules de mélanomes expriment des récepteurs chimiotactiques tels que : CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR2, CCR7 et CCR9 et sécrètent des chimiokines neutrophiles : CXCL1-3, CCL2, CXCL8 et CCL5. Au sein du microenvironnement tumoral, les cellules de mélanome produisent du TGF- β , du bFGF et du PDGF qui induisent une rapide prolifération des fibroblastes. A leur tour, les fibroblastes produisent une série de facteurs de croissance, tels que l'IGF-1, l'HGF (hepatocyte growth factor), le bFGF et le TGF- β qui favorisent la croissance et la prolifération des cellules de mélanome (Melnikova & Bar-Eli., 2009).

Il serait ainsi intéressant d'étudier le lien entre le TNF et la quiescence des cellules souches au niveau expérimental.

Objectifs de la thèse

L'intérêt du groupe est focalisé sur l'étude des mécanismes moléculaires qui contrôlent la quiescence et l'activation des cellules souches tumorales, et sur les liens existant entre les cellules souches tumorales quiescentes et la dormance tumorale, dans le modèle du mélanome.

L'existence des cellules souches cancéreuses a été mise en évidence dans la plupart des cancers dont le mélanome. Ces cellules présentent une capacité d'autorenouvellement et de production de cellules différenciées, cyclent lentement et sont seules capables de générer des tumeurs. Leur caractérisation repose essentiellement sur l'utilisation de marqueurs phénotypiques dont l'expression est un phénomène dynamique (Boiko *et al.*, 2010 ; Roesch *et al.*, 2010 ; Hoek et Goding, 2010 ; Touil *et al.*, 2013).

Les facteurs impliqués dans le contrôle du passage réversible de l'état quiescent à l'état activé, des cellules souches tumorales cyclant lentement, sont très mal connus, mais appartiendraient au microenvironnement tumoral. En effet, l'inflammation chronique, et en particulier les cytokines inflammatoires et des chimiokines, joue un rôle important dans l'activation des voies de signalisation stimulant les cellules souches cancéreuses, l'initiation et la progression tumorale. Cependant, les mécanismes en cause restent très mal connus. Un acteur très important de l'initiation tumorale est le TNF, une cytokine pro-inflammatoire majeure. Mieux comprendre comment les voies de l'inflammation chronique agissent sur le comportement des cellules souches tumorales est essentiel pour développer de nouvelles stratégies de prévention et de traitement des cancers.

Notre laboratoire a déjà démontré l'existence de cellules souches tumorales dans une lignée de mélanome établie à partir d'une tumeur humaine, et l'exploration des mécanismes impliqués dans le contrôle de leur activation a montré l'implication de la voie PI3K/AKT (Touil *et al.*, 2013). De plus, le groupe a également construit un modèle murin de dormance tumorale du mélanome (Touil *et al.*, in press).

La première partie de mon projet vise donc à étudier les effets du TNF sur la dormance et l'activation des cellules souches tumorales quiescentes dans le mélanome, et cela dans les modèles en trois dimensions des mélanosphères et de la peau humaine reconstruite *in vitro*, plus pertinents, ainsi que les voies de signalisation impliquées dans les effets induits par le TNF. Nous nous sommes également intéressés à l'évaluation des effets des anticancéreux sur les cellules souches cancéreuses quiescentes et activées et les voies de signalisation mises en jeu. Par ailleurs, une étude *in vivo*, qui teste les activités tumorigéniques et métastatiques des différentes sous-populations de cellules de mélanome ainsi que les effets induits par le TNF, a également été mise en place.

Objectifs de la thèse

L'expérience acquise au cours de cette étude m'a permis de participer à d'autres projets de l'équipe visant tous à étudier le contrôle de la quiescence/activation des cellules souches dans le mélanome ainsi que dans d'autres modèles cellulaires, et qui sont abordés dans la deuxième partie de la thèse.

Résultats

**A. Article n°1: Transient TNF regulates the self-renewing capacity
of stem-like label-retaining cells in sphere and skin equivalent
models of melanoma**

(Cell Commun Signal. 2014 Sep 17;12:52)

Il est désormais bien établi que l'inflammation favorise le risque de développer un cancer, dont le mélanome, cependant les mécanismes impliqués ne sont pas connus. Le but de notre étude était d'étudier les effets d'un facteur pro-inflammatoire, le TNF, sur la quiescence des cellules souches de mélanome, responsables du développement tumoral et de la formation de métastases, dans les modèles en trois dimensions des mélanosphères et de la peau humaine reconstruite *in vitro*.

Grâce à l'utilisation d'une protéine de fusion inductible par la tétracycline, l'histone 2B-GFP, permettant de suivre les divisions cellulaires, nous avons mis en évidence la présence de cellules souches de mélanome quiescentes/slow cycling GFP+ dans nos lignées cellulaires de mélanome. Nous avons également déterminé que le TNF, la principale cytokine pro-inflammatoire, augmente le pool de cellules souches de mélanome GFP+ (label retaining cells) dans le modèle des mélanosphères. De plus, ces cellules expriment des marqueurs de cellules souches de mélanome, dont ABCB5 et CD271, ont la capacité de s'autorenouveler mais pas celle de se différencier, comme le montre la diminution de l'expression de Melan-A dans les mélanosphères et la perte de la pigmentation des équivalents de peau. Ces changements perdurent de nombreuses générations après l'exposition au TNF. De manière intéressante, le phénotype indifférencié peut être inversé par l'utilisation d'un inhibiteur de la voie de signalisation PI3K/AKT, le LY294002, qui de plus, entraîne une diminution du compartiment des cellules souches de mélanome. Ces données suggèrent que le TNF maintient les cellules souches de mélanome dans un état primitif et contrôle leur plasticité. Une voie de signalisation responsable de cet effet est la voie PI3K/AKT, qui est impliquée dans la régulation des cellules souches dans de nombreux autres systèmes.

Cette étude nous a ainsi permis de mettre en évidence que le TNF cible le compartiment des cellules souches de mélanome quiescentes/slow cycling et favorise l'augmentation du pool de cellules souches de mélanome via la voie de signalisation PI3K/AKT. Cet effet du TNF est maintenu et transféré aux descendants des cellules souches de mélanome quiescentes/slow cycling, même en l'absence de TNF, suggérant ainsi qu'une exposition transitoire aux facteurs inflammatoires induit des changements cellulaires et moléculaires, aux conséquences fonctionnelles, persistants longtemps après la suppression de l'inflammation.

B. Résultats complémentaires

I. Effets du TNF sur la quiescence/activation des cellules souches de mélanome

Dans le modèle des équivalents de peau, nous avons mis en évidence que les cellules, issues des équivalents de peau reconstitués avec des cellules de mélanome quiescentes (triées H2B-GFP+) et traitées au TNF à 500 ng/mL pendant trois semaines, forment plus de sphères que leurs homologues non prétraités. De plus, cet effet est accentué dans les générations successives de sphères malgré l'absence de TNF dans le milieu de formation des sphères. Un effet que l'on ne retrouve pas avec les cellules cyclantes (triées H2B-GFP-).

Il semblerait que les cellules H2B-GFP+ aient gardé en mémoire l'effet du TNF. Ce phénomène, particulièrement intéressant, nous a évoqué des mécanismes épigénétiques.

Les modifications épigénétiques correspondent à des changements héréditaires dans l'expression de gènes qui n'altèrent pas la séquence d'ADN. Il s'agit de modifications des histones et de méthylation de l'ADN. Des acétylations et déacétylations de résidus lysines spécifiques des histones par des histones acétyl transférases (HDAC) causent, respectivement, une activation et une répression de la transcription de nombreux gènes. D'autres modifications d'histone, telles que la méthylation, la phosphorylation ou la sumoylation peuvent également se produire (Kundu & Surh, 2012 ; Shigdar *et al.*, 2014). Il a récemment été mis en évidence que des changements épigénétiques interviennent dans des pathologies telles que l'asthme (Ooi *et al.*, 2012). En effet, l'expression d'une cytokine, l'IL-13, au niveau des voies aériennes induit des changements dans le profil de méthylation de l'ADN de promoteurs de gènes cibles (Ooi *et al.*, 2012). De telles modifications sont également observées dans une autre maladie chronique, le diabète. En effet, dans cette maladie, une exposition prolongée à de fortes concentrations de glucose modifie l'épigénome. De plus, ces modifications restent stables même en l'absence d'un environnement riche en glucose (Cencioni *et al.*, 2014). Une autre étude récente a montré l'implication des modifications épigénétiques dans l'effet mémoire des cellules musculaires squelettiques après un traitement au TNF. Cet effet du TNF est gardé en mémoire par les cellules pendant 30 doublements de population (Sharples, 2015). Enfin, on observe également une signature épigénétique dans la reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes. En effet, les cellules souches pluripotentes induites gardent en mémoire les caractéristiques épigénétiques de leur tissu d'origine, ce qui peut influencer leur potentiel de différenciation (Rohani *et al.*, 2014). Cela suggère que la transition quiescence/activation et les rapides changements phénotypiques des cellules souches, y

Résultats

compris des cellules souches cancéreuses, associés, en réponse aux signaux du microenvironnement, seraient régulés de manière épigénétique (Crea *et al.*, 2015).

Dans le but d'étudier si des modifications épigénétiques sont induites par le TNF et leur impact sur la régulation des gènes en réponse au TNF, nous avons entamé une collaboration avec une chercheuse expérimentée dans ce domaine, le Dr Audrey Vincent, qui fait partie du centre de recherche JPArc. Nous nous sommes focalisés sur deux marques épigénétiques majeures : la méthylation des promoteurs de l'ADN et la triméthylation des histones. Nous sommes particulièrement intéressés à l'analyse épigénétique des gènes impliqués dans la biologie des cellules souches et la régulation du cycle cellulaire. Cette étude a été effectuée sur les cellules issues de la troisième génération de sphères provenant d'équivalents de peau traitées ou non au TNF pendant trois semaines et reconstitués avec des cellules triées H2B-GFP+ et H2B-GFP-.

Pour cela, nous avons trié des cellules HBL H2B-GFP+ et H2B-GFP- puis reconstitué des équivalents de peau avec et sans TNF dans le milieu de culture. Après trois semaines de traitement, les équivalents de peau ont été dissociés et les cellulesensemencées en condition non adhérente afin de former trois générations successives de mélanosphères, sans aucun traitement. A l'issue de la troisième génération de sphères, soit trois semaines après le dernier traitement au TNF, les sphères ont été fixées à l'aide de formaldéhyde puis conservées à -80°C. Elles ont ensuite subies une étape de sonication avant l'extraction de l'ADN et leur séquençage. La partie expérimentale de l'étude épigénétique et l'analyse des résultats sont fait en collaboration avec le Dr Audrey Vincent.

Nous espérons que l'analyse comparative des cellules témoins et traitées au TNF nous permettra d'identifier des gènes qui sont activés ou réprimés en réponse au TNF. Il est important de comprendre non seulement les mécanismes qui contrôlent la quiescence cellulaire et l'activation, mais également de déterminer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la dormance tumorale et la récurrence de la maladie.

II. Effets du TNF sur la quiescence/activation des cellules souches de mélanome *in vivo*

Afin d'étudier les effets du TNF sur le développement du mélanome, la dissémination des cellules de mélanome et la dormance tumorale, nous avons effectué deux études *in vivo*.

1 – Greffe d'équivalents de peau traités ou non au TNF à des souris immunodéficientes BALB/c-nude

Afin de déterminer si le TNF influe sur la capacité des cellules de mélanome à se disséminer et à former des tumeurs, nous avons reconstitué des équivalents de peau à l'aide de cellules de mélanome HBL que l'on a traitées ou non au TNF à la concentration de 500 ng/mL pendant trois semaines. Ces équivalents ont ensuite été greffés en sous-cutané à des souris immunodéficientes BALB/c-nude afin d'observer l'éventuelle dissémination des cellules de mélanome et la formation de tumeurs, ainsi que les effets du TNF (figure 26).

Les résultats sont en cours d'analyse.



Figure 26 : Greffe d'équivalent de peau à des souris immunodéficientes BALB/c-nude.

Des équivalents de peau ont été greffés à des souris immunodéficientes BALB/c-nude (A), qui se pigmentent au cours du temps (B : 6 jours post greffe et C : 50 jours post greffe).

2 – Injection de cellules de mélanome traitées ou non au TNF à des souris immunodéficientes CB17 SCID

Afin de mettre en évidence les différentes sous-populations de cellules constituant les tumeurs et de déterminer si le TNF a un effet sur le potentiel tumorigène et métastatique et sur la dormance tumorale des cellules de mélanome, nous avons trié des cellules de mélanome, au fort potentiel métastatique, les SK-Mel28, traitées ou non au TNF à la concentration de 500ng/mL pendant sept jours. Ces cellules ont été génétiquement modifiées afin d'exprimer de manière inductible, soit l'H2B-GFP (SK-Mel28 H2B-GFP), soit l'H2B-mCherry (SK-Mel28 H2B-mCherry). Nous avons collecté les sous-populations GFP positives et mCherry positives de cellules souches de mélanome quiescentes ou slow cycling (GFP+ et mCherry+ respectivement) ainsi que les sous-populations GFP négatives et mCherry négatives de cellules d'amplification transitoire, qui ont dilué la GFP ou mCherry plus rapidement que les cellules souches (GFP- et mCherry- respectivement). Nous avons ensuite mixé 100 000 cellules quiescentes GFP+ et 100 000 cellules cyclantes mCherry- (ratio : 1/1) ou l'opposé, 100 000 cellules quiescentes mCherry+ et 100 000 cellules cyclantes GFP-, traitées ou non au TNF à 500ng/mL pendant sept jours. Ces mix de cellules ont ensuite été injectés en sous-cutané à des souris immunodéficientes CB17 SCID.

Chaque souris a donc reçu une injection de cellules quiescentes et cyclantes marquées grâce à des fluorochromes différents (figure 27). Toutes les cellules possèdent le gène de fusion H2B-GFP ou H2B-mCherry, exprimé dans le cas de cellules quiescentes ou inactif dans le cas de cellules cyclantes, qu'il est possible de détecter par QRT-PCR, afin de déterminer de quelles sous-populations de cellules sont constituées les tumeurs et si des cellules quiescentes sont présentes ou non. De plus le traitement des cellules au TNF avant l'injection permettra de déterminer si le TNF a une influence sur la capacité des cellules à induire la formation de tumeur ou à maintenir la quiescence.

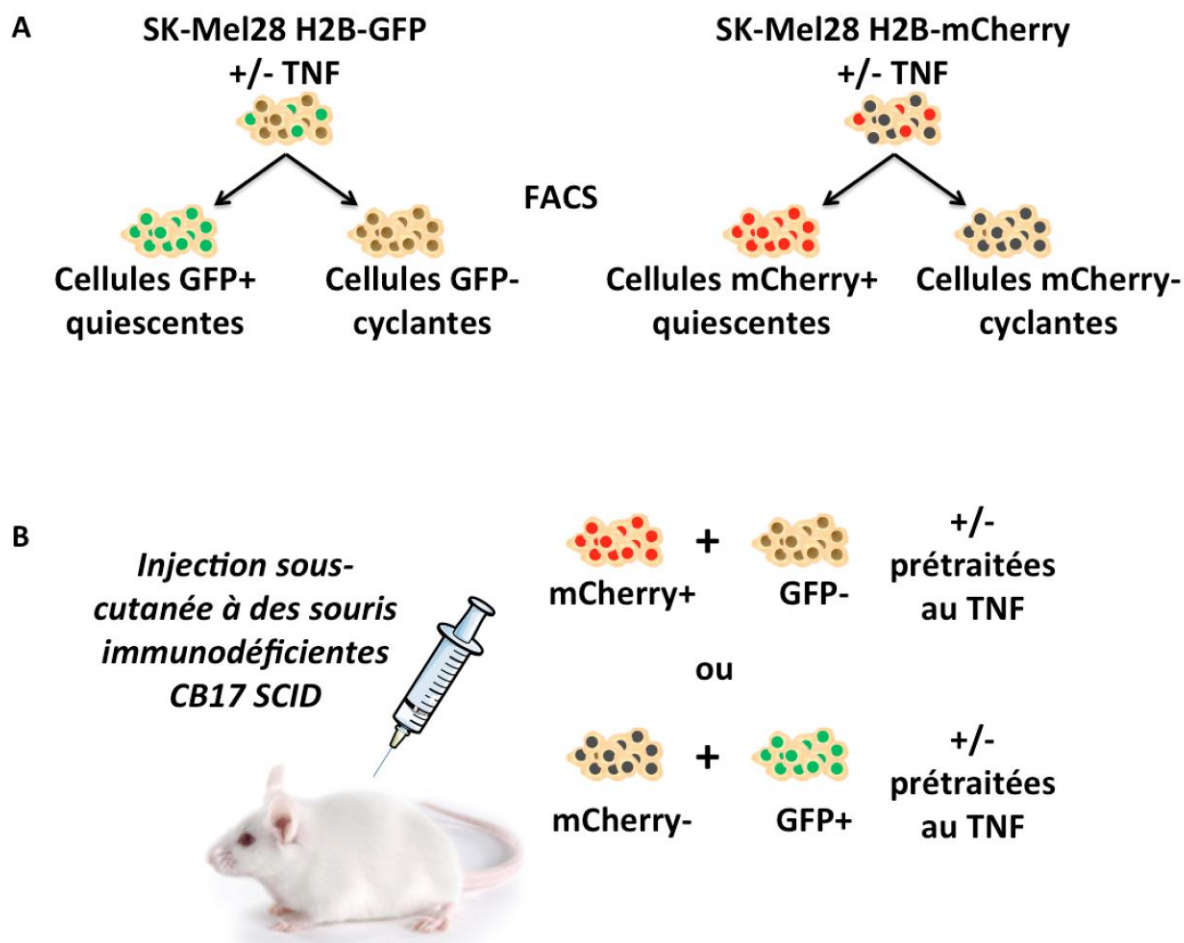


Figure 27 : Injection de cellules de mélanome à des souris immunodéficientes CB17 SCID.

A : tri de cellules de mélanome SK-Mel28 H2B-GFP et SK-Mel 28 H2B-mCherry prétraitées ou non au TNF à 500ng/mL. B : Injection de 200 000 cellules de mélanome à des souris immunodéficientes CB17 SCID (100 000 cellules quiescentes GFP positives + 100 000 cellules cyclantes mCherry négatives prétraitées ou non au TNF à 500ng/mL pendant sept jours ou 100 000 cellules quiescentes mCherry positives + 100 000 cellules cyclantes GFP négatives prétraitées ou non au TNF à 500ng/mL pendant sept jours).

Au vu des résultats obtenus *in vitro*, à savoir, l'augmentation du compartiment des cellules souches et leur activation par le TNF, ainsi que l'augmentation de la population cellulaire GFP+ capable d'entrer en dormance, les résultats attendus seraient une formation de tumeur plus rapide dans les souris ayant reçu une injection de cellules traitées au TNF.

A ce jour, l'étude est toujours en cours, aucune souris n'ayant développé de tumeur, peut-être à cause du contexte *in vivo* ou l'entrée en dormance des cellules GFP positives ou mCherry positives.

III. Effets des anticancéreux sur l'induction des cellules souches et de la quiescence

Un grand nombre de données suggèrent qu'une sous-population de cellules cancéreuses est capable d'entrer en quiescence en réponse à une thérapie anticancéreuse (Cheung & Rando., 2013). A l'état quiescent, elles échappent au système immunitaire et sont résistantes aux drogues conventionnelles qui ciblent les cellules cyclantes et sont inefficaces pour éradiquer les cellules souches cancéreuses quiescentes. Une nouvelle stratégie thérapeutique a été envisagée afin de cibler sélectivement les cellules souches cancéreuses (Holderfield *et al.*, 2014 ; Menzies & Long, 2014) ou les cellules présentant une mutation d'un gène provoquant une prolifération anormale des cellules tumorales.

Comment fonctionnent les anticancéreux ? Induisent-ils un enrichissement en cellules souches ? Est-ce que les voies de signalisation induites par les thérapies anticancéreuses sont également impliquées dans le contrôle de la quiescence cellulaire ? Nous avons récemment montré, au sein du laboratoire, qu'un agent anticancéreux, le 5FU (5-fluorouracil), permet d'augmenter le compartiment des cellules souches et d'induire la quiescence des cellules tumorales coliques (Touil *et al.*, 2014). En est-il de même dans le mélanome ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé le PLX4032 (vemurafenib) qui est la première thérapie ciblée du mélanome utilisée dans le cas de cellules mutées BRAF^{V600E}. La mutation BRAF^{V600E} active constitutivement la voie de prolifération dépendante de MAPK, et le PLX4032 inhibe spécifiquement cette voie en se liant à la protéine mutée BRAF^{V600E} (Davey *et al.*, 2016 ; Foletto & Haas, 2014).

1 - Effet du PLX4032 sur la formation de mélanosphères

Notre objectif est de déterminer si l'inhibition de BRAF^{V600E} affecte le compartiment des cellules souches, défini par leur capacité à former des sphères (mimant l'organisation des tumeurs). Afin d'étudier l'effet du PLX4032 sur la capacité des cellules à former des mélanosphères, les cellules SK-Mel28 et A375, toutes deux mutées BRAF^{V600E}, ont été traitées au PLX4032 à la concentration de 5µM pendant la formation des sphères. Sept jours après l'ensemencement, les sphères traitées ou non au PLX4032 ont été dénombrées pour les deux lignées cellulaires. Les résultats sont présentés en figure 28.

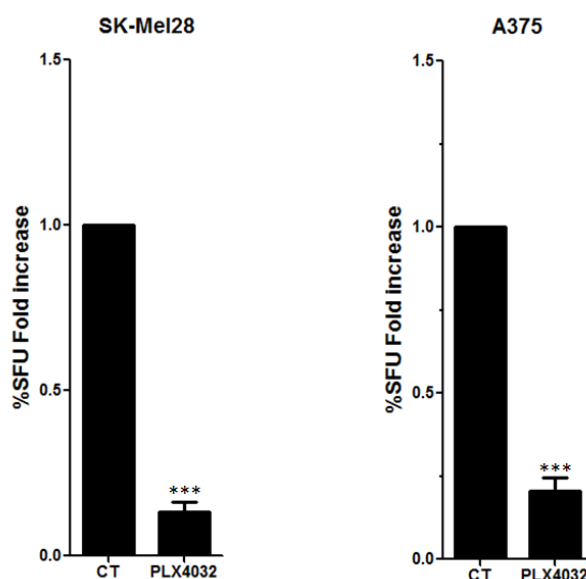


Figure 28 : Graphique représentant le pourcentage d'unités de sphères formées lorsque les cellules (SK-Mel28 à gauche et A375 à droite) sont traitées au PLX4032 à une concentration de 5 μ M, en ratio par rapport aux cellules témoins (non traitées). Les mélanosphères sont dénombrées 7 jours après l'ensemencement des cellules en plaques polyHEMA (non adhérentes) à la densité clonale de 4 000 cellules par puits. Les données représentent les résultats combinés de trois expériences indépendantes d'au moins trois réplicats. %SFU = Sphere Forming Unit (nombre de sphères / nombre de cellules ensemencées x 100). ***p<0,001.

Nous avons observé une diminution du nombre de sphères formées en présence de PLX4032 pour les deux lignées de mélanome SK-Mel28 et A375.

Ce résultat suggère que le PLX4032 diminue le compartiment cellulaire capable de s'autorenouveler, soit en éliminant les cellules souches cancéreuses, soit en induisant leur quiescence.

2 - Effet du PLX4032 sur le pool de cellules H2B-GFP positives

Nous avons développé un système d'expression de l'Histone 2B-GFP, inductible par la tétracycline, qui nous permet de détecter les cellules souches quiescentes/slow cycling. Afin de déterminer l'effet du PLX4032 sur les cellules quiescentes ou qui cyclent lentement dans le modèle des mélanosphères, nous avons induit l'expression de l'H2B-GFP puis ensemencé les cellules en condition non adhérente en présence ou non de PLX4032 dans le

Résultats

milieu de formation des sphères. Après sept jours, les sphères ont été récupérées, dissociées grâce à de la trypsine, et l'analyse du pourcentage de cellules H2B-GFP+ a été réalisée en cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en figure 29.

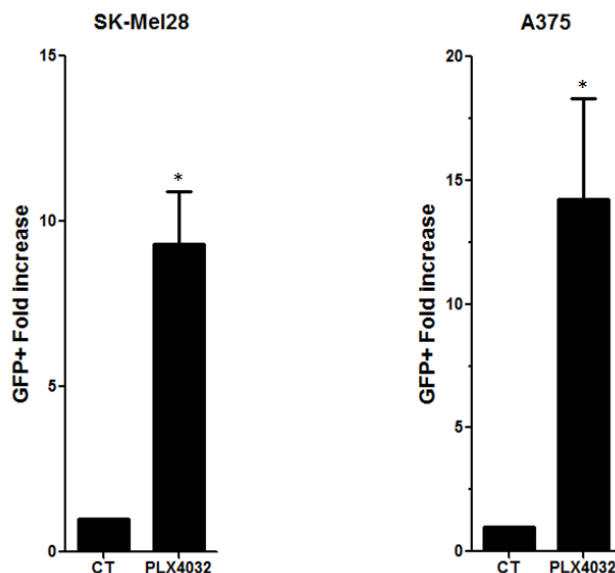


Figure 29 : Graphiques présentant le pourcentage de cellules H2B-GFP positives au sein des mélanosphères (SK-Mel28 à gauche et A375 à droite), traitées ou non au PLX4032 à 5µM, en ratio par rapport aux cellules non traitées (CT), 7 jours après l'induction de l'expression de l'H2B-GFP à la tétracycline et l'ensemencement des cellules en plaques polyHEMA (non adhérentes) à la densité clonale de 4 000 cellules par puits. Les cellules, issues des mélanosphères, ont été analysées en cytométrie en flux. Les données représentent les résultats combinés de trois expériences indépendantes. *p<0,05.

Nous avons observé que le PLX4032 augmente le pourcentage de cellules H2B-GFP+ au sein des mélanosphères, pour les deux lignées cellulaires de mélanome.

Ces résultats suggèrent que le PLX4032 n'élimine pas les cellules souches capables de former des sphères mais induit leur quiescence. Ainsi le PLX4032 augmente le pool de Label Retaining Cells (LRC).

3 – Effet du PLX4032 sur le statut prolifératif des cellules de mélanome

Une propriété importante des cellules souches est leur capacité à entrer, de manière réversible, en quiescence (phase G0 du cycle cellulaire). L'augmentation du pool de cellules GFP+, en présence de PLX4032, pourrait être causée par l'arrêt du cycle cellulaire, des

Résultats

cellules souches en division en phase G0. Nous avons donc réalisé une analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la phase G0. Les cellules en SubG1 ont été exclues de l'analyse. Les résultats sont présentés en figure 30.

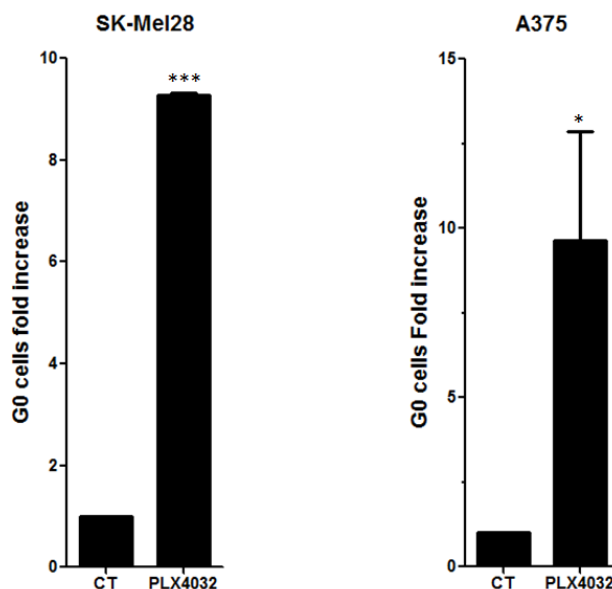


Figure 30 : Graphiques présentant le pourcentage de cellules en phase G0 du cycle cellulaire pour deux lignées de mélanome (SK-Mel28 à gauche et A375 à droite), traitées ou non au PLX4032 à 5 μ M pendant 48 heures en culture en monocouche, en ratio par rapport aux cellules non traitées (CT). Les cellules ont été analysées au cytomètre grâce à un double marquage à la pyronine Y (1 μ g/mL) et au Hoechst 33342 (7 μ g/mL). Les données représentent les résultats combinés de trois expériences indépendantes. ***<0,001 ; *p<0,05.

On observe une augmentation du nombre de cellules en phase G0 du cycle cellulaire en présence de PLX4032 pour les deux lignées cellulaires de mélanome. Ce qui suggère que le PLX4032 favorise l'entrée des cellules souches en division en phase de quiescence (G0).

Ces résultats montrent que le PLX4032 augmente le compartiment des cellules quiescentes de mélanome.

4 - Effet du PLX4032 sur l'expression d'un marqueur de cellules souches de mélanome

La rétention d'un colorant indique que les cellules ne prolifèrent pas, soit parce qu'elles sont mortes, sénéscentes ou quiescentes. La quiescence réversible permet de distinguer les cellules souches des cellules mortes ou sénéscentes. Une autre possibilité permettant d'identifier les cellules souches est d'étudier leur phénotype, en analysant l'expression de marqueurs de surface décrit pour les cellules souches. Nous avons procédé à une analyse de l'expression d'un marqueur de cellules souches de mélanome, et cela, dans le modèle des mélanosphères. Pour cela, nous avons induit l'expression de l'H2B-GFP puis formé des mélanosphères avec ou sans PLX4032 dans le milieu de formation des sphères. Le profil d'expression d'ABCB5, une pompe membranaire permettant l'efflux de nombreux composés, a ensuite été étudié en cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont résumés en figure 31.

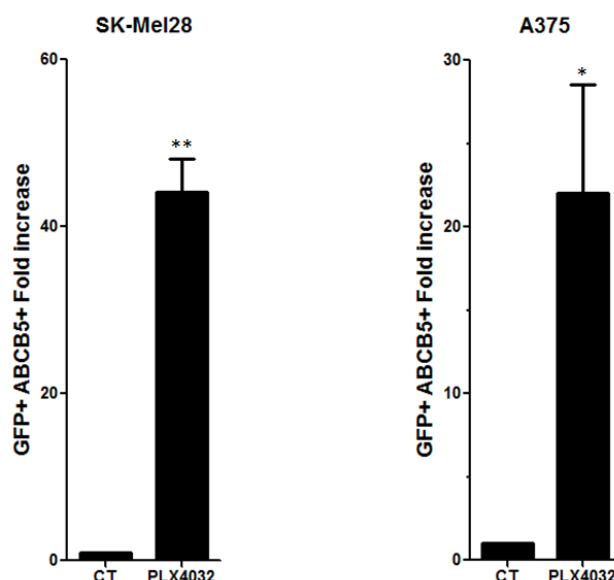


Figure 31 : Graphiques présentant le pourcentage d'expression d'ABCB5 par les cellules H2B-GFP positives au sein des mélanosphères (SK-Mel28 à gauche et A375 à droite), traitées ou non au PLX4032 à 5 μ M, en ratio par rapport aux cellules non traitées (CT), 7 jours après l'induction de l'expression de l'H2B-GFP à la tétracycline et l'ensemencement des cellules en plaques polyHEMA (non adhérentes) à la densité clonale de 4 000 cellules par puits. Les cellules, issues des mélanosphères, ont été analysées en cytométrie en flux. Les données représentent les résultats combinés de trois expériences indépendantes. **<0,01 ; *p<0,05.

Nous avons observé une augmentation de l'expression d'ABCB5 en présence de PLX4032 pour les deux lignées cellulaires de mélanome.

Ces résultats montrent que le PLX4032 augmente le compartiment des cellules exprimant un marqueur de cellules souches de mélanome.

5 – Effets du PLX4032: quelles sont les voies de signalisation impliquées ?

Les données précédentes indiquent que le PLX4032, qui élimine les cellules d'amplification transitoire en division, provoque l'entrée des cellules souches de mélanome cyclantes en quiescence, une phase de protection, ce qui suggère que ces mécanismes seraient responsables de la résistance des cellules à la drogue observée en clinique. Il est donc important de déterminer les mécanismes moléculaires responsables de la quiescence induite par le PLX4032. Etant donné que le processus de phosphorylation est un important indicateur de l'activité des protéines, nous avons effectué une analyse comparative de la phosphorylation de protéines régulatrices en utilisant des lysats de cellules de mélanome traitées ou non au PLX4032. Les changements du statut de phosphorylation des protéines régulatrices nous permettraient d'identifier les voies de signalisation contrôlées par ces protéines et ainsi les mécanismes moléculaires responsables de la quiescence induite par le PLX4032.

Afin de déterminer les voies de signalisation impliquées dans les effets du PLX4032, nous avons étudié, à l'aide d'un phospho Array, la phosphorylation d'un grand nombre de protéines.

Cette étude a été réalisée sur les deux lignées cellulaires de mélanome, SK-Mel28 et A375, traitées ou non au PLX4032 à 5 μ M pendant 48 heures en culture en monocouche. Les résultats significatifs sont présentés en figure 32.

Résultats

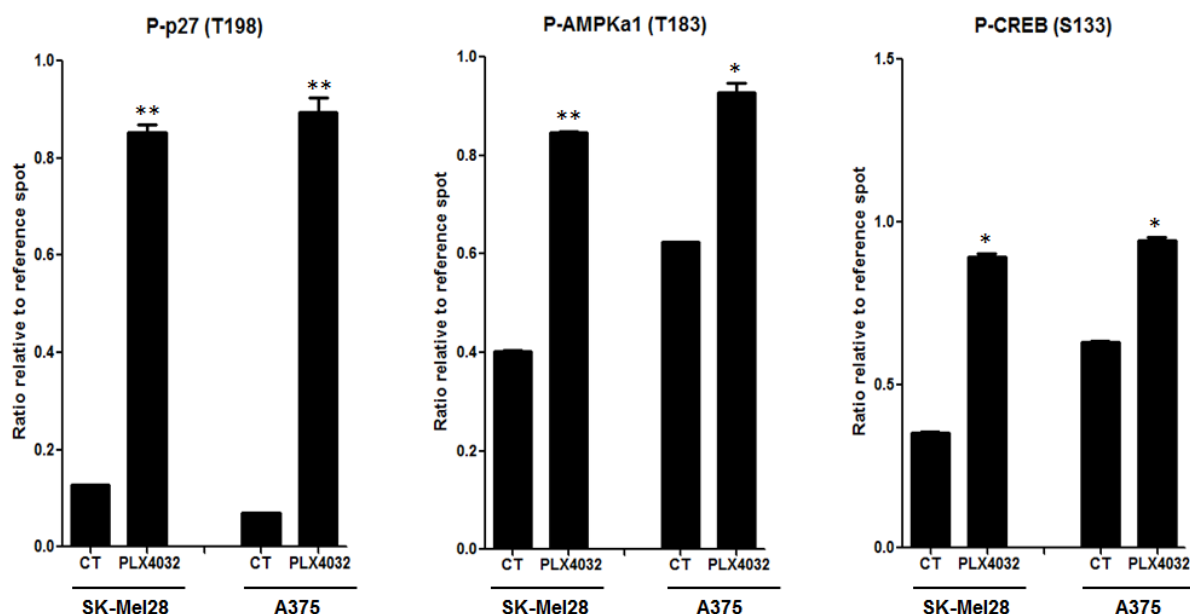


Figure 32 : Profils de phosphorylation de protéines quantifiés par rapport au spot de référence du phospho array et réalisé sur des cellules, SK-Mel28 et A375, traitées ou non au PLX4032 à 5μM pendant 48 heures en culture en monocouche. Les données représentent les résultats combinés de deux expériences indépendantes. **<0,01 ; *p<0,05.

Nous avons observé une augmentation de la phosphorylation, et donc une activation, des protéines p27 (un inhibiteur du cycle cellulaire), AMPK (une protéine impliquée dans la régulation énergétique) et CREB (un facteur de transcription) en présence de PLX4032.

Par la suite, nous avons voulu confirmer les résultats obtenus avec le phospho array. Pour cela, nous avons traité les lignées de mélanome SK-Mel28 et A375 au PLX4032 à 5μM pendant 48 heures et étudié le profil d'expression de protéines sélectionnées par western blot.

Les profils d'expression : des formes phosphorylées des protéines p27, AMPK, CREB et FOXO3A ont ainsi été étudiés au niveau protéique, tout comme le profil d'expression de deux protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire : les Cyclines D1 et D2. Les résultats sont présentés en figures 33 et 34.

Résultats

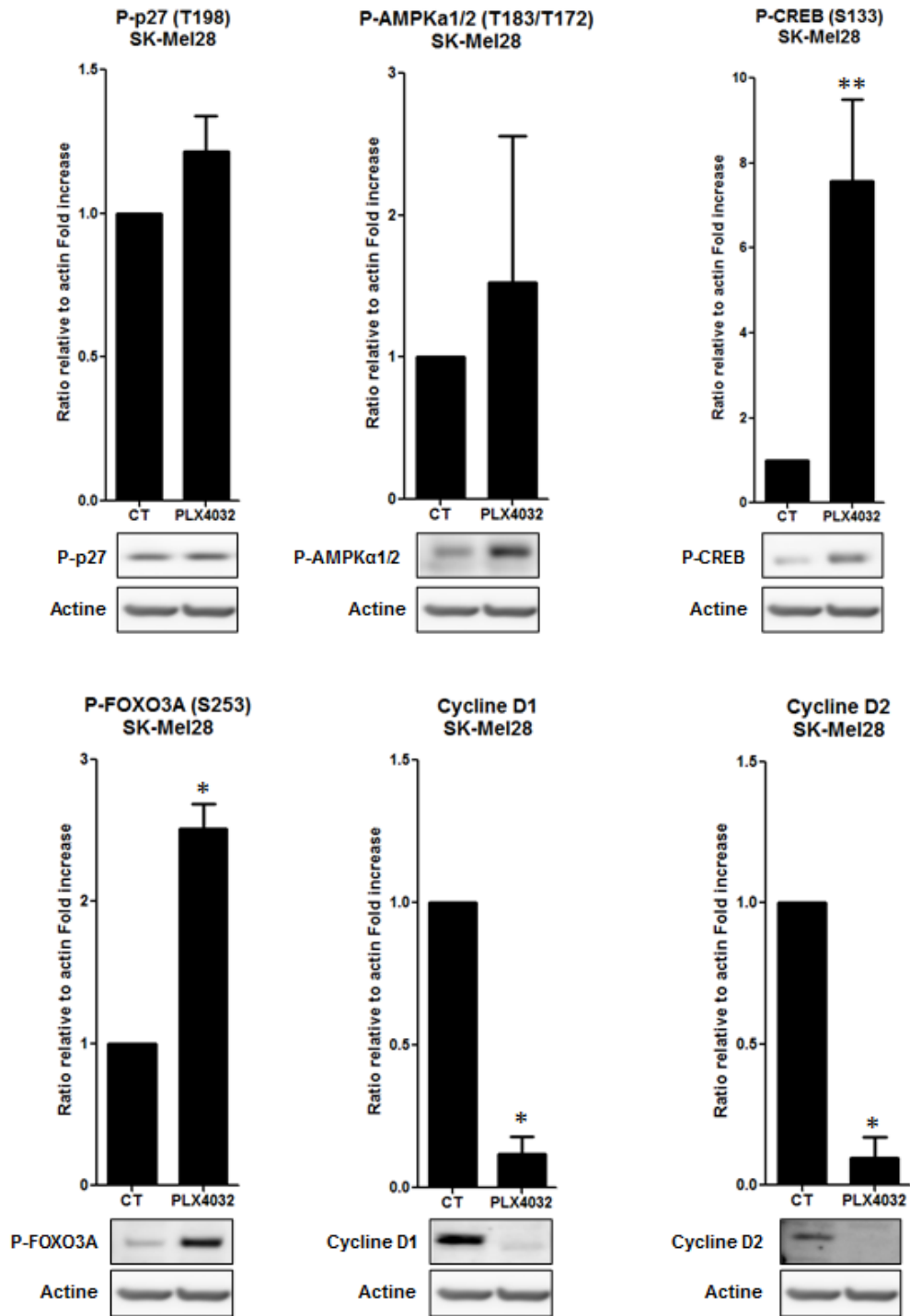


Figure 33 : Profils d'expression de gènes. Images des films des Western blot et leur quantification par rapport à l'actine. Les Western blot ont été réalisés sur des cellules SK-Mel28 traitées ou non au PLX4032 (5μM) pendant 48 heures. Les données représentent les résultats combinés de deux expériences indépendantes. **<0,01 ; *p<0,05.

Résultats

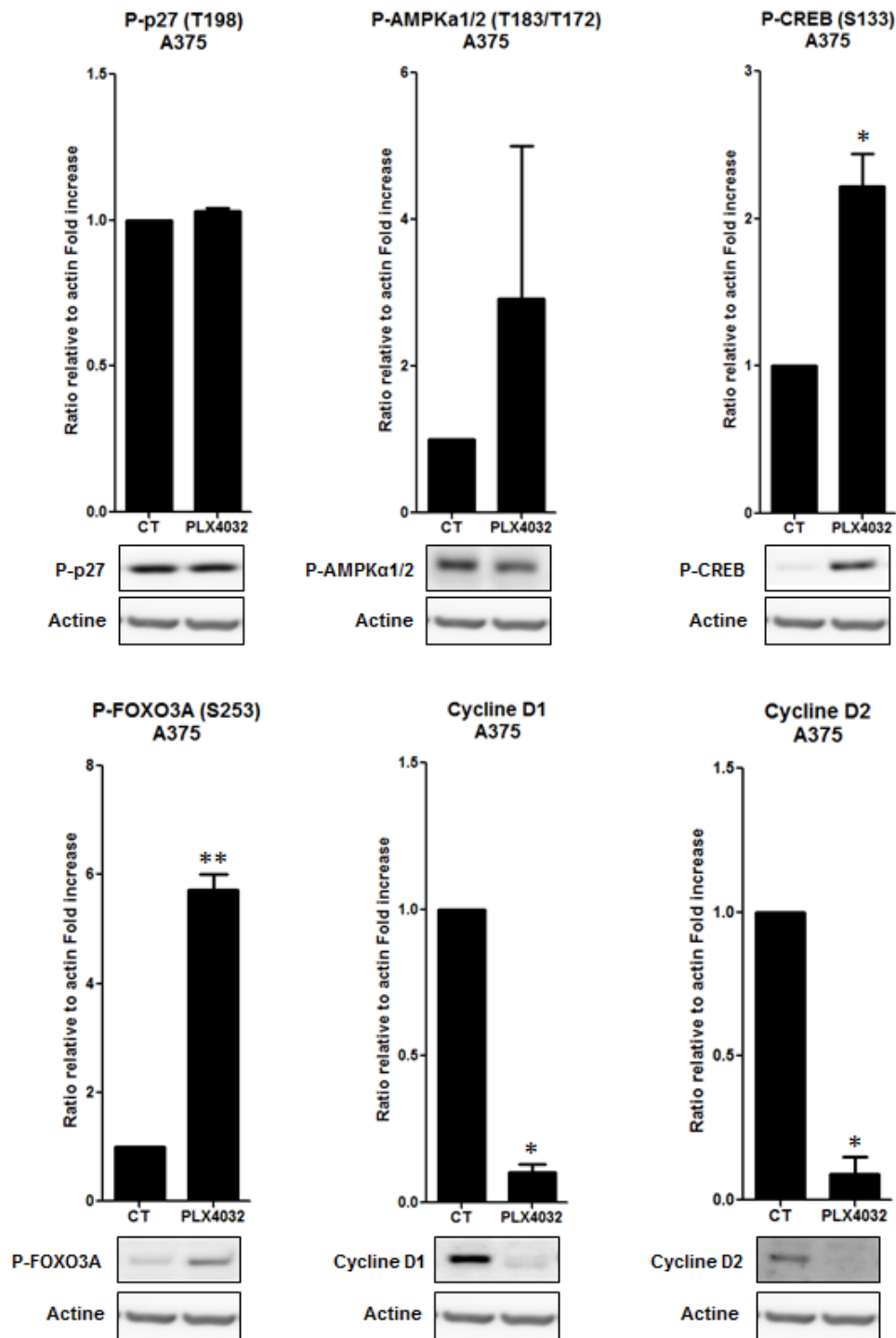


Figure 34 : Profils d'expression de gènes. Images des films des Western blot et leur quantification par rapport à l'actine. Les Western blot ont été réalisés sur des cellules A375 traitées ou non au PLX4032 (5μM) pendant 48 heures. Les données représentent les résultats combinés de deux expériences indépendantes. **<0,01 ; *p<0,05.

Ces résultats préliminaires montrent un effet non cohérent du PLX4032 sur la phosphorylation de p27 et d'AMPK dans les deux lignées cellulaires, probablement parce que l'activité de ces deux protéines dépend des conditions de culture cellulaire. D'autres

études sont nécessaires afin d'établir des conditions de culture pertinentes. En revanche, le PLX4032 provoque une augmentation de la phosphorylation de CREB (responsable de la survie et de la prolifération) et de FOXO3A (qui contrôle la quiescence cellulaire) ainsi qu'une diminution de l'expression des cyclines D1 et D2 (toutes deux impliquées dans la régulation de la progression du cycle cellulaire), et cela, dans les deux lignées de mélanome.

Ces résultats montrent que le PLX4032 diminue l'expression de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et stimule l'activation de protéines régulant la quiescence des cellules souches.

Nos données sont cohérentes avec le fait que le stress, induit par le PLX4032, active AMPK et ces cibles en aval, TSC1/2, qui inhibe mTORC1 et, en conséquence, les cyclines D1 et D2, et provoque ainsi l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation de mTORC2 et AKT, comme en témoigne la surexpression de ces effecteurs en aval : P-FOXO3A, P-CREB et p27KIP1. Cette hypothèse doit être confirmée expérimentalement. Il serait particulièrement intéressant de déterminer si TSC1/2 joue, en effet, un rôle dans le contrôle de la transition de la phase G1 à la phase G0, induite par le PLX4032, des cellules souches de mélanome. Si cette hypothèse est exacte, il pourrait être un régulateur potentiel de la transition quiescence/activation.

IV. Effets de l'association de l'inflammation et des anticancéreux sur l'induction des cellules souches et de la quiescence

Comment relier la résistance des cellules cancéreuses et la dormance cellulaire ? Nos résultats montrent que le TNF freine la prolifération des cellules souches de mélanome cyclantes mais active les cellules souches de mélanome quiescentes par la voie PI3K/AKT, via l'inhibition d'un facteur qui maintient la quiescence, FOXO3A (Touil *et al.*, 2013). Le TNF peut-il abolir les effets du PLX4032 et activer les cellules souches quiescentes ?

Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé le TNF, principale cytokine pro-inflammatoire, en association avec le PLX4032, première thérapie ciblée du mélanome utilisée dans le cas de cellules mutées BRAF^{V600E}, sur deux lignées de mélanome mutées pour le gène BRAF : SK-Mel28 et A375.

1 – Effet de l'association du TNF et du PLX4032 sur le statut prolifératif des cellules de mélanome

Afin d'étudier les effets du TNF et du PLX4032 sur la prolifération cellulaire, nous avons réalisé une analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la phase G0. Les résultats sont présentés en figure 35.

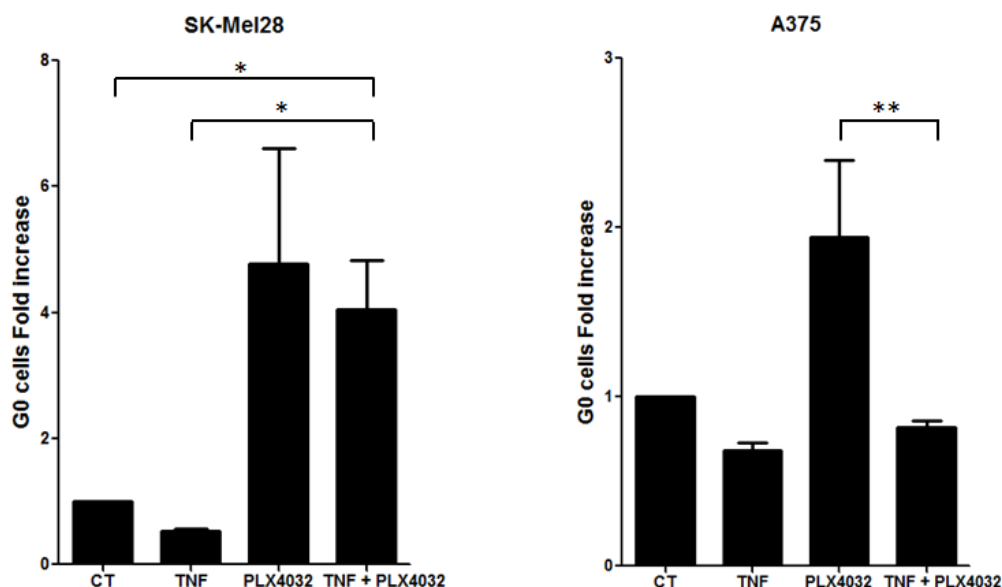


Figure 35 : Graphiques présentant le pourcentage de cellules en phase G0 du cycle cellulaire pour deux lignées de mélanome (SK-Mel28 à gauche et A375 à droite), traitées ou non au TNF à 500ng/mL et/ou au PLX4032 à 5µM pendant 48 heures, en ratio par rapport

aux cellules non traitées (CT). Les cellules ont été analysées au cytomètre grâce à un double marquage à la Pyronine Y (1µg/mL) et au Hoechst 33342 (7µg/mL). Les données représentent les résultats combinés de deux expériences indépendantes. **<0,01 ; *p<0,05.

On observe une diminution du pourcentage de cellules en phase G0 en présence de TNF seul pour les deux lignées. En revanche, le pourcentage de cellules en phase G0 augmente de façon significative en présence de PLX4032 seul, et diminue, légèrement, en présence de TNF et PLX4032 pour la lignée SK-Mel28, et fortement pour la lignée A375.

Le TNF et le PLX4032 ont des effets opposés sur l'induction du G0. De plus, le TNF semble diminuer l'effet du PLX4032 dans la lignée SK-Mel28 et l'abolir dans la lignée A375. Cela suggère que la quiescence induite par le PLX4032 est régulée au moins partiellement par des voies de signalisation dépendantes du TNF et que les facteurs inflammatoires pourraient activer les cellules quiescentes/dormantes.

2 - Effet de l'association du TNF et du PLX4032 sur le pool de cellules H2B-GFP positives

Afin de déterminer l'effet du TNF associé au PLX4032 sur les cellules quiescentes ou qui cyclent lentement dans le modèle de mélanosphères, nous avons induit l'expression de l'H2B-GFP puisensemencé les cellules en condition non adhérente en présence ou non de TNF et/ou de PLX4032 dans le milieu de formation des sphères. Après sept jours, les sphères ont été récupérées, dissociées, et l'analyse du pourcentage de cellules H2B-GFP+ a été réalisée en cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en figure 36.

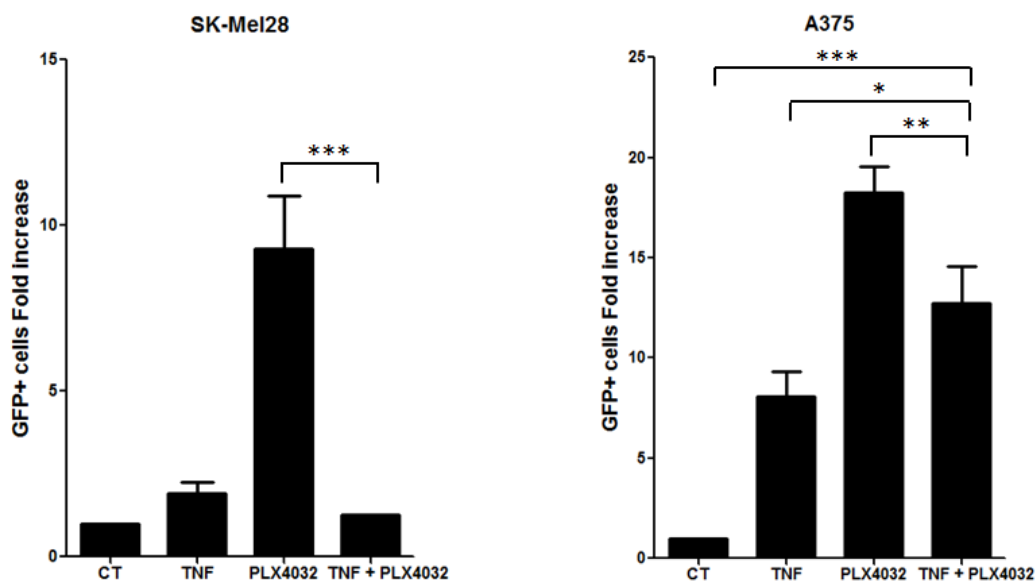


Figure 36 : Graphiques présentant le pourcentage de cellules H2B-GFP positives au sein des mélanosphères (SK-Mel28 à gauche et A375 à droite), traitées ou non au TNF à 500ng/mL et/ou au PLX4032    5  M, en ratio par rapport aux cellules non traitées (CT), 7 jours après l'induction de l'expression de l'H2B-GFP à la tétracycline et l'ensemencement des cellules en plaques polyHEMA (non adhérentes)    la densité clonale de 4 000 cellules par puits. Les cellules, issues des mélanosphères, ont été analysées en cytométrie en flux. Les données représentent les résultats combinés de deux expériences indépendantes. ***<0,001 ; **<0,01 ; *p<0,05.

Nous avons observé que le TNF seul et le PLX4032 seul augmentent le pourcentage de cellules H2B-GFP+ au sein des mélanosphères, pour les deux lignées cellulaires de mélanome. Cette augmentation est plus marquée avec le PLX4032 pour les deux lignées. En présence de TNF et de PLX4032, le pourcentage de cellules H2B-GFP+ est supérieur au contrôle, mais inférieur aux conditions TNF seul et PLX4032 seul pour la lignée SK-Mel28, et, est situé entre les conditions TNF seul et PLX4032 seul pour la lignée A375.

Le TNF et le PLX4032 ont le même effet, à savoir une augmentation du pool de cellules H2B-GFP+. Lorsque ces deux facteurs sont associés, le TNF semble diminuer l'intensité de l'effet du PLX4032 dans la lignée A375 et l'abolit dans la lignée SK-Mel28. Ainsi, le TNF semble être un puissant régulateur de l'augmentation du compartiment des cellules souches de mélanome GFP+, induite par le PLX4032.

3 - Effet de l'association du TNF et du PLX4032 sur l'expression d'un marqueur de cellules souches de mélanome

Nous avons étudié l'expression d'ABCB5, un marqueur de cellules souches de mélanome dans le modèle des mélanosphères.

Pour cela, nous avons induit l'expression de l'H2B-GFP puis formé des mélanosphères avec ou sans TNF et/ou PLX4032 dans le milieu de formation des sphères et l'expression d'ABCB5 a ensuite été étudiée en cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont résumés en figure 37.

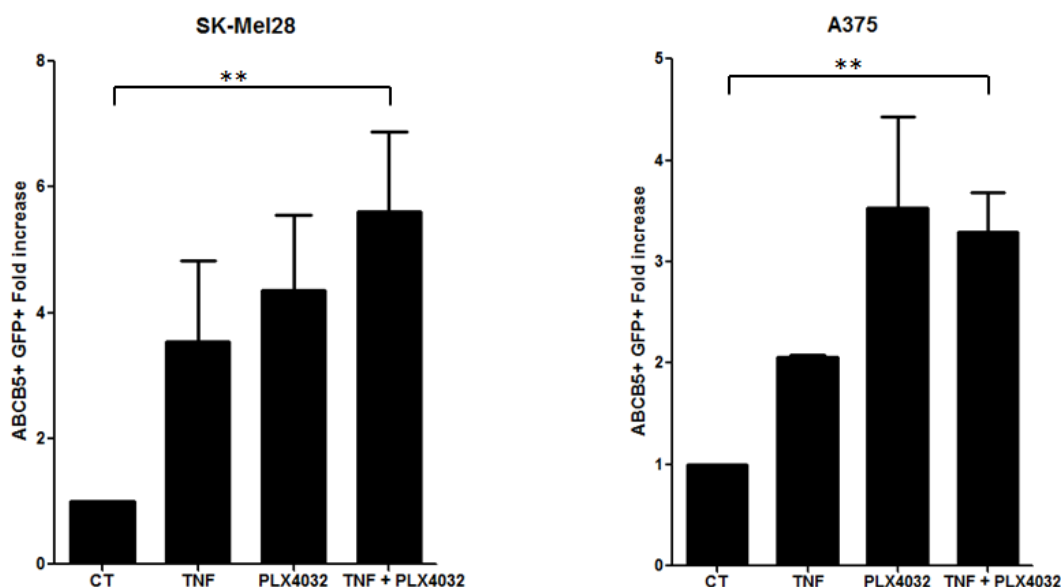


Figure 37 : Graphiques présentant le pourcentage d'expression d'ABCB5 par les cellules H2B-GFP positives au sein des mélanosphères (SK-Mel28 à gauche et A375 à droite), traitées ou non au TNF à 500ng/mL et/ou au PLX4032 à 5μM, en ratio par rapport aux cellules non traitées (CT), 7 jours après l'induction de l'expression de l'H2B-GFP à la tétracycline et l'ensemencement des cellules en plaques polyHEMA (non adhérentes) à la densité clonale de 4 000 cellules par puits. Les cellules, issues des mélanosphères, ont été analysées en cytométrie en flux. Les données représentent les résultats combinés de deux expériences indépendantes. **<0,01.

Nous avons observé une augmentation de l'expression d'ABCB5 en présence de TNF seul ou de PLX4032 seul pour les deux lignées cellulaires de mélanome, un effet plus important avec le PLX4032 seul. L'association de TNF et de PLX4032 augmente significativement le pourcentage de cellules ABCB5+GFP+ pour la lignée SK-Mel28. Ce double traitement a le même effet que le traitement au PLX4032 seul pour la lignée A375.

Le TNF et le PLX4032 ont le même effet, à savoir une augmentation du pool de cellules H2B-GFP+ABCB5+. L'association des deux facteurs amplifie ou maintient cet effet dans les deux lignées de mélanome.

4 - Effet de l'association du TNF et du PLX4032 sur la formation de mélanosphères

Si le TNF active les cellules entrées en G0 suite à un traitement au PLX4032, cela devrait entraîner une activation des cellules quiescentes, et devrait être en conséquence associé à des changements au niveau du compartiment des cellules souches.

Afin d'étudier l'effet de l'association du TNF et du PLX4032 sur la capacité des cellules à former des mélanosphères, les cellules SK-Mel28 et A375, toutes deux mutées BRAF^{V600E}, ont été traitées au TNF à 500ng/mL et/ou au PLX4032 à la concentration de 5µM pendant la formation des sphères. Sept jours après l'ensemencement, les sphères traitées ou non au TNF et/ou au PLX4032 ont été dénombrées pour les deux lignées cellulaires. Les résultats sont présentés en figure 38.

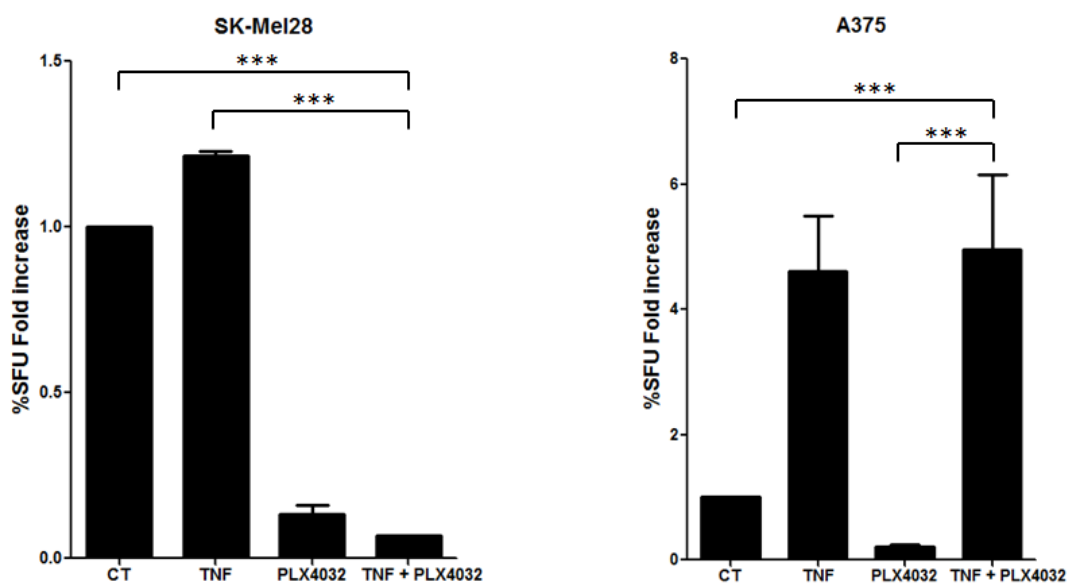


Figure 38: Graphiques représentant le pourcentage d'unités de sphères formées lorsque les cellules (SK-Mel28 à gauche et A375 à droite) sont traitées au TNF à 500ng/mL et/ou au PLX4032 à une concentration de 5µM par rapport aux cellules non traitées (CT). Les mélanosphères sont dénombrées 7 jours après l'ensemencement des cellules en plaques polyHEMA (non adhérentes) à la densité clonale de 4 000 cellules par puits. Les données représentent les résultats combinés de deux expériences indépendantes d'au moins trois

réplicats. %SFU = Sphere Forming Unit (nombre de sphères / nombre de cellulesensemencées x 100). ***<0,001.

Nous avons observé une augmentation du nombre de sphères formées en présence de TNF et une diminution du nombre de sphères formées en présence de PLX4032 pour les deux lignées de mélanome. En présence de TNF et de PLX4032, les cellules forment moins de sphères par rapport aux trois autres conditions, pour la lignée SK-Mel28. En ce qui concerne les cellules A375, en présence de TNF et de PLX4032, le nombre de sphères formées est supérieur aux trois autres conditions.

Cela indique que le TNF abolit l'effet du PLX4032 dans la lignée A375 mais pas dans la lignée SK-Mel28, et suggère que le TNF pourrait activer les cellules souches de mélanome entrées en quiescence suite à un traitement au PLX4032 dans la lignée A375. Cela suggère également que le pool de cellules souches dans la lignée A375 et leur sensibilité au TNF, est supérieure à celle des cellules SK-Mel28.

5 – Effets de l'association du TNF et du PLX4032: quelles sont les voies de signalisation impliquées ?

Les voies de signalisation du TNF et du PLX4032 ont-elles des cibles communes qui pourraient fusionner l'effet des facteurs inflammatoires sur la quiescence cellulaire ?

Afin de déterminer les voies de signalisation impliquées dans les effets du TNF et du PLX4032, nous avons étudié l'expression de protéines.

Les profils d'expression : de la forme phosphorylée de CREB, un facteur de transcription, de la forme phosphorylée de la protéine FOXO3A, impliquée dans le contrôle de la quiescence cellulaire, et des protéines Cycline D1 et D2, impliquées dans le contrôle de la régulation du cycle cellulaire, ont ainsi été étudiés au niveau protéique.

Cette étude a été effectuée sur deux lignées cellulaires de mélanome, SK-Mel28 et A375, traitées ou non au TNF à 500ng/mL et/ou au PLX4032 5µM pendant 48 heures en culture en monocouche. Les résultats sont présentés en figures 39 (pour les SK-Mel28) et 40 (pour les A375).

Résultats

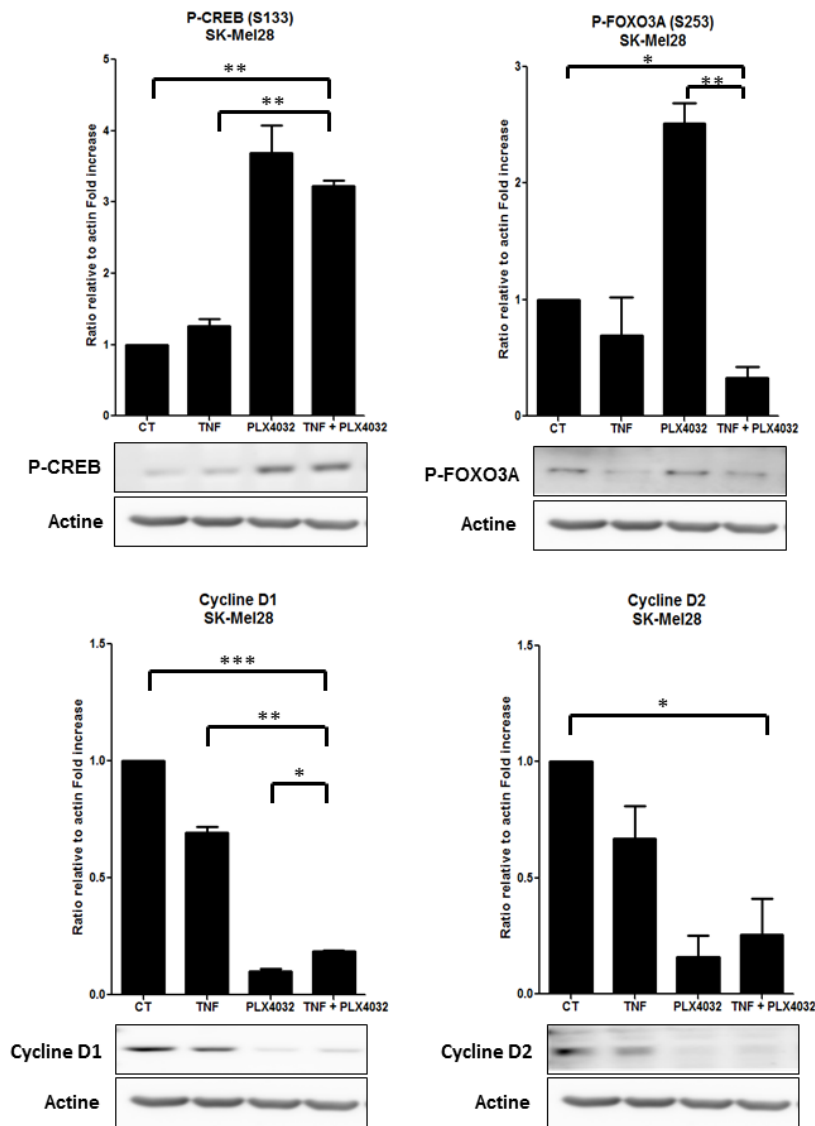


Figure 39 : Profils d'expression de gènes. Images des films des Western blot et leur quantification par rapport à l'actine en ratio par rapport aux cellules non traitées (CT). Les Western blot ont été réalisés sur des cellules SK-Mel28 traitées ou non au TNF à 500ng/mL et/ou au PLX4032 à 5µM pendant 48 heures en culture en monocouche. Les données représentent les résultats combinés de deux expériences indépendantes. ***<0,001 ; **<0,01 ; *p<0,05.

Résultats

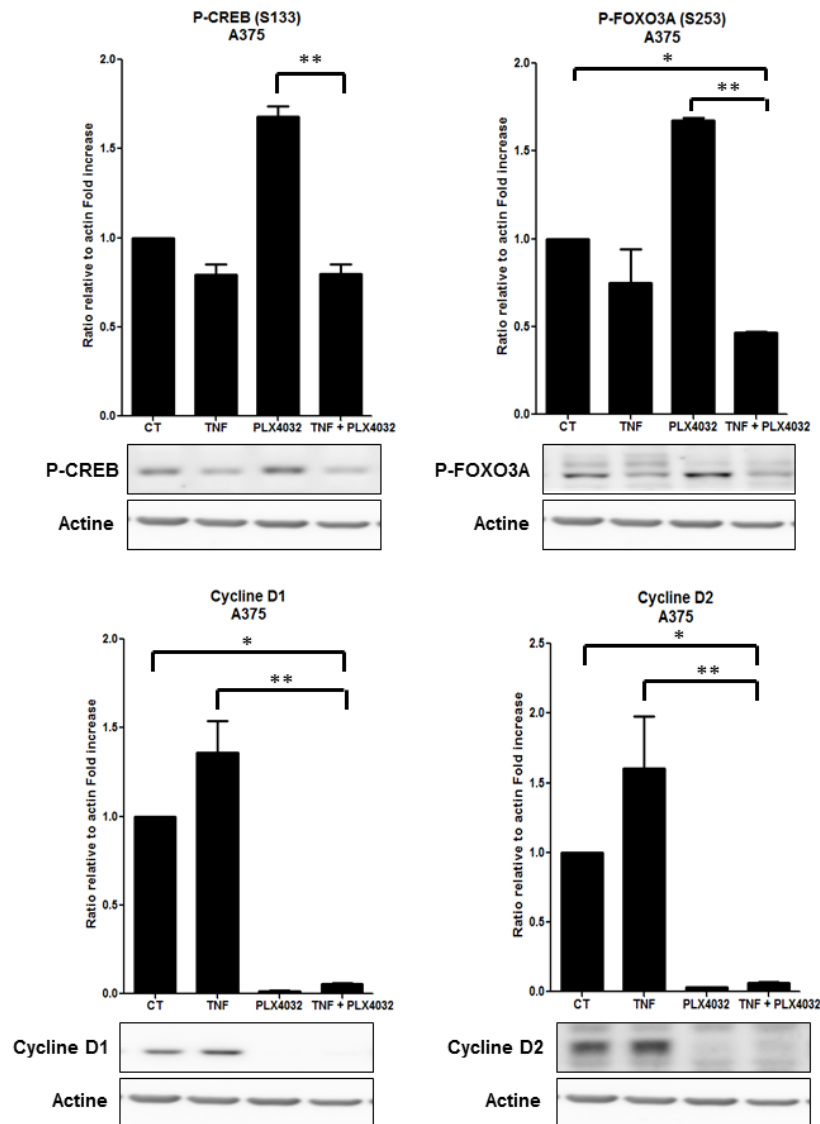


Figure 40 : Profils d'expression de gènes. Images des films des Western blot et leur quantification par rapport à l'actine en ratio par rapport aux cellules non traitées (CT). Les Western blot ont été réalisés sur des cellules A375 traitées ou non au TNF à 500ng/mL et/ou au PLX4032 à 5μM pendant 48 heures en culture en monocouche. Les données représentent les résultats combinés de deux expériences indépendantes. **<0,01 ; *p<0,05.

Dans la lignée SK-Mel28, on observe une augmentation de la forme phosphorylée de CREB quelque soit le traitement. Dans la lignée A375, le PLX4032 induit une augmentation de la forme phosphorylée de CREB, le TNF, seul ou en association avec le PLX4032, a l'effet opposé, ainsi, le TNF semble abolir l'effet du PLX4032. L'expression de la forme phosphorylée de FOXO3A diminue en présence de TNF, augmente en présence de PLX4032, associés, le TNF abolit l'effet du PLX4032, dans les deux lignées de mélanome. Enfin, en ce qui concerne l'expression des cyclines D1 et D2, on observe une diminution de leur expression quelque soit le traitement pour la lignée SK-Mel28, le TNF diminuant très

partiellement l'effet du PLX4032. Dans la lignée A375, le TNF induit une augmentation de l'expression des cyclines D1 et D2, le PLX4032 a l'effet opposé, associés, le TNF diminue très partiellement l'effet du PLX4032.

Ces résultats montrent que certains effets du PLX4032, à savoir l'augmentation de l'expression de protéines régulant la quiescence des cellules souches et la diminution de l'expression de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, peuvent être atténués, voir abolis par le TNF. Cependant, en général, il semble que, bien que le TNF affecte les réponses cellulaires induites par le PLX4032, il ne modifie pas de manière significative les mécanismes moléculaires associés, à l'exception peut-être des voies de signalisation ciblant CREB et FOXO dans certains cas (A375 vs SK-Mel28).

V. Effets d'un environnement pro-inflammatoire sur la quiescence/activation des cellules souches de mélanome

1 - Production d'un environnement pro-inflammatoire

Nous avons montré que le TNF peut activer les cellules souches de mélanome entrées en quiescence suite à une exposition à une drogue anticancéreuse. Il pourrait donc être impliqué dans la réactivation des cellules dormantes *in vivo* entraînant la rechute tumorale. De plus, les observations cliniques montrent que la cancérogenèse serait induite par l'inflammation (Landskron *et al.*, 2014). De ce fait, nous avons élaboré une approche expérimentale plus pertinente d'un point de vue clinique.

Afin de mimer l'environnement inflammatoire, observé chez des patients *in vivo*, nous avons préparé des milieux conditionnés, obtenus après stimulation avec des anticorps anti-CD3/CD28 de lymphocytes humains isolés. Ces milieux conditionnés stimulés contiennent l'ensemble des cytokines produites après stimulation de lymphocytes *in vivo*. Nous avons également préparé des milieux conditionnés non stimulés qui, eux, ne contiennent pas de cytokines et que l'on utilise comme contrôle. Ces surnageants stimulés (ou non stimulés) ont été mis en présence de cellules de mélanome afin de mimer une inflammation chronique. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Docteur Raja El-Machhour.

2 - Effet d'un environnement pro-inflammatoire sur les cellules de mélanome en culture en deux dimensions

Nous avons, dans un premier temps, induit l'expression de l'H2B-GFP puis nous avons traité les mélanocytes malins à l'aide des milieux conditionnés (surnageants stimulés ou non stimulés) pendant 3 jours en culture en monocouche (2D). Nous avons ensuite récupéré ces cellules et analysé le pourcentage de cellules H2B-GFP⁺ en cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en figure 41. Nous avons également étudié la dilution du CFSE, une molécule fluorescente capable de se fixer aux constituants membranaires, nous permettant ainsi de suivre les divisions cellulaires. Les résultats sont présentés en figure 41.

Résultats

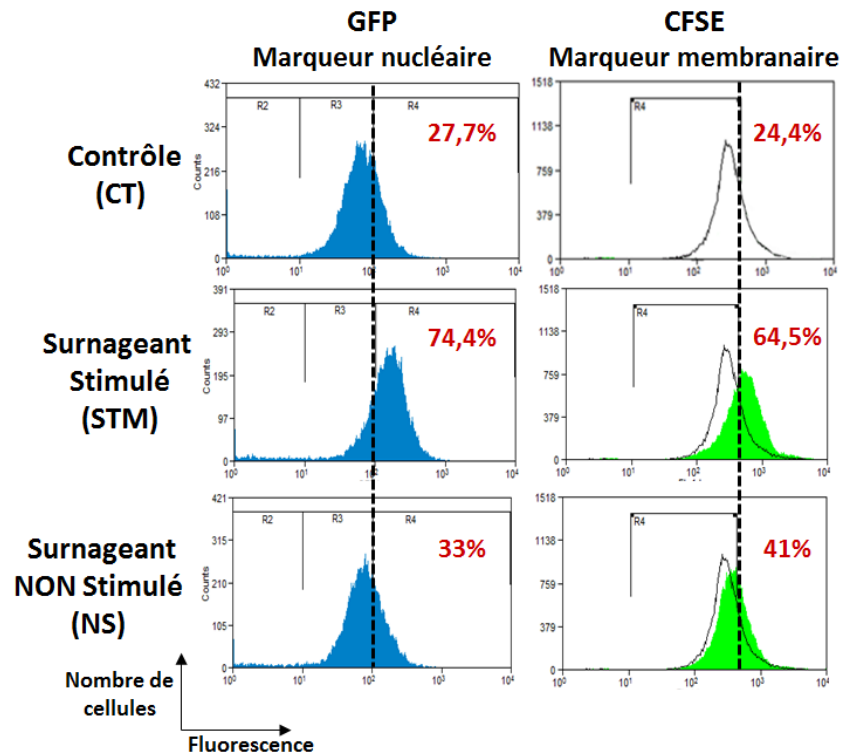


Figure 41 : Graphique présentant le pourcentage de cellules HBL H2B-GFP positives au sein des cultures en monocouche traitées ou non à l'aide des surnageants stimulés ou non stimulés, 3 jours après l'induction de l'expression de l'H2B-GFP à la tétracycline ou le marquage au CFSE et le traitement à l'aide des surnageants. Les cellules ont été analysées au cytomètre. Les données représentent les résultats combinés de trois expériences indépendantes.

Nous avons observé que les surnageants stimulés augmentent le pourcentage de cellules H2B-GFP+ et CFSE+.

Cela suggère que l'environnement inflammatoire augmente le pool de Label Retaining Cells (LRC), soit par division symétrique soit en empêchant la division des cellules cyclantes.

3 - Effet d'un environnement pro-inflammatoire sur les cellules de mélanome en culture en trois dimensions

La formation de mélanosphères est un test fonctionnel qui permet d'identifier et d'augmenter le pool de cellules souches et d'autre part constitue un modèle *in vitro* en 3 dimensions qui se rapproche de l'organisation tumorale *in vivo*.

Résultats

Afin d'étudier l'effet des surnageants sur la capacité des cellules à former des mélanosphères, les cellules HBL ont été prétraitées à l'aide des surnageants pendant 3 jours puis, 7 jours après l'ensemencement, nous avons dénombré les sphères formées. Ces sphères ont ensuite été récupérées, dissociées et réensemencées afin de former une deuxième, puis une troisième génération de sphères, toujours sans aucun traitement. Les résultats obtenus sont présentés en figure 42.

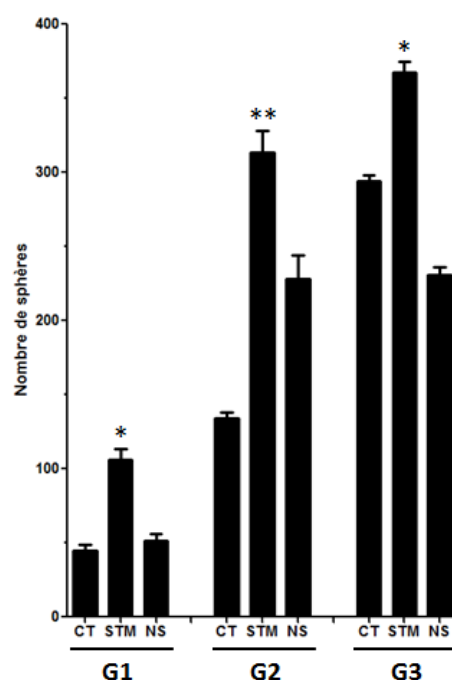


Figure 42: Graphique représentant le nombre moyen de sphères formées lorsque les cellules sont prétraitées à l'aide des surnageants stimulés (STM) ou non stimulés (NS) pendant 3 jours en culture en monocouche, par rapport aux cellules non traitées (CT), au cours de trois générations successives de sphères (G1, G2 et G3). Les mélanosphères sont dénombrées 7 jours après l'ensemencement des cellules en plaques polyHEMA (non adhérentes) à la densité clonale de 4 000 cellules par puits. Les données représentent les résultats combinés de trois expériences indépendantes d'au moins trois réplicats. %SFU = Sphere Forming Unit (nombre de sphères / nombre de cellules ensemencées x 100). **<0,01 ; *p<0,05.

Nous avons observé une augmentation du nombre de sphères formées avec les surnageants stimulés. Cet effet est accentué au cours des générations successives de sphères.

L'environnement inflammatoire semble d'une part, activer les cellules souches quiescentes de mélanome (augmentation du nombre de mélanosphères formées) et

d'autre part, freiner la division cellulaire des cellules qui cyclent lentement (augmentation du nombre de cellules H2B-GFP positives et CFSE positives).

4 – Les cellules H2B-GFP positives : un enrichissement en cellules souches ? Quel est l'effet des surnageants ?

Afin de caractériser les cellules H2B-GFP positives issues des sphères et d'établir une corrélation avec des marqueurs de cellules souches, nous avons procédé à une analyse de l'expression d'un marqueur membranaire de cellules souches de mélanome, et cela, dans le modèle des mélanosphères. Le profil d'expression d'ABCB5 (ATP-Binding Cassette sub-family B member 5), une pompe membranaire permettant l'efflux de nombreux composés, a ainsi été étudié en cytométrie en flux. Les résultats obtenus sont résumés en figure 43.

De plus, nous avons également étudié l'exclusion de la rhodamine par les cellules de mélanome. Ce test fonctionnel, qui reflète l'activité des pompes d'efflux ABCB5, nous permet d'identifier les cellules souches de mélanome (Touil *et al.*, 2013). Les résultats obtenus sont résumés en figure 43.

Ces études sont réalisées sur cellules vivantes. L'exclusion des cellules mortes se fait par ajout d'iodure de propidium (IP).

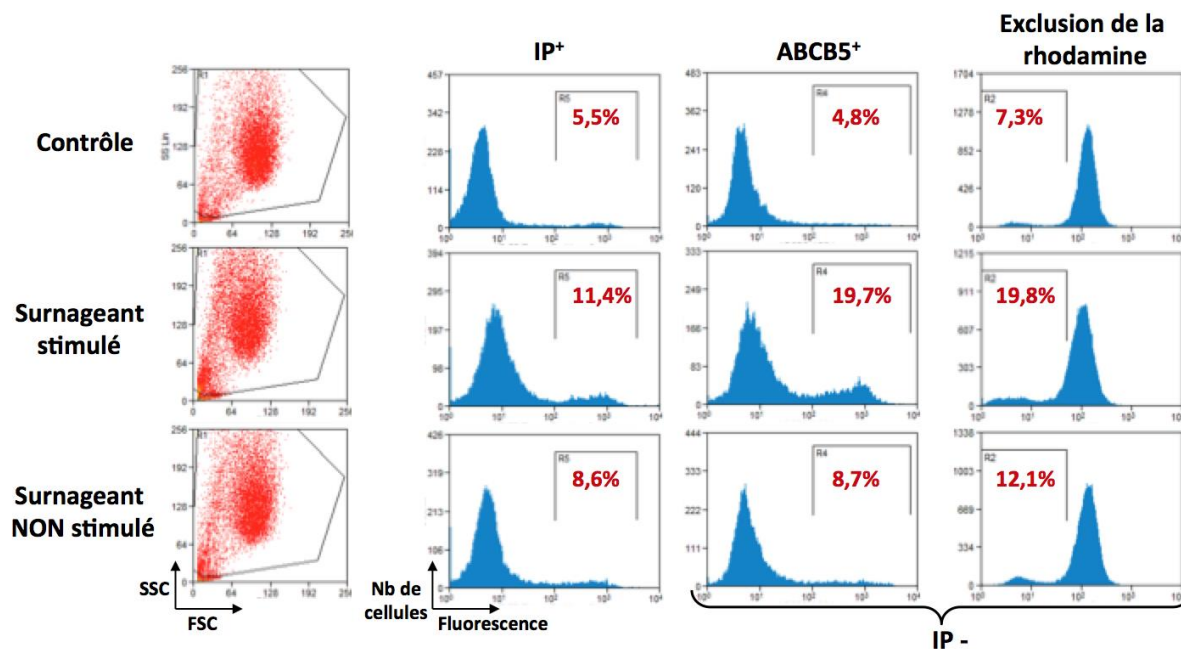


Figure 43 : Graphique présentant le pourcentage d'expression d'ABCB5 par les cellules HBL H2B-GFP positives prétraitées ou non à l'aide des surnageants, 7 jours après l'induction de l'expression de l'H2B-GFP à la tétracycline, l'ensemencement des cellules en plaques

polyHEMA (non adhérentes) à la densité clonale de 4 000 cellules par puits et le prétraitement des cellules à l'aide des surnageants pour une durée de 3 jours en culture en monocouche. Analyse réalisée en cytométrie en flux après exclusion des cellules mortes (IP+). IP = Iodure de Propidium. Les données représentent les résultats combinés de trois expériences indépendantes.

Nous avons observé une augmentation de l'expression d'ABCB5 et de l'exclusion de la rhodamine avec un prétraitement des cellules de mélanome à l'aide des surnageants stimulés.

Ces résultats montrent que l'inflammation augmente la proportion de cellules présentant des propriétés de cellules souches et donc augmente le compartiment des cellules souches.

5 - Effet d'un environnement pro-inflammatoire sur les LRC dans le modèle des équivalents de peau

L'environnement inflammatoire induit-il des changements fonctionnels au sein des cellules de mélanome ?

Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé le modèle en trois dimensions des équivalents de peau, que l'on a reconstitué à l'aide de mélanocytes malins (lignée HBL) en présence ou non de surnageants stimulés ou non stimulés pendant 3 semaines. Les photographies sont présentées en figure 44.

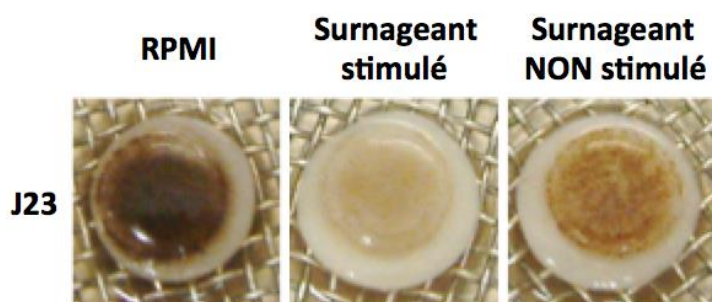


Figure 44 : Photographies d'équivalents de peau traités ou non à l'aide des surnageants stimulés ou non pendant trois semaines.

Résultats

Nous avons observé que les équivalents de peau traités à l'aide des surnageants non stimulés ou non traités sont très pigmentés, le traitement avec les surnageants stimulés a pour effet de diminuer cette pigmentation.

L'environnement inflammatoire semble donc inhiber la différenciation des cellules de mélanome.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons dissocié les équivalents de peau et ensemencé les cellules dans un environnement non adhérent afin de former trois générations successives de sphères sans aucun traitement. Les résultats sont présentés en figure 45.

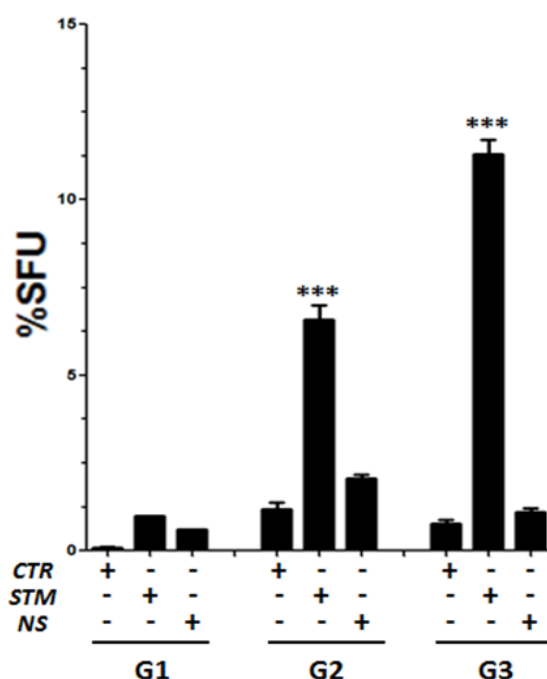


Figure 45 : Graphique représentant le pourcentage d'unités de sphères formées (%SFU) par les cellules traitées ou non à l'aide des surnageants stimulés (STM) ou non stimulés (NS) pendant trois semaines dans les équivalents de peau. Les mélanosphères sont dénombrées 7 jours après l'ensemencement des cellules en plaques polyHEMA (non adhérentes) à la densité clonale de 4 000 cellules par puits et sans traitement. Les données représentent les résultats combinés de deux expériences indépendantes d'au moins trois réplicats. %SFU = Sphere Forming Unit (nombre de sphères / nombre de cellules ensemencées x 100). ***<0,001.

Nous avons constaté que les cellules issues des équivalents de peau traités avec les surnageants stimulés forment plus de sphères que les cellules issues des équivalents de peau traités avec les surnageants non stimulés ou non traités. Cet effet est accentué au cours des générations successives de sphères.

L'inflammation induit une augmentation du pool de LRC GFP+ABCB5+ capables de s'autorenouveler et qui perdent leur capacité de se différencier, un effet maintenu de génération en génération. Ces effets sont identiques à ceux du TNF et suggèrent que le TNF, produit par les lymphocytes et présent dans les surnageants stimulés, serait le principal facteur responsable des réponses des cellules souches de mélanome à l'inflammation.

6 - Effet d'un environnement pro-inflammatoire sur l'expression du CD47

Afin d'étudier le lien entre l'inflammation et la résistance des cellules souches de mélanome, nous avons étudié l'expression du CD47. Il s'agit d'un marqueur membranaire appartenant à la sous-famille des immunoglobulines et impliqué dans divers processus biologiques dont la migration cellulaire, l'autorenouvellement et la croissance des cellules tumorales. CD47 est également surexprimé dans les cellules souches (Venkatraman & Tucker-Kellogg, 2013 ; Kalas *et al.*, 2013).

Nous avons ainsi induit l'expression de l'H2B-GFP puis traité les mélanocytes malins (lignée HBL) à l'aide des surnageants stimulés ou non stimulés pendant 3 jours et étudié l'expression du CD47 par les cellules de mélanome. Une corrélation avec le marqueur de cellules souches de mélanome ABCB5 a également été réalisée. Les résultats sont présentés en figures 46 et 47.

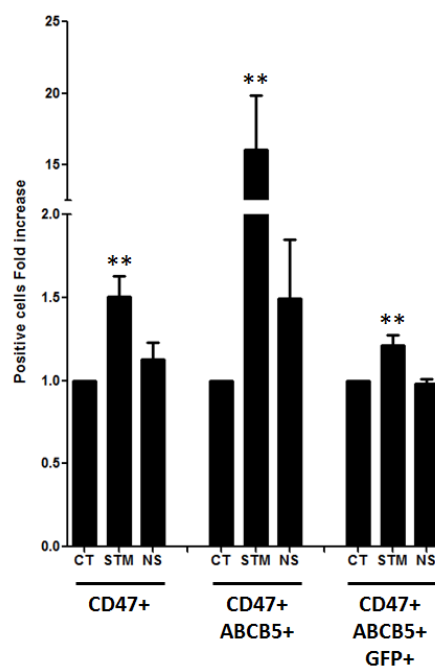


Figure 46 : Graphique présentant le pourcentage d'expression de CD47, en association ou non avec ABCB5 et l'H2B-GFP par les cellules de mélanome, prétraitées ou non à l'aide des

Résultats

surnageants (en ratio par rapport aux cellules non traitées), 3 jours après l'induction de l'expression de l'H2B-GFP à la tétracycline et le prétraitement des cellules à l'aide des surnageants. Analyse réalisée en cytométrie en flux. Les données représentent les résultats combinés de trois expériences indépendantes. $** < 0,01$.

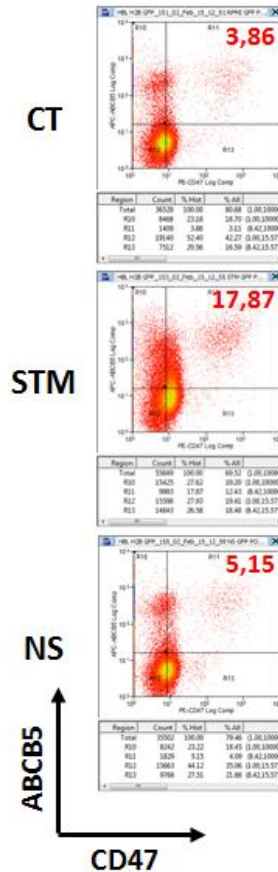


Figure 47 : Graphique présentant le pourcentage d'expression de CD47 en association avec ABCB5 par les cellules de mélanome HBL, prétraitées ou non à l'aide des surnageants, 3 jours après l'induction de l'expression de l'H2B-GFP à la tétracycline et le prétraitement des cellules à l'aide des surnageants. Analyse réalisée en cytométrie en flux. Graphiques biparamétriques (FL8 = fluorescence APC-ABCB5 (en ordonnée) ; FL2 = fluorescence PE-CD47 (en abscisse)). Les données représentent les résultats combinés de trois expériences indépendantes.

Nous avons observé que les surnageants stimulés augmentent l'expression du CD47 ainsi que la population double positive (CD47+ABCB5+) et la triple positive (CD47+ABCB5+GFP+). Un effet que l'on ne retrouve pas avec les surnageants non stimulés et qui a été validé sur 4 lignées cellulaires de mélanome.

Il semblerait que l'inflammation augmente le compartiment des cellules souches de mélanome CD47+ABCB5+GFP+. Cette augmentation est significative mais modeste.

7 - Effet de l'inhibition du CD47

L'expression du CD47 par les cellules tumorales les protège de la phagocytose par les macrophages, un effet amplifié par l'inflammation. En effet, CD47 (à la surface des cellules tumorales) interagit avec son récepteur SIRP α (à la surface des macrophages) et lui transmet un signal « don't eat me » afin d'inhiber la phagocytose. Des études ont montré que l'inhibition du CD47, par un anticorps monoclonal, empêche la liaison du CD47 à son récepteur SIRP α rendant ainsi possible l'élimination des cellules tumorales par les macrophages (Chao *et al.*, 2011 ; Chao *et al.*, 2012).

Nous avons ainsi ensemencé puis différencié des macrophages que l'on a mis en présence de cellules de mélanome, et nous avons étudié les effets des surnageants stimulés et non stimulés ainsi que ceux d'un anticorps monoclonal anti-CD47 sur l'induction de la phagocytose. Les résultats sont présentés en figure 48.

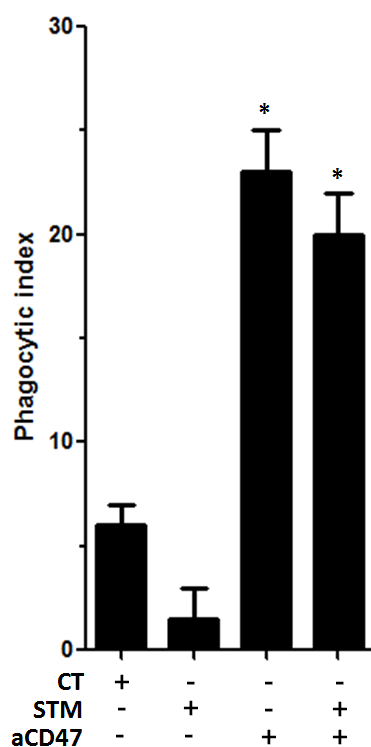


Figure 48 : Graphique présentant l'indice de phagocytose des cellules de mélanome par les macrophages, en présence ou non des surnageants stimulés et d'un anticorps anti-CD47. Des photos en lumière blanche et fluorescente sont prises à intervalle de temps réguliers et les cellules de mélanome phagocytées par les macrophages sont comptées manuellement. Les données représentent les résultats combinés de deux expériences indépendantes d'au moins trois réplicats. * $p < 0,05$.

Résultats

On observe une diminution de la phagocytose en présence des surnageants stimulés. En revanche, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CD47 permet d'augmenter de manière significative la phagocytose des cellules de mélanome par les macrophages, en présence ou non des surnageants stimulés.

Nous avons ainsi confirmé que l'inflammation protège les cellules de mélanome de leur élimination par les macrophages et que seule l'inhibition du CD47 permet l'élimination par phagocytose des cellules de mélanome. Le rôle de CD47 dans la régulation des cellules souches de mélanome en réponse à l'inflammation reste à déterminer dans de prochaines études.

Discussion

A la suite d'une thérapie vraisemblablement réussie, des cellules tumorales quiescentes peuvent persister au sein de patients atteints de cancer. Ces cellules dormantes demeurent asymptomatiques pendant une longue période de temps et ne présentent aucun risque immédiat apparent de développement de tumeurs jusqu'à leur réactivation conduisant à la rechute du cancer. Cependant, les caractéristiques des cellules dormantes disséminées ainsi que les facteurs impliqués dans cette réactivation commencent seulement à être identifiés. L'objectif à long terme de notre étude est de déterminer si un mécanisme moléculaire régulant la quiescence/activation *in vitro* contrôle la dormance tumorale et la rechute *in vivo*.

L'objectif de cette étude visait à étudier le rôle d'un environnement inflammatoire, par l'intermédiaire d'une cytokine pro-inflammatoire, le TNF et par l'utilisation de milieux conditionnés, dans le contrôle de l'activation des cellules souches tumorales dans un modèle tumoral particulièrement agressif, le mélanome. La compréhension des mécanismes qui régulent l'activation des cellules souches tumorales est un enjeu scientifique et médical majeur. En effet, les cellules souches tumorales quiescentes sont particulièrement résistantes à tout type de traitements anticancéreux (Oskarsson *et al.*, 2014 ; Sosa *et al.*, 2014 ; Senft & Ronai, 2016 ; Kreso & Dick, 2014). Un point absolument essentiel, souligné par les travaux les plus récents, est que la présence d'une sous-population de cellules tumorales cyclant très lentement est indispensable au développement du mélanome dans la durée. Ces cellules présentent toutes les caractéristiques de cellules souches tumorales quiescentes (Roesch *et al.*, 2010).

Les facteurs impliqués dans le contrôle du passage réversible de l'état quiescent à l'état activé des cellules souches tumorales sont eux encore très mal connus. L'inflammation favorise la progression tumorale et la carcinogenèse, elle nous ouvre ainsi des possibilités majeures sur l'action des facteurs inflammatoires intrinsèques (NFkB, HIF) et extrinsèques (cytokines) sur la régulation du pool de cellules souches tumorales (Allavena *et al.*, 2008). Dans notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à une cytokine pro-inflammatoire, le TNF, car il possède des effets pléiotropiques sur la formation et la croissance tumorale qui impliquent des effets directs sur les cellules tumorales et des effets indirects par maintien de conditions favorables dans le microenvironnement tumoral (Tanno & Matsui, 2011). De plus, le rôle du TNF sur la régulation du pool de cellules souches (expansion, switch phénotypique) dans différents modèles tumoraux commence à être de plus en plus documenté mais les mécanismes responsables sont très peu étudiés (Bhat-Nakshatri *et al.*, 2010 ; Storci *et al.*, 2010 ; Fleishmann *et al.*, 2011).

Nous avons donc dans le cadre de notre projet, étudié l'effet du TNF, sur les cellules souches quiescentes de mélanome dans des modèles de culture en 3 dimensions (plus proche de l'organisation *in vivo* des tumeurs que la culture en monocouche). Nous avons ainsi montré :

- 1- la présence d'une sous-population de « label retaining cells » (H2B-GFP positives) au sein des mélanosphères, indiquant que l'environnement des mélanosphères et leur structure maintiennent la quiescence de cette sous-population
- 2- un enrichissement en marqueurs de cellules souches du mélanome (ABCB5, VEGFR) au sein de cette sous-population
- 3- que le TNF semble d'une part activer les cellules souches quiescentes du mélanome (sensible augmentation des mélanosphères et diminution des cellules en G0) et d'autre part, freine la division des cellules peu cyclantes (augmentation des cellules H2B-GFP positives), démontrant que le TNF agit différemment sur les cellules souches quiescentes de mélanome et sur les cellules cyclantes
- 4- que le TNF induit un enrichissement des cellules exprimant des marqueurs de cellules souches du mélanome, reflétant l'élargissement du compartiment des cellules souches de mélanome
- 5- que le TNF inhibe la différenciation des cellules de mélanome, suggérant un autorenouvellement symétrique des cellules souches de mélanome, et induit des changements phénotypiques des cellules sur le long terme qui affectent la taille du compartiment des cellules souches dans les modèles de mélanosphères et des équivalents de peau, suggérant une activation des mécanismes épigénétiques et de la plasticité phénotypique des cellules de mélanome

Le TNF est une cytokine aux effets pléiotropiques. En effet, le TNF peut induire la prolifération, la différenciation ou la mort cellulaire. Nos résultats suggèrent que le TNF semble augmenter le pool de cellules souches dans les modèles des mélanosphères et des équivalents de peau. Bien que dans le mélanome, aucune étude à ce jour n'a été publiée sur l'effet du TNF sur les cellules souches du mélanome, il a récemment été démontré que le TNF est responsable d'un enrichissement d'une sous-population de cellules CD44+/CD24-, phénotype associé aux cellules souches dans le modèle du cancer du sein (Bhat-Nakshatri *et al.*, 2010). De manière intéressante, Storci *et al.* ont montré que l'axe NF κ B/ HIF1 α / SLUG/ β -caténine était responsable de cet effet (Storci *et al.*, 2010). Dans le modèle du cancer du rein, le TNF induit la transition épithélium-mésenchyme et augmente le compartiment des cellules souches (Zhang *et al.*, 2014). Il a été démontré que le TNF agit via son récepteur

TNFR2 afin d'induire l'entrée en cycle et la prolifération des cellules de type souche augmentant ainsi leur sensibilité à une drogue anticancéreuse ciblant les cellules en division (Al-Lamki *et al.*, 2016). Il a également été démontré que l'inflammation associée à la carcinogenèse inhibe la différenciation via la voie AKT et provoque un enrichissement en cellules souches de colon (Fukushima *et al.*, 2015). Un effet que l'on retrouve dans les cancers ORL, où une exposition prolongée au TNF favorise le phénotype souche via la voie Notch et implique Hes1, un régulateur de la quiescence (Lee *et al.*, 2012). En ce qui concerne le mélanome, une étude a montré que le TNF inhibe la croissance des cellules de mélanome via la voie p38 MAPK (Hattori *et al.*, 2001). De même dans un modèle de mélanome murin, il a été démontré que le TNF induit une dédifférenciation réversible des cellules de mélanome. Cette plasticité phénotypique contribue à la résistance immunitaire et à la récurrence de la maladie (Landsberg *et al.*, 2012). De plus, en accord avec nos observations, le TNF inhibe la différenciation des mélanocytes. En effet, il a été démontré que le TNF inhibe la mélanogenèse en diminuant le niveau d'ARNm de la tyrosinase et en diminuant la demi-vie intracellulaire de la tyrosinase et de TRP-1 (Martinez-Esparza *et al.*, 1997 ; Martinez-Esparza *et al.*, 1998 ; Ando *et al.*, 2007). Dans les mélanocytes sains, le TNF, sécrété par les mélanocytes et les kératinocytes, a un effet cytostatique et non cytotoxique sur les mélanocytes. De plus, il inhibe la synthèse de mélanine, en inhibant l'hydrolyse de la tyrosine (Swope *et al.*, 1991 ; Ladanyi *et al.*, 1998 ; Tam & Stepien., 2011 ; Wang *et al.*, 2013). Nous en avons conclu que le TNF est capable d'augmenter le compartiment des cellules souches soit en activant les cellules souches quiescentes et en favorisant leur autorenouvellement symétrique empêchant la sortie des cellules cyclantes du compartiment des cellules souches et leur différenciation, soit par des changements épigénétiques et une plasticité phénotypique.

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires par lesquels le TNF induit les événements observés dans notre modèle, nous avons étudié l'activation des protéines clés des voies de signalisation potentiellement activées par le TNF. Nos résultats suggèrent que le TNF activerait la voie PI3K/AKT et ses cibles en aval, notamment FOXO3A et CREB. Nous avons donc étudié l'effet d'un inhibiteur de la voie PI3K/AKT afin de déterminer si cette voie est responsable des effets du TNF dans notre modèle.

Nous avons ainsi montré :

- 6- que l'augmentation de l'expression d'ABCB5, marqueur de cellules souches du mélanome, et l'inhibition de la différenciation des cellules H2B-GFP positives par le TNF serait médiée via la voie PI3K/AKT.

De manière intéressante, il a déjà été démontré que la voie PI3K/AKT jouait un rôle régulateur dans le switch phénotypique des cellules souches de gliomes (Bleau *et al.*, 2009). Concernant le mélanome, notre équipe a récemment mis en évidence un switch phénotypique des cellules souches contrôlé par la voie PI3K/ AKT et son effet différentiel sur les cellules souches de mélanome quiescentes et cyclantes (Touil *et al.*, 2013).

Concernant les effets observés du TNF sur la prolifération des cellules souches dans nos modèles de mélanosphères et d'équivalent de peau, aucune étude à ce jour n'a été décrite dans la littérature dans des modèles tumoraux incluant le mélanome. Cependant, il a été récemment montré dans des modèles de cellules souches normales, une activation par le TNF de la division asymétrique des cellules souches aboutissant à une différenciation (Yang *et al.*, 2012, Huang *et al.*, 2011). Mais les mécanismes d'action responsables de ces effets sont peu élucidés.

Afin d'adopter une approche plus globale, nous avons également recréé un environnement inflammatoire *in vitro* à l'aide de milieux conditionnés afin de mimer l'environnement observé chez certains patients *in vivo*. Cette étude a été effectuée en collaboration avec le Dr Raja El-Machhour. Nous avons montré que le cocktail de cytokines, produit par des lymphocytes humains activés :

- 7- augmente le pool de label retaining cell.
- 8- active le pool de cellules souches quiescentes (augmentation du nombre de mélanosphères)
- 9- freine la division cellulaire des cellules qui cyclent lentement (augmentation du pool de cellules H2B-GFP positives et CFSE positives)
- 10- augmente le compartiment des cellules souches de mélanome (augmentation de l'expression d'ABCB5 et de l'exclusion de la rhodamine123)
- 11- inhibe la différenciation des cellules de mélanome et induit des changements cellulaires sur le long terme qui affectent la taille du compartiment des cellules souches dans le modèle des équivalents de peau
- 12- augmente l'expression du CD47, une immunoglobuline impliquée dans la migration cellulaire, l'autorenouvellement, la croissance des cellules tumorales et protège les

cellules tumorales de la phagocytose, et augmente la population cellulaire CD47+ABCB5+H2B-GFP+.

- 13- diminue la phagocytose des cellules de mélanome par les macrophages. L'utilisation d'un anticorps anti-CD47 permet d'éliminer les cellules de mélanome même en présence des surnageants stimulés.

Nos résultats suggèrent donc que l'environnement inflammatoire, induit par les milieux conditionnés, semble favoriser le pool de cellules souches dans les modèles des mélanosphères et des équivalents de peau, tout comme le TNF seul. De plus, les milieux conditionnés inhibent la différenciation des cellules de mélanome, tout comme le TNF. Nous avons également confirmé que l'inflammation protège les cellules de mélanome de leur élimination par les macrophages, en induisant la surexpression de CD47, et que seule l'inhibition du CD47 permet l'élimination, par phagocytose, des cellules de mélanome.

CD47 est un récepteur membranaire de la superfamille des immunoglobulines, dont le premier ligand endogène découvert est la thrombospondine. La découverte de son deuxième ligand : SIRP α , a permis de mettre en évidence l'implication du CD47 dans l'inhibition de la phagocytose, suite à sa liaison à SIRP α . Il est également capable de favoriser la migration et la prolifération cellulaire grâce à sa liaison à des intérgines (Jaiswal *et al.*, 2009).

CD47 a été pour la première fois découvert dans les années 1980 comme étant un antigène tumoral dans le cancer des ovaires. Il a depuis été mis en évidence dans de nombreux types de cancer. CD47, qui est surexprimé par les cellules tumorales, empêche leur phagocytose via sa liaison à SIRP α , à la surface des macrophages, et permet ainsi aux cellules tumorales d'échapper à la surveillance du système immunitaire inné. La liaison de CD47 à SIRP α envoie un signal « don't eat me » aux cellules du système immunitaire permettant la survie des cellules tumorales. Bloquer ce signal apparaît comme un moyen de favoriser l'élimination des cellules cancéreuses. De nombreux travaux ont été réalisés afin de développer des thérapies inhibant la liaison du CD47 à SIRP α . Il s'agit principalement d'anticorps monoclonaux dirigés contre CD47 mais également de protéines recombinantes de SIRP α qui se lient et bloquent le CD47 (Chao *et al.*, 2012).

En phase pré-clinique, les anticorps anti-CD47 ont montré une activité contre différents types de cellules tumorales *in vitro* et dans des modèles murins de xénotransplantation (Chao *et al.*, 2012 ; Majeti *et al.*, 2009). Ces anticorps montrent une activité anti tumorale dans les cancers du sein, de la vessie, le myélome multiple et le lymphome non Hodgkinien. Des

essais cliniques de phase I sont en cours et testent la toxicité de ces thérapies (Chao *et al.*, 2012). De plus, des études ont également montré que l'exposition de cellules souches hématopoïétiques à des cytokines pro-inflammatoires induit la surexpression du CD47 par ces cellules, qui de ce fait, sont protégées de la phagocytose par les macrophages au cours de leur migration de la moelle osseuse à la périphérie. Dans le modèle leucémique, les cellules surexpriment CD47 et l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CD47 favorise leur phagocytose. Dans le mélanome, CD47 inhibe la migration des cellules exprimant Melan-A mais pas celle des cellules B16F10, pour lesquelles une N-glycosylation anormale de SIRPα a été observée, empêchant sa liaison au CD47, un mécanisme qui contribue au comportement agressif des cellules B16F10 (Sick *et al.*, 2012).

Ces données sont cohérentes avec nos résultats montrant que l'environnement pro-inflammatoire induit la surexpression de CD47 par les cellules de mélanome, empêchant leur élimination par phagocytose. L'utilisation d'un anticorps anti-CD47 permet l'élimination d'un grand nombre de cellules de mélanome.

Nos résultats montrent également que l'environnement pro-inflammatoire induit une augmentation de la population cellulaire exprimant à la fois ABCB5 et CD47. Plusieurs questions se posent alors. ABCB5 et CD47 sont-ils les marqueurs de cellules souches de mélanome ? L'anticorps anti-CD47 est-il capable d'éliminer ces cellules souches de mélanome ? Des études supplémentaires sont nécessaires afin de répondre à ces questions et de déterminer le rôle de CD47 dans la régulation des cellules souches de mélanome en réponse à l'inflammation. Cependant, CD47 joue vraisemblablement un rôle central dans le microenvironnement tumoral. Compte tenu de son expression ubiquitaire, de sa capacité à moduler la croissance et la migration des cellules tumorales, et de développer des réponses immunitaires anti-tumorale, CD47 semble être un candidat très intéressant à cibler dans de nouvelles approches thérapeutiques contre le cancer.

Dans la suite de notre étude, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de résistance des cellules de mélanome aux thérapies anticancéreuses. Nous nous sommes ainsi posés les questions suivantes : Comment agissent les anticancéreux sur le compartiment des cellules souches ? Induisent-ils un enrichissement en cellules souches ? Induisent-ils la quiescence ? Nous avons récemment montré, au sein du laboratoire, qu'un agent anticancéreux, le 5FU (5-fluorouracil), permet d'augmenter le compartiment des cellules souches et d'induire la quiescence des cellules tumorales coliques (Touil *et al.*, 2014). En est-il de même dans le mélanome ? La résistance des cellules aux drogues anticancéreuses

est-elle une conséquence de changements au niveau cellulaire ou au niveau des mécanismes moléculaires responsables de la signalisation cellulaire ou les deux ?

Etant donné que 50% des mélanomes présentent une mutation sur le gène BRAF, résultant dans plus de 90% des cas en une substitution d'une valine en acide glutamique au niveau du 600^{ème} codon de la kinase, augmentant l'agressivité de la maladie, nous avons étudié les effets de la première thérapie ciblée du mélanome : le PLX4032 ou vemurafenib. Il s'agit d'un inhibiteur spécifique de BRAF^{V600E} accepté en 2011 par la FDA pour le traitement des mélanomes métastatiques présentant une mutation de la kinase BRAF. Cette mutation, localisée au niveau du domaine kinase de BRAF, entraîne une activation constitutive de cette dernière, physiologiquement activée par la phosphorylation de RAS, aboutissant à une suractivation de la voie des MAPK et une prolifération anormale des mélanocytes. Les inhibiteurs de BRAF ont tout d'abord montré des effets bénéfiques en augmentant la survie des patients. Cependant, une résistance au traitement est observée chez la majorité des patients moins d'un an après le début du traitement, conduisant à une récurrence de la maladie (Davies *et al.*, 2002).

Nous avons donc étudié les effets du PLX4032 sur les cellules de mélanome et nous avons montré que ce dernier :

- 14- augmente le pool de label retaining cells H2B-GFP positives au sein des mélanosphères
- 15- augmente le compartiment des cellules exprimant un marqueur de cellules souches de mélanome (ABCB5)
- 16- favorise la quiescence des cellules de mélanome (augmentation du pourcentage de cellules en phase G0 du cycle cellulaire)
- 17- diminue l'expression de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (cycline D1 et cycline D2) et stimule l'expression de protéines régulant la quiescence des cellules souches (FOXO3A et CREB)

Ces résultats montrent que le PLX3032 a un effet anti-prolifératif sur les cellules de mélanome et induit leur quiescence. Un effet paradoxal du PLX4032 sur les cellules de mélanome est la diminution de leur capacité à former des sphères et l'augmentation de l'expression d'un marqueur de cellules souches (ABCB5). Cependant, étant donné que le PLX4032 induit la quiescence, les cellules ABCB5 positives, dont le nombre augmente suite

au traitement, entrent en phase G0 du cycle cellulaire d'où leur incapacité à former des sphères.

De plus, le PLX4032 induit la quiescence des cellules de mélanome grâce à la diminution de l'expression des cyclines D1 et D2 et l'augmentation de l'expression de protéines qui contrôlent la quiescence (FOXO3A et CREB). Ces cellules quiescentes sont-elles des cellules souches ? On peut effectivement le penser au vue de l'augmentation de l'expression d'un marqueur de cellules souches de mélanome (ABCB5), cependant ces cellules sont inactives comme l'indique la diminution du potentiel à former des sphères.

Ces données indiquent que le vemurafenib, qui élimine la plupart des cellules cancéreuses en prolifération, n'est pas capable d'éliminer la population des cellules souches cancéreuses, exprimant ABCB5, responsable de la formation des tumeurs et induit une résistance des cellules au traitement.

Le succès des chimiothérapies dépend de plusieurs facteurs. Les cellules cancéreuses acquièrent fréquemment une résistance à une drogue anticancéreuse via une induction spontanée de certains gènes régulateurs au cours du traitement. L'efflux de drogue est une des méthodes utilisées par les cellules cancéreuses afin d'empêcher la pénétration de la drogue dans la cellule. En effet, la première ligne de défense cellulaire contre les xénobiotiques est la diminution rapide de la concentration intracellulaire du xénobiotique par un système d'efflux via des transporteurs. Les cellules cancéreuses utilisent ce mécanisme de protection en stimulant l'expression de gènes codant pour ces transporteurs, dont des protéines de la superfamille des ATP-Binding Cassette. Des études, ainsi que la notre, montrent que l'expression de la pompe d'efflux ABCB5 augmente après une exposition des cellules à des drogues anticancéreuses. Dans le mélanome, les études ont montré que les cellules souches cancéreuses de mélanome expriment ABCB5, sont résistantes aux drogues anticancéreuses, telles que la dacarbazine ou le vemurafenib, sont capables de s'autorenouveler, de se différencier et sont tumorigéniques. Ces données suggèrent qu'ABCB5 contribue aux mécanismes de résistance et constitue ainsi une potentielle cible thérapeutique dans le traitement du mélanome (Wu & Ambudkar., 2013 ; Chartrain *et al.*, 2012).

D'autres études ont montré que les cellules résistantes au vemurafenib surexpriment des marqueurs de cellules souches et des pompes d'efflux, des données cohérentes avec nos résultats. Les interactions des cellules tumorales avec leur micronenvironnement étant cruciales pour leur survie et leur dissémination, perturber les interactions entre les cellules tumorales résistantes et leur microenvironnement constitue une approche supplémentaire afin d'empêcher la résistance des cellules cancéreuses aux drogues. Les cellules résistantes

au vemurafenib remodelent leur microenvironnement de manière différente des cellules sensibles au vemurafenib, ce qui suggère que différentes voies de signalisation sont impliquées dans les interactions entre les cellules résistantes ou sensibles avec leurs microenvironnements respectifs. D'où la possibilité de manipuler de manière sélective et de cibler les voies de signalisation des cellules résistantes qui ont conduit à leur arrêt de prolifération (Zubrilov *et al.*, 2015).

La dormance tumorale permet aux cellules souches cancéreuses de se protéger de leur environnement. Dans un état de quiescence, les cellules souches tumorales résistent aux thérapies anticancéreuses. Le microenvironnement tumoral étant un environnement inflammatoire et nos résultats montrant que le TNF active les cellules quiescentes, nous nous sommes posé les questions suivantes : Comment relier la résistance des cellules cancéreuses et la dormance cellulaire ? Le TNF peut-il abolir les effets du PLX4032 et activer les cellules souches quiescentes ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé le TNF en association avec le PLX4032, sur des lignées de mélanome mutées pour le gène BRAF. Nous avons montré que :

- 18- le TNF et le PLX4032 ont des effets opposés sur la formation de sphères, le TNF augmente le nombre de sphères formées tandis que le PLX4032 le diminue, associés, le TNF diminue très partiellement ou abolit les effets du PLX4032 selon la lignée de mélanome
- 19- le TNF et le PLX4032 ont le même effet sur le pool de cellules H2B-GFP positives, ils augmentent ce compartiment cellulaire, le TNF diminue voir abolit l'effet du PLX4032
- 20- le TNF et le PLX4032 augmentent l'expression de marqueur de cellules souches de mélanome (ABCB5), le TNF amplifie l'effet du PLX4032
- 21- le TNF stimule l'activation des cellules quiescentes (diminution du pourcentage de cellules en phase G0 du cycle cellulaire), le PLX4032, au contraire, stimule la quiescence cellulaire, le TNF diminue voir abolit l'effet du PLX4032

Afin de déterminer si le TNF et/ou le PLX4032 activent les mêmes voies de signalisation, nous avons étudié l'expression de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et la quiescence.

Nos résultats montrent que :

22- le PLX4032 augmente la phosphorylation des protéines CREB et FOXO3A, le TNF diminue voir abolit l'effet du PLX4032

23- le TNF diminue l'expression des cyclines D1 et D2 pour les cellules SK-Mel28 et augmente leur expression dans la lignée A375, le PLX4032 diminue l'expression des cyclines D1 et D2 dans les deux lignées, en association, le TNF diminue très partiellement l'effet du PLX4032 dans la lignée A375, montrant que la réponse à la drogue et à l'inflammation serait spécifique à la lignée cellulaire

De manière générale, lorsque le TNF et le PLX4032 induisent les mêmes effets (augmentation du pool de cellules exprimant ABCB5), leur association provoque le même résultat qu'utilisé seul. En revanche, lorsque le TNF et le PLX4032 ont des effets opposés, notamment sur la capacité à former des sphères et à induire la quiescence, leur association permet au TNF de diminuer voir d'abolir les effets du PLX4032. Le TNF permet d'activer les cellules souches tumorales quiescentes et d'augmenter leur pool. Il inhibe également la différenciation des cellules de mélanome. Le PLX4032 induit l'entrée en quiescence des cellules souches tumorales et élimine les autres cellules cancéreuses. Lorsque ces deux facteurs sont associés, le TNF est capable de diminuer ou d'inhiber l'entrée en quiescence des cellules de mélanome induite par le PLX4032. Le TNF est également capable de diminuer le pourcentage de cellules H2B-GFP, dont le nombre augmente suite au traitement avec le PLX4032. Enfin, le PLX4032 induit une diminution du nombre de sphères formées, provoquée par l'entrée des cellules en phase G0 du cycle cellulaire. Le TNF, qui lui active les cellules quiescentes et augmente ainsi le nombre de sphères formées, est capable d'activer les cellules quiescentes d'où l'augmentation du nombre de sphères formées. Cependant cet effet n'est pas observé dans les deux lignées de mélanome.

Récemment, une étude a démontré que la présence de la mélanine altère la sensibilité des cellules de mélanome aux agents cytotoxiques. De ce fait, l'inhibition de la mélanogenèse par des inhibiteurs de la tyrosinase permet de sensibiliser les cellules de mélanome à la chimiothérapie. Les thérapies inhibant la mélanogenèse constitueraient de nouvelles thérapies adjuvantes permettant d'amplifier l'efficacité des chimiothérapies et immunothérapies actuelles (Slominski *et al.*, 2009). De plus, il a été démontré que l'inhibition de la mélanogenèse augmente également la sensibilité des cellules de mélanome aux radiations (Brozyna *et al.*, 2008).

Notre étude a démontré que le TNF inhibe la différenciation des cellules de mélanome. De plus, le TNF est capable d'abolir certains effets du PLX4032, notamment l'entrée en quiescence des cellules. Cependant, le TNF augmente le pool de cellules souches (augmentation du compartiment des cellules exprimant ABCB5), un effet identique à celui induit par le PLX4032. Lorsque le TNF et le PLX4032 sont associés cette population augmente également. Le TNF n'est ainsi pas en mesure d'abolir ou de diminuer tous les effets induits par le PLX4032 qui sont responsables de la survie de certaines cellules de mélanome après le traitement. Le fait que le TNF favorise le pool de cellules souches en plus d'inhiber la mélanogenèse pourrait expliquer que le TNF n'améliore pas l'efficacité du vemurafenib. De plus, les inhibiteurs de la mélanogenèse utilisés dans l'étude de Slominski *et al* inhibent le site catalytique de l'enzyme tyrosinase. Le mécanisme par lequel le TNF inhibe la différenciation des cellules de mélanome, dans notre étude, reste à déterminer et n'implique peut être pas l'inhibition de la tyrosinase. La tyrosinase intervient dans les premières étapes de la mélanogenèse, le TNF pourrait inhiber la synthèse de mélanine sans inhiber celle de la tyrosinase. De plus, dans notre étude sur le CD47, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CD47 permet d'augmenter la phagocytose des cellules de mélanome par les macrophages. Cependant, en présence d'un environnement inflammatoire, mimé par les surnageants stimulés, ce dernier diminue légèrement l'efficacité de l'anticorps anti-CD47. Les surnageants stimulés inhibant, tout comme le TNF, la différenciation des cellules de mélanome, les mécanismes mis en jeu dans ce phénomène pourraient être les mêmes.

CONCLUSION

De manière générale, il semble que l'activité du TNF, une cytokine pro inflammatoire, module la sous-population de cellules souches tumorales dans le modèle du mélanome, en inhibant leur différenciation et en augmentant leur nombre. Il semble que la voie PI3K/AKT joue un rôle important dans cet effet. De plus, il semble que le vemurafenib, la première thérapie ciblée pour le mélanome, augmente également le pool de cellules souches cancéreuses et les maintiennent quiescentes. Ces résultats pourraient avoir des conséquences cliniques importantes car l'inflammation aiguë peut activer ou amplifier le nombre de cellules cancéreuses existantes cliniquement dormantes pendant de nombreuses années jusqu'à leur réactivation et la formation de tumeurs plus agressives.

PERSPECTIVES

Notre étude sur les effets du TNF dans le modèle des équivalents de peau a permis de mettre en évidence des effets à long terme du TNF sur le compartiment des cellules souches. Ces effets durables pourraient être induits par des modifications épigénétiques. De ce fait, il serait intéressant de déterminer si le TNF induit des modifications épigénétiques des protéines histones et des promoteurs de l'ADN et si ces modifications ciblent une sous-population cellulaire en particulier (compartiment cellulaire quiescent ou cyclant).

Nous avons mis en évidence que le PLX4032 diminue la capacité des cellules à former des sphères en induisant la quiescence. Il serait intéressant d'effectuer des sphères de 2^{ème} puis 3^{ème} génération sans PLX4032 afin de déterminer si les effets du PLX4032 sont réversibles en réponse ou non au TNF, si l'entrée des cellules souches cancéreuses en phase G0 du cycle cellulaire contribue à la résistance aux drogues anticancéreuses et à la dormance tumorale du mélanome et si le TNF active les cellules dormantes et contribue à la récurrence de la maladie.

De plus, il serait intéressant de déterminer les mécanismes par lesquels le TNF inhibe la différenciation des cellules de mélanome. Est-ce en inhibant la tyrosinase ?

Dans notre étude, le TNF et le PLX4032 ont été mis en contact des cellules de mélanome en même temps. Cependant, étant donné que l'inflammation favorise la cancérogenèse et que le traitement des tumeurs par thérapies ciblées ou autre intervient après ce phénomène, il serait intéressant de traiter, dans un premier temps, les cellules de mélanome à l'aide de TNF, afin d'induire l'effet mémoire observé dans notre étude, et ensuite de traiter les cellules au vemurafenib. Dans ce cas de figure, le TNF pourrait peut être augmenter la sensibilité des cellules de mélanome au vemurafenib. De plus, le TNF, par sa capacité à activer les cellules de mélanome quiescentes, permettrait peut être d'empêcher l'induction de la quiescence des cellules souches tumorales induite par le PLX4032, ce qui permettrait d'éliminer toutes les cellules cancéreuses.

Enfin, une validation *in vivo* des résultats obtenus *in vitro* serait également intéressante. Ces études testeront l'activité tumorigène et métastatique des différentes sous-populations de cellules de mélanome et les effets du TNF associés au PLX4032.

En ce qui concerne l'étude des effets de l'inflammation, à travers l'utilisation des surnageants stimulés, sur l'expression du CD47, il serait intéressant d'étudier les voies de signalisation

impliquées dans cet effet. Il serait également intéressant de déterminer le rôle de CD47 dans la régulation des cellules souches de mélanome en réponse à l'inflammation. De plus, les études montrant une augmentation de l'efficacité des anticancéreux en présence d'inhibiteur de la mélanogenèse, et étant donné que les surnageants stimulés inhibent la différenciation des cellules de mélanome et que l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CD47 permet d'éliminer les cellules de mélanomes, il serait intéressant de tester l'utilisation d'un anticorps anti-CD47 associé à de la chimiothérapie, comme le PLX4032, en présence des surnageants stimulés et d'étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Autres travaux

**A. Article n°2: Melanoma dormancy in a mouse model is linked to
GILZ/FOXO3A dependant quiescence of disseminated stem-like
cells**

(Sci Rep. 2016 ; 6:30405. DOI: 10.1038/srep30405)

Cet article présente la construction d'un modèle syngénique de dormance tumorale du mélanome chez la souris, des travaux réalisés par le Dr Yasmine Touil. Ce long travail a permis l'isolement d'une lignée « dormante » et sa caractérisation a permis la découverte du rôle clé du facteur de transcription GILZ dans l'activation des cellules souches tumorales quiescentes.

La récurrence de nombreux cancers métastatiques est causée par la réactivation de cellules tumorales dormantes disséminées. Cependant, les mécanismes et cellules impliqués dans cette réactivation commencent seulement à être identifiés.

Grâce à l'utilisation d'un modèle murin de dormance tumorale, cette étude a permis de montrer que la vaccination contre le mélanome a empêché la croissance tumorale, mais pas la dissémination ni l'élimination de toutes les cellules tumorales. Les cellules tumorales de mélanome disséminées se trouvaient dans un état de quiescence et présentaient des propriétés phénotypiques et fonctionnelles des cellules souches. La quiescence/activation de ces cellules *in vitro* et la dormance du mélanome *in vivo* semblent être régulées par l'inhibition de GILZ. L'expression de GILZ était faible dans les cultures dérivées de cellules dormantes et la réexpression de GILZ inactive FOXO3A et sa cible en aval, p21Cip1. La capacité des cellules dormantes à réintégrer le cycle cellulaire augmente progressivement avec chaque réentrée en dormance cellulaire et reflète le raccourcissement de la période de dormance tumorale et la rechute plus rapide et agressive. Cette capacité est corrélée à la taille du compartiment des cellules souches de mélanome, indiquant que les traitements devraient être adaptés au stade de progression de la maladie.

**B. Article n°3: Nerve Growth Factor and proNGF Simultaneously
Promote Symmetric Self-Renewal, Quiescence, and Epithelial to
Mesenchymal Transition to Enlarge the Breast Cancer Stem Cell
Compartment**

(Stem Cells. 2015 Feb;33(2):342-53)

De nombreux facteurs sont présents au sein du microenvironnement tumoral. Parmi eux, le TNF joue un rôle dans le contrôle de la quiescence et de l'activation des cellules souches cancéreuses de mélanome. Existe-t-il d'autres voies impliquées ? Existe-t-il d'autres modèles où le microenvironnement a un impact sur les cellules souches tumorales ?

Dans ce but, notre équipe et celle du Pr Xuefen Le Bourhis ont collaboré, afin d'étudier les effets du NGF et du proNGF sur les cellules souches tumorales de sein, tous les deux étant sécrétés par les cellules cancéreuses de sein et étant impliqués dans la croissance tumorale et la formation de métastases dans des modèles murins de cancer du sein.

Cette étude a permis de démontrer que le NGF et le proNGF diminuent le nombre de divisions asymétriques et l'expression de NUMB, et augmentent la population de cellules souches dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein. De plus, il a été mis en évidence qu'une sous-population de cellules quiescentes/slow cycling surexprime p75NTR, CD44 et SOX2, un phénotype de cellules souches dans le cancer du sein. Ces cellules souches cancéreuses répondent aux signaux du NGF et du proNGF via la diminution de l'expression de NUMB et la surexpression de SOX2, associées à une augmentation du compartiment des cellules souches. Dans le modèle des mammosphères, les cellules traitées au NGF montrent une capacité supérieure à former des tumeurs, corrélé à une augmentation de l'induction de la transition épithélium-mésenchyme, mise en évidence par la surexpression de la vimentine et SLUG. Les changements moléculaires, associés à la transition épithélium-mésenchyme, induits par le NGF et le proNGF sont différents. Le NGF induit une expression de facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence, dont SOX2, NANOG et MYC, par l'intermédiaire de p75NTR, tandis que l'effet le plus significatif du proNGF est d'induire la quiescence. Dans les deux cas, le résultat est le même, à savoir, une augmentation du compartiment des cellules souches. Cette étude montre ainsi que l'axe NGF/proNGF/p75NTR joue un rôle majeur dans la régulation de l'autorenouvellement et de la plasticité des cellules souches cancéreuses de sein.

**C. Article n°4: Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor and p38
Mitogen-Activated Protein Kinase Signals Inversely Regulate Signal
Transducer and Activator of Transcription 3 Activity to Control
Human Dental Pulp Stem Cell Quiescence, Propagation, and
Differentiation**

(Stem Cells Dev. 2014 Apr 15;23(8):839-51)

L'expertise de l'équipe dans l'étude des cellules souches, lui a valu d'être sollicitée par un enseignant chercheur de chirurgie dentaire afin de développer un programme de recherche sur les cellules souches de la pulpe dentaire chez l'homme. Au cours de ce programme, une attention particulière a été portée au contrôle de la quiescence/activation de ces cellules.

Les cellules souches de la pulpe dentaire (DPSC) restent à l'état quiescent jusqu'à leur activation, en réponse à de graves lésions de la pulpe dentaire, afin de réparer la dentine. Cependant les facteurs contrôlant la quiescence/activation et la différenciation des DPSC humaines ne sont pas connus.

Le but de cette étude est de déterminer si p38 MAPK peut réguler le destin des DPSC, et si ce contrôle dépend ou non de la voie de signalisation de l'IGF-1R, en amont de p38 MAPK, qui contrôle la reprogrammation cellulaire et la pluripotence des cellules souches.

Cette étude a permis de montrer que l'inhibition des voies de l'IGF-1R et de p38 MAPK active les DPSC et favorise leur sortie de la phase G0 du cycle cellulaire et du compartiment pyronine Y^{low}. L'inhibition de ces deux voies de signalisation détermine de façon opposée le destin des DPSC. A l'inverse de l'inhibition de la voie p38 MAPK, l'inhibition de la voie IGF-1R augmente la capacité des cellules de la pulpe dentaire à former des sphères et diminue leur capacité à former des colonies, sans induire de mort cellulaire. Ces changements cellulaires opposés induits par l'inhibition de ces deux voies de signalisation sont également accompagnés par des changements opposés sur l'expression de la forme active de STAT3, de la forme inactive de la glycogène synthase kinase 3 et de la phosphoglycoprotéine de la matrice extracellulaire, un marqueur précoce de la différenciation odontoblastique. Cette étude indique une interaction des voies de signalisation de l'IGF-1R et de p38 MAPK dans les DPSC dont les signaux convergent au niveau de STAT3 et régulent de manière opposée ses activités, à savoir maintenir la quiescence ou favoriser l'autorenouvellement et la différenciation des cellules.

Discussion

La quiescence est l'un des mécanismes majeurs permettant de maintenir le compartiment des cellules souches et de les protéger de leur environnement. Dans cet état, ces cellules sont insensibles aux thérapies anticancéreuses conventionnelles et sont responsables de la récurrence de la maladie, suite à leur activation. Le contrôle de la quiescence/activation des cellules souches cancéreuses est donc un élément clé. Cependant, les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore bien définis et les travaux présentés ici indiquent que de nombreuses voies de signalisation semblent être impliquées.

Dans le mélanome, nous avons mis en évidence l'implication de la voie PI3K/AKT dans la transition de la quiescence/activation, suite à une exposition au TNF. De plus, toujours dans le modèle du mélanome humain, le laboratoire a également montré que l'inhibition de la voie PI3K/AKT réactive une sous-population de cellules quiescentes et inactive une sous-population de cellules actives (Touil *et al.*, 2013).

Les études présentées ici mettent en évidence l'existence de différents régulateurs de la quiescence/activation. Dans un modèle de mélanome murin, GILZ régule la transition de la quiescence/activation des cellules souches cancéreuses. En effet, l'inhibition de GILZ contrôle l'entrée en quiescence des cellules souches de mélanome, tandis que son activation inactive l'expression de FOXO3A et de ses cibles (p21CIP1) et provoque l'activation des cellules dormantes (Touil *et al.*, in press). Dans le modèle du cancer du sein, les neurotrophines NGF et proNGF sont impliquées dans la régulation de la quiescence/activation des cellules souches cancéreuses. En effet, ils induisent leur sortie de quiescence. Cependant, l'activation d'un grand nombre de cellules souches pousse certaines d'entre elles à entrer de nouveau en quiescence afin de maintenir leur pool. Enfin, dans le modèle des cellules souches de la pulpe dentaire, deux voies de signalisation sont impliquées. Il s'agit des voies IGF-1R et p38 MAPK. L'inhibition de ces voies de signalisation provoque la sortie de quiescence et donc l'activation des cellules souches de la pulpe dentaire. Ces deux voies convergent au niveau de STAT3. Ce dernier est régulé de manière opposée par les voies IGF-1R et p38 MAPK afin de maintenir la quiescence ou de favoriser l'activation des cellules. Ces données confirment l'importance du processus essentiel de quiescence/activation des cellules souches et mettent en évidence qu'il existe une diversité des voies impliquées selon le type cellulaire.

Afin d'empêcher la récurrence de la maladie, l'élimination de toutes les cellules souches cancéreuses est nécessaire. L'échec des thérapies actuelles s'explique par le fait que les cellules souches tumorales sont capables d'entrer en quiescence afin de se protéger. Cependant cet état est réversible d'où l'intérêt de comprendre les mécanismes, complexes, régulant cette transition afin de les éradiquer.

Annexes

Présentations aux congrès

- Effet d'un environnement pro-inflammatoire sur l'activation des cellules souches tumorales quiescentes dans le mélanome. 7^{èmes} Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, 14-16 mai 2014, 2^{ème} prix de la meilleure communication orale.
- TNF α expands the label retaining cell compartment in melanoma. 1st ONCOLille Symposium on Tumor Dormancy, Lille, 2014, présentation affichée.
- 3D Skin equivalent model of melanoma to study relationship between cellular quiescence/activation, chemoresistance and tumor dormancy. Effect of TNF. 6th PhD Student Day, Lille, 2015, communication orale.
- Effet d'un environnement pro-inflammatoire sur l'activation des cellules souches tumorales quiescentes dans le mélanome. 15^{ème} Journée André Verbert, Lille, 2015, présentation affichée.
- Effect of pro-inflammatory environment on quiescent/activation phenotypic switch of melanoma cancer stem cell. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Annual Meeting, Stockholm, Suède, 24-27 juin 2015, présentation affichée.
- Facteurs inflammatoires et contrôle de la quiescence/activation des cellules souches tumorales de mélanome. 1^{er} Congrès du GDR 3697 MICRONIT « Microenvironnement des niches tumorales », La Rochelle, 20-22 janvier 2016, communication orale.
- 3D models of melanoma to study relationship between cellular quiescence/activation, chemoresistance and tumor dormancy. Effect of TNF. 7th PhD Student Day, Lille, 2016, prix de la meilleure communication orale.

Effet d'un environnement pro-inflammatoire sur l'activation des cellules souches tumorales quiescentes dans le mélanome

El Machhour R^{1*}, Ostyn P^{1,3*}, Touil Y^{1,2}, Vandomme J^{1,4}, Flamenco P¹, Masselot B^{1,4},
Ségaré P^{1,4}, Begard S¹, Formstecher P^{1,3,4}, Polakowska R¹

¹Inserm U837 Jean-Pierre Aubert Research Center, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), 1 Place de Verdun, 59045 Lille, France, ²SIRIC ONCOLille, ³CHULille, F-59000 Lille, France, ⁴Univ Nord de France F-59000 Lille.

7^{èmes} Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, 14-16 mai 2014,
2^{ème} prix de la meilleure communication orale.

Il est désormais bien établi que le développement des cancers et leur récurrence en cas de résistance au traitement repose sur la capacité des cellules tumorales à adopter un phénotype quiescent ou dormant. Ces cellules dormantes peuvent persister ainsi pendant de nombreuses années après traitement chez des patients dont la rémission semble complète. Elles persistent dans différents tissus de l'organisme sans entraîner de manifestations cliniques, jusqu'au moment où elles se réactivent et conduisent à la récurrence tumorale. Ainsi, la dormance tumorale est un phénomène réversible mais les mécanismes qui contrôlent l'activation des cellules tumorales quiescentes restent mal connus. En outre, pendant l'inflammation, le rôle du microenvironnement tumoral est essentiel, notamment par le biais d'interactions cellulaires et de facteurs diffusibles divers, par ailleurs lié à l'augmentation de l'incidence du cancer.

Notre objectif est de décrypter l'implication d'un environnement pro-inflammatoire dans le switch phénotypique des cellules tumorales quiescentes. Dans ce but, nous avons utilisé un système d'expression inductible de la GFP couplé à l'histone 2B permettant d'identifier les cellules quiescentes (H2B-GFP+) dans un modèle de culture en 3D qui est celui des équivalents de peau. Ce modèle a l'avantage de recréer une architecture tissulaire plus proche de la physiologie. Afin de mimer l'environnement inflammatoire observé chez certains patients *in vivo*, nous avons opté pour une approche plus globale. Nous avons préparé des milieux conditionnés, obtenus après stimulation avec des anticorps anti CD3/CD28 de lymphocytes humains isolés. Ce modèle a été utilisé afin d'étudier les effets de l'inflammation sur la transition des cellules tumorales de mélanome de l'état quiescent à l'état activé.

Nos résultats suggèrent que l'environnement pro-inflammatoire semble augmenter la proportion des mélanocytes H2B-GFP+, qualifiés de « label retaining cells ». Par ailleurs, le prétraitement des cellules de mélanome avec des milieux conditionnés induit une augmentation du nombre de mélanosphères formées, provoque un enrichissement en marqueurs de cellules souches du mélanome (ABCB5) et augmente la capacité de ces cellules à exclure la rhodamine 123. Dans les équivalents de peau, la présence des milieux conditionnés, semble empêcher la différenciation des cellules de mélanome et augmenter le compartiment des cellules souches.

En conclusion, ces données montrent qu'un environnement inflammatoire, induit par les milieux conditionnés, provoque un enrichissement du compartiment des cellules souches dans les équivalents de peau. Par conséquent, le contrôle de l'inflammation et des voies de signalisation impliquées dans le maintien de la dormance tumorale, au cours du traitement de la tumeur initiale, constituerait une bonne stratégie thérapeutique dans la lutte contre les récurrences du cancer.

Mots clef: cellules tumorales quiescentes, cellules souches, récurrence tumorale, mélanome, inflammation

TNF α expands the label retaining cell compartment in melanoma

Ostyn Pauline^{1*}, El Machhour Raja^{1*}, Begard Séverine¹, Vandomme Jérôme^{1,2}, Flamenco Pilar¹, Masselot Bernadette^{1,2}, Ségard Pascaline^{1,2}, Formstecher Pierre^{1,2,3}, Touil Yasmine^{1,4*} and Polakowska Renata^{1*}

¹Inserm U837 Jean-Pierre Aubert Research Center, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), 1 Place de Verdun, 59045 Lille, France, ²Univ Nord de France F-59000 Lille, France, ³CHULille, F-59000 Lille, France, ⁴SIRIC ONCOLille.

*These authors contributed equally to this work.

1st ONCOLille Symposium on Tumor Dormancy, Lille, 2014, présentation affichée.

Accumulating data suggest that both cancer development and recurrence depend on the ability of resistant tumor cells to adopt a quiescent or dormant phenotype following treatment. These dormant cells reside in various tissues of patients in complete remission without any clinical manifestation until they reactivate and cause tumor recurrence. Mechanisms that control the activation of quiescent tumor cells remain poorly understood, however, the tumor microenvironment, cellular interactions and various diffusible factors appear essential.

Herein, our goal is to decipher whether a major pro-inflammatory cytokine, Tumor Necrosis Factor α (TNF α) contributes to the quiescence/activation phenotypic switch in melanoma. For this purpose, we used a 3D melanosphere model in which to reconstitute the *in vivo*-relevant cellular heterogeneity and tumor organization and an inducible histone 2B coupled to the GFP (H2B-GFP) expression system to identify the quiescent cell compartment and to monitor the TNF α -induced changes.

Our results suggest that TNF α increases the proportion of H2B-GFP-positive, label retaining cells (LRC) in melanospheres. The LRCs were enriched in melanoma stem cell markers, ABCB5 and VEGFR and this was upregulated by TNF α . Interestingly, inactivation of the PI3K/Akt signaling pathway by LY294002 inhibitor abolished these effects.

In conclusion, these results show that the pro-inflammatory environment causes expansion of the quiescent, stem cell compartment in tumor-like melanospheres and suggest that this effect may be responsible for recurrence of more aggressive melanoma.

Keywords: Tumor cell quiescent, stem cell, tumor recurrence, melanoma, inflammation

TNF expands the label retaining cell compartment in melanoma

Ostyn Pauline^{*1,4}, El Machhour Raja^{*1}, Begard Séverine¹, Kotecki Nuria^{1,4}, Vandomme Jérôme^{1,2}, Flamenco Pilar^{1,3}, Masselot Bernadette^{1,2}, Ségard Pascaline^{1,2}, Formstecher Pierre^{1,2,4}, Touil Yasmine^{*1,5}, Polakowska Renata^{*1}

^{*} Equal contribution

¹Inserm U837 Jean-Pierre Aubert Research Center, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), ²Univ Lille Nord de France F-59000 Lille, France, ³Inserm U1003, Villeneuve d'Ascq, France, ⁴CHULille, F-59000 Lille, France, ⁵SIRIC ONCOLille, Lille, France

pauline.ostyn@inserm.fr

Introduction

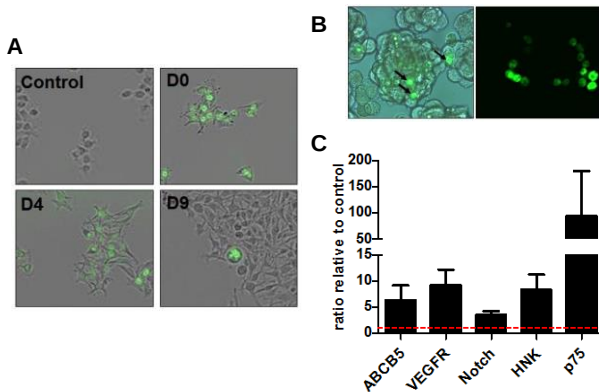
Accumulating data suggest that both cancer development and recurrence depend on the ability of resistant tumor cells to adopt a quiescent or dormant phenotype following treatment and cause tumor relapse. Mechanisms that control the activation of quiescent tumor cells in melanoma remain poorly understood.

→ Our goal is to decipher whether a major pro-inflammatory cytokine, Tumor Necrosis Factor (TNF) contributes to the quiescence/activation phenotypic switch in melanoma.

Methods and Results

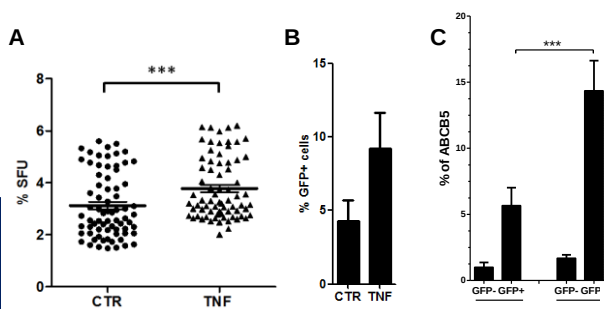
Detection of label retaining melanoma stem cells *in vitro*

→ Quiescent stem cells dilute the H2B-GFP label tracing their divisional history slower than actively growing cells and are identified as "label retaining cells" (LRC) in monolayer (A) and sphere (B) cultures. LRC overexpress melanoma stem cell surface markers (C), linking GFP+ phenotype to stemness



TNF increases the proportion of label retaining melanoma stem cells

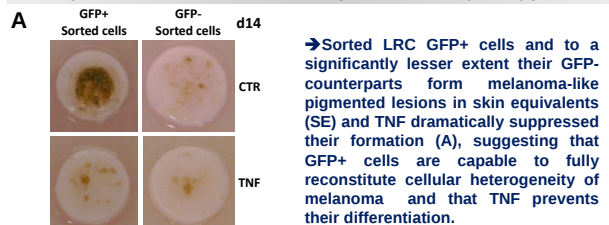
→ TNF increases number of stem cell-related melanospheres (A) and proportion of GFP+ LRCs in melanospheres (B) overexpressing ABCB5 melanoma stem cell marker (C). This demonstrates that TNF enlarges the melanoma stem cell pool



Conclusion

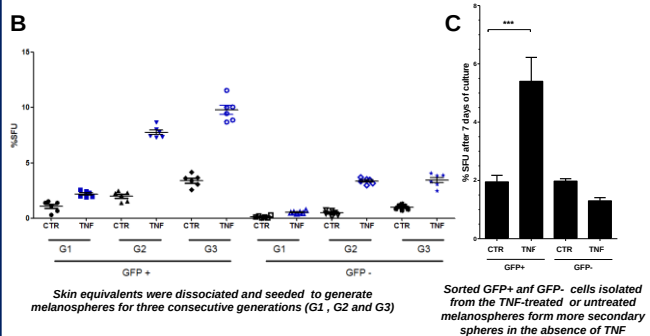
These results show that the inflammatory environment induced by TNF causes expansion of the LRC, stem cell compartment in tumor-like melanospheres and *in vivo*-like SE. This effect may be regulated by the PI3K/Akt signaling pathway and appears to be transferred to the LRC cell progeny. Therefore, by controlling inflammation targeting the LRC melanoma SC subset, we may be able to control cellular dormancy and cancer recurrence.

TNF inhibits melanoma cell differentiation and induces permanent functional changes in the melanoma stem cell compartment of 3D tumor-like sphere and organotypic skin



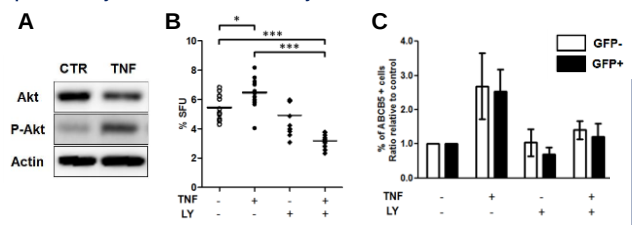
→ Sorted LRC GFP+ cells and to a significantly lesser extent their GFP-counterparts form melanoma-like pigmented lesions in skin equivalents (SE) and TNF dramatically suppressed their formation (A), suggesting that GFP+ cells are capable to fully reconstitute cellular heterogeneity of melanoma and that TNF prevents their differentiation.

→ The GFP+TNF-treated SE are enriched for sphere-initiating and self-renewing cells despite the TNF withdrawal. This property progressively increases with the consecutive generations of GFP+ but is exhausted in GFP- subset (B). Only the GFP+ stem cell subset appears to retain the "memory" of TNF exposure (C).



Inactivation of Akt signaling pathways abolishes TNF effect on the melanoma stem cell compartment

→ TNF upregulates levels of active Akt (p-Akt) (A). AKT inactivation by 10 μ M LY294002 inhibitor suppresses TNF-induced sphere formation efficiency (B), and overexpression of ABCB5 melanoma stem cell marker (C), suggesting that TNF prevents asymmetric and stimulates symmetric self-renewal.



3D Skin equivalent model of melanoma to study relationship between cellular quiescence/activation, chemoresistance and tumor dormancy. Effect of TNF

Pauline Ostyn^{1, 3*}, Raja El-Machhour^{1*}, Séverine Bégard¹, Nuria Kotecki¹, Jérôme Vandomme^{1, 2}, Pilar Flamenco¹, Pascaline Ségard^{1, 2}, Bernadette Masselot^{1, 2}, Pierre Formstecher^{1, 2, 3}, Yasmine Touil^{1, 4*} & Renata Polakowska^{1*}

¹UMR-S 1172 Jean-Pierre Aubert Research Center, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), 1 Place de Verdun 59045, Lille Cedex, France. ²Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France. ³CHRU Lille, F-59000 Lille, France. ⁴SIRIC ONCOLille, Lille, France.

*Equal contribution

6th PhD Student Day, Lille, 2015, communication orale.

It is well established that inflammation promotes cancer, including melanoma, although the exact mechanisms involved are less known. In this study, we tested the hypothesis that inflammatory factors affect the cancer stem cell (CSC) compartment responsible for tumor development and relapse. For this, we used a GFP inducible expression system coupled to histone 2B to identify quiescent cells (H2B-GFP+) in sphere and skin equivalent models.

We determined that tumor necrosis factor (TNF), which is a classical pro-inflammatory cytokine, enlarged the CSC pool of GFP+ label-retaining cells (LRCs) in tumor-like melanospheres. Although these cells acquired melanoma stem cell markers, including ABCB5, and self-renewal ability, they lost their capacity to differentiate, as evidenced by the diminished MelanA expression in melanosphere cells and the loss of pigmentation in skin equivalent model. The undifferentiated cell phenotype could be reversed by LY294002, which is an inhibitor of the PI3K/AKT signaling pathway. Importantly, the changes induced by a transient exposure to TNF were long-lasting and observed for many generations after TNF withdrawal.

We conclude that TNF targets the quiescent/slow-cycling melanoma SC compartment and promotes PI3K/AKT-driven expansion of melanoma SCs most likely by preventing their asymmetrical self-renewal. This TNF effect is maintained and transferred to descendants of LRC CSCs and is manifested in the absence of TNF, suggesting that a transient exposure to inflammatory factors imprints long-lasting molecular and/or cellular changes with functional consequences long after inflammatory signal suppression. Clinically, these results may translate into an inflammation-triggered accumulation of quiescent/slow-cycling CSCs and a post-inflammatory onset of an aggressive tumor.

Effet d'un environnement pro-inflammatoire sur l'activation des cellules souches tumorales quiescentes dans le mélanome

El Machhour R^{1*}, Ostyn P^{1, 4*}, Touil Y^{1, 2}, Vandomme J^{1, 3}, Flamenco P¹, Masselot B^{1, 3},
Ségaré P^{1, 3}, Begard S¹, Formstecher P^{1, 3, 4}, Polakowska R¹

¹. Inserm U837 Jean-Pierre Aubert Research Center, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), ². SIRIC ONCOLille, ³. Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France, ⁴. CHULille, F-59000 Lille, France

* Contribution égale

15^{ème} Journée André Verbert, Lille, 2015, présentation affichée.

Il est désormais bien établi que le développement des cancers et leur récurrence en cas de résistance au traitement repose sur la capacité des cellules tumorales à adopter un phénotype quiescent ou dormant. Ces cellules dormantes peuvent persister ainsi pendant de nombreuses années après traitement chez des patients dont la rémission semble complète. Elles persistent dans différents tissus de l'organisme sans entraîner de manifestations cliniques, jusqu'au moment où elles se réactivent et conduisent à la récurrence tumorale. Ainsi, la dormance tumorale est un phénomène réversible mais les mécanismes qui contrôlent l'activation des cellules tumorales quiescentes restent mal connus. En outre, pendant l'inflammation, le rôle du microenvironnement tumoral est essentiel, notamment par le biais d'interactions cellulaires et de facteurs diffusibles divers, par ailleurs lié à l'augmentation de l'incidence du cancer.

Notre objectif est de décrypter l'implication d'un environnement pro-inflammatoire dans le switch fonctionnel et phénotypique des cellules tumorales quiescentes. Dans ce but, nous avons utilisé un système d'expression inducible de la GFP couplé à l'histone 2B permettant d'identifier les cellules quiescentes (H2B-GFP+) dans des modèles de culture en 3D qui sont ceux des équivalents de peau et des mélanosphères. Ces modèles ont l'avantage de se rapprocher de l'organisation tumorale observée *in vivo*. Afin de mimer l'environnement inflammatoire observé chez certains patients *in vivo*, nous avons opté pour une approche plus globale. Nous avons préparé des milieux conditionnés, obtenus après stimulation avec des anticorps anti CD3/CD28 de lymphocytes humains isolés. Ce modèle a été utilisé afin d'étudier les effets de l'inflammation sur la transition des cellules tumorales de mélanome de l'état quiescent à l'état activé et nous avons également décrypté l'implication d'un facteur pro-inflammatoire le TNF (Tumor Necrosis Factor).

Nos résultats montrent que l'environnement pro-inflammatoire ainsi que le TNF augmente la proportion des mélanocytes H2B-GFP+, qualifiés de « label retaining cells ». Par ailleurs, le prétraitement des cellules de mélanome avec des milieux conditionnés ou du TNF induit une augmentation du nombre de mélanosphères formées, provoque un enrichissement en marqueurs de cellules souches du mélanome (ABCB5) et augmente la capacité de ces cellules à exclure la rhodamine 123. Dans les équivalents de peau, la présence des milieux conditionnés ou de TNF, semble empêcher la différenciation des cellules de mélanome et augmenter le compartiment des cellules souches. Cet effet semble être régi par l'activation de la voie PI3K/Akt.

En conclusion, ces données montrent qu'un environnement inflammatoire, induit par les milieux conditionnés ou le TNF, active les cellules souches de mélanome quiescentes et augmente le compartiment des cellules souches dans les équivalents de peau en empêchant leur différenciation. Par conséquent, le contrôle de l'inflammation et des voies de signalisation impliquées dans le maintien de la dormance tumorale, au cours du traitement de la tumeur initiale, constituerait une bonne stratégie thérapeutique dans la lutte contre les récurrences du cancer.

Effect of TNF on quiescent/activation phenotypic switch of melanoma cancer stem cell

Ostyn Pauline^{* 1, 4}, El Machhour Raja^{* 1}, Ségard Pascaline^{1, 3}, Masselot Bernadette^{1, 3}, Begard Séverine¹, Vandomme Jérôme^{1, 3}, Flamenco Pilar¹, Formstecher Pierre^{1, 3, 4}, Touil Yasmine^{* 1, 2}, Polakowska Renata^{* 1}

^{*} Equal contribution

¹Inserm UMR-S 1172 Jean-Pierre Aubert Research Center, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), SIRIC INCOLL, Lille, France

²Univ Lille Nord de France F-59000 Lille, France, CHU Lille, F-59000 Lille, France

pauline.ostyn@inserm.fr

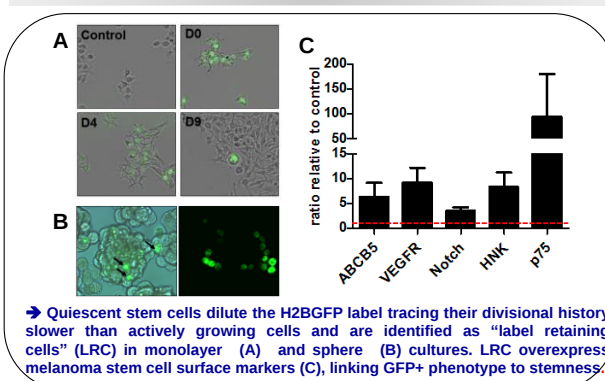
Introduction

Accumulating data suggest that both cancer development and recurrence depend on the ability of resistant tumor cells to adopt a quiescent or dormant phenotype following treatment and cause tumor relapse upon activation. Mechanisms that control the activation of quiescent tumor cells in melanoma remain poorly understood.

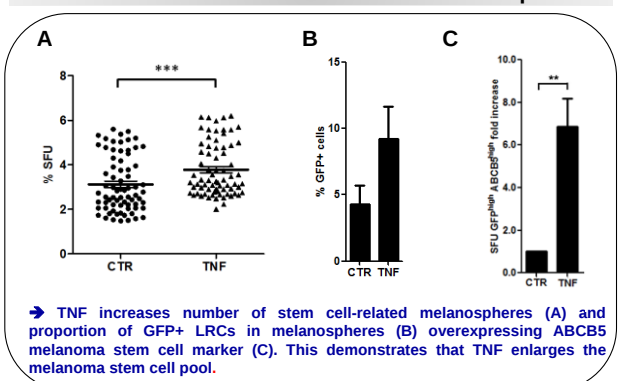
→ Our goal is to decipher whether a major pro-inflammatory cytokine, Tumor Necrosis Factor (TNF) contributes to the quiescence/activation phenotypic switch in melanoma.

Methods and Results

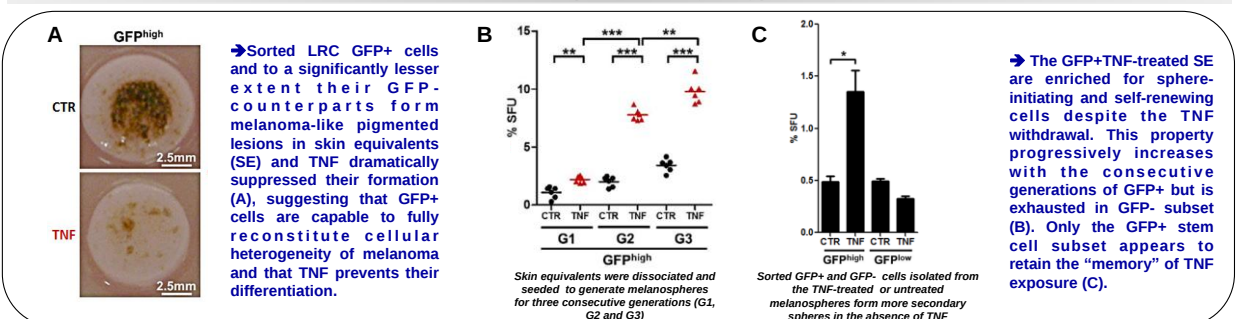
Detection of LRC melanoma stem cells *in vitro*



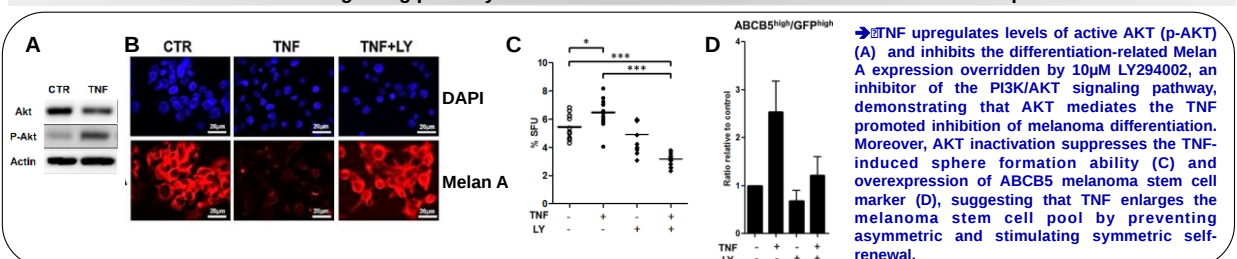
TNF increases the LRC melanoma stem cell pool



TNF inhibits melanoma cell differentiation and induces permanent functional changes in the melanoma stem cell compartment of 3D tumor-like sphere and organotypic skin



Inactivation of Akt signaling pathways abolishes TNF effect on the melanoma stem cell compartment



Conclusion

These results show that the inflammatory environment induced by TNF causes expansion of the LRC, stem cell compartment in tumor-like melanospheres and *in vivo*-like SE. This effect may be regulated by the PI3K/AKT signaling pathway and appears to be transferred to the LRC cell progeny. Therefore, by controlling inflammation targeting the LRC melanoma SC subset, we may be able to control cellular dormancy and cancer recurrence.

Effect of pro-inflammatory environment on quiescent/activation phenotypic switch of melanoma cancer stem cell

El Machhour R^{1*}, Ostyn P^{1*}, Touil Y^{1,2}, Vandomme J^{1,3}, Flamenco P¹, Masselot B^{1,3}, Ségard P^{1,3}, Begard S¹, Formstecher P^{1,3,4}, Polakowska R¹

¹. Inserm U837 Jean-Pierre Aubert Research Center, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), ². SIRIC ONCOLille, ³. Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France, ⁴. CHULille, F-59000 Lille, France

* Equal contribution

International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Annual Meeting, Stockholm, Suède, 24-27 juin 2015, présentation affichée.

Accumulating data suggest that both cancer development and recurrence depend on the ability of resistant tumor cells to adopt a quiescent or dormant phenotype following anti-cancer treatment. Dormant cells persist in various tissues of the body without causing clinical manifestations until they are reactivated and lead to tumor recurrence. Mechanisms that control the activation of quiescent tumor cells remain poorly understood. However, tumor microenvironment, especially inflammatory factors, which increase incidence of cancer, appears to be critical. Our goal is to determine whether a pro-inflammatory environment contributes to the quiescence/activation phenotypic switch in melanoma. For this, we used a GFP inducible expression system coupled to histone2B, to identify quiescent cells (H2B-GFP+) in a 3D skin equivalent (SE) model and conditioned media obtained after stimulation of human lymphocytes with anti CD3/CD28 antibodies (SCM), to mimic the inflammatory environment observed in patients *in vivo*. Our results show that pro-inflammatory environment increased the number of H2B-GFP+ melanoma label retaining cells (LRC), the number of melanospheres and the pool of ABCB5+ and rhodamine 123 excluding melanoma cells, the traits corroborating melanoma stem cell phenotype. In the skin equivalents, the conditioned medium prevented pigmentation of the SE epidermis and increase the stem cell compartment, suggesting that pro-inflammatory factors increase the melanoma stem pool by inhibiting their differentiation fate. These results imply, that by regulating inflammation we may be able to control cellular quiescence linked to tumor dormancy and cancer recurrence.

Effect of pro-inflammatory environment on quiescent/activation phenotypic switch of melanoma cancer stem cell



El Machhour Raja ^{*1}, Ostyn Pauline ^{*1,4}, Touil Yasmine^{1,2}, Masselot Bernadette^{1,3}, Ségard Pascaline^{1,3}, Begard Séverine¹, Vandomme Jérôme^{1,3}, Flamenco Pilar¹, Formstecher Pierre^{1,3,4}, Polakowska Renata¹

^{*} Equal contribution

¹Inserm UMR-S 1172 Jean-Pierre Aubert Research Center, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), ²SIRIC ONCOLille, Lille, France

³Univ Lille Nord de France F-59000 Lille, France, ⁴CHULille, F-59000 Lille, France

pauline.ostyn@inserm.fr

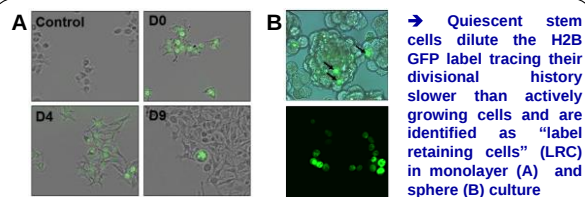
Introduction

Accumulating data suggest that both cancer development and recurrence depend on the ability of resistant tumor cells to adopt a quiescent or dormant phenotype following treatment and cause tumor relapse upon activation. Mechanisms that control the activation of quiescent tumor cells in melanoma remain poorly understood.

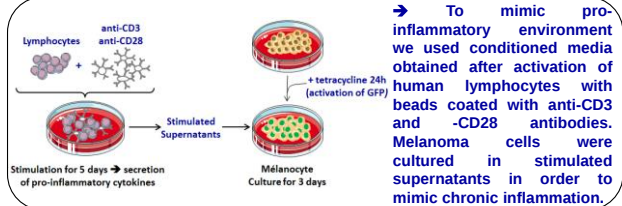
→ Our goal is to decipher whether a pro-inflammatory environment contributes to the quiescence/activation phenotypic switch in melanoma.

Methods and Results

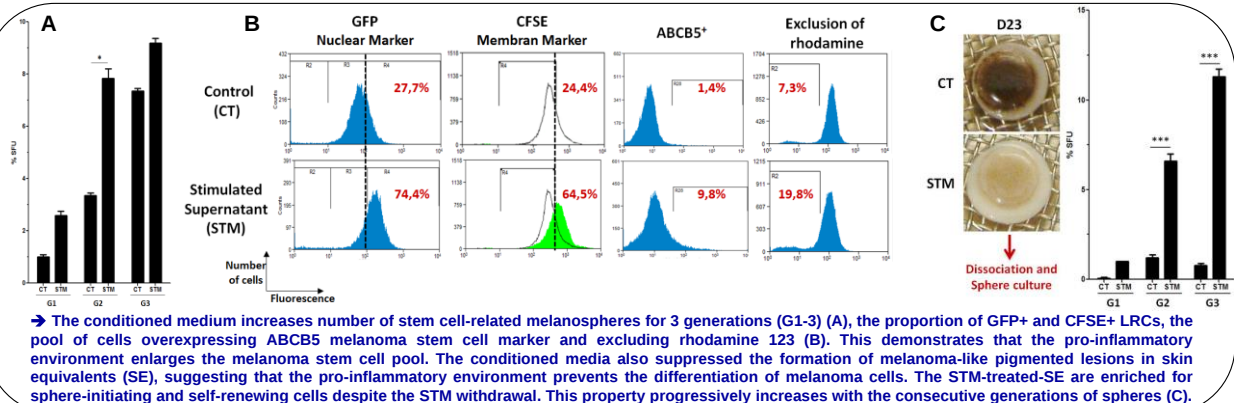
Detection of label retaining melanoma stem cells *in vitro*



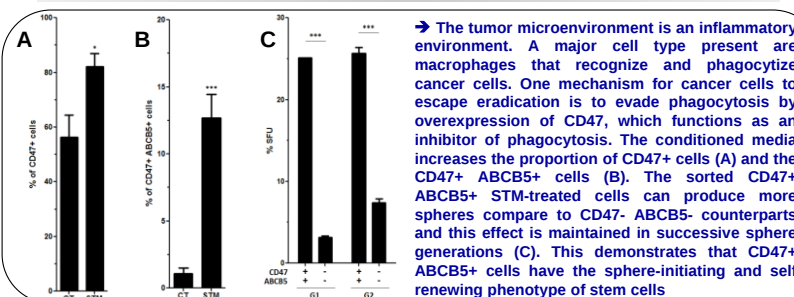
Production of a pro-inflammatory environment



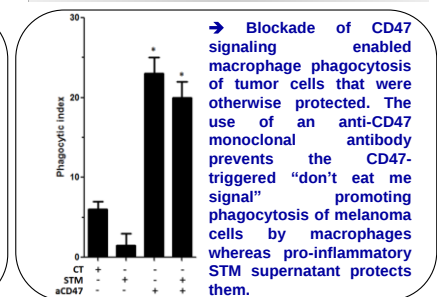
The pro-inflammatory environment increases the proportion of label retaining melanoma stem cells



The pro-inflammatory environment increases the CD47+ ABCB5+ LRCs



Anti-CD47 antibody promotes phagocytosis of melanoma cells



Conclusion

These results show that the inflammatory environment, induced by medium conditioned with stimulated lymphocytes, causes expansion of the LRC stem cell (CD47+ ABCB5+) compartment in tumor-like melanospheres and in the *in vivo*-like skin equivalents and prevents pigmentation of the SE epidermis, suggesting that pro-inflammatory factors increase the melanoma stem cell pool by inhibiting their differentiation fate and CD47-mediated cell death. Therefore, by controlling inflammation targeting the LRC melanoma SC subset, we may be able to control cellular dormancy and cancer recurrence.

Facteurs inflammatoires et contrôle de la quiescence/activation des cellules souches tumorales de mélanome

Ostyn P^{1, 4*}, El Machhour R^{1*}, Masselot B³, Ségard P³, Begard S¹, Formstecher P^{1, 3, 4}, Touil Y^{1, 2*}, Polakowska R^{1*}

^{1.} Inserm UMR-S 1172 Jean-Pierre Aubert Research Center, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), ^{2.} SIRIC ONCOLille, ^{3.} Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France, ^{4.} CHULille, F-59000 Lille, France

* Contribution égale

1^{er} Congrès du GDR 3697 MICRONIT « Microenvironnement des niches tumorales », La Rochelle, 20-22 janvier 2016, communication orale.

Il est désormais bien établi que le développement des cancers et leur récurrence en cas de résistance au traitement repose sur la capacité des cellules tumorales à adopter un phénotype quiescent ou dormant. Ces cellules dormantes peuvent persister ainsi pendant de nombreuses années après traitement chez des patients dont la rémission semble complète. Elles persistent dans différents tissus de l'organisme sans entraîner de manifestations cliniques, jusqu'au moment où elles se réactivent et conduisent à la récurrence tumorale. Ainsi, la dormance tumorale est un phénomène réversible mais les mécanismes qui contrôlent l'activation des cellules tumorales quiescentes restent mal connus. En outre, pendant l'inflammation, le rôle du microenvironnement tumoral est essentiel, notamment par le biais d'interactions cellulaires et de facteurs diffusibles divers, par ailleurs lié à l'augmentation de l'incidence du cancer.

Notre objectif est de décrypter l'implication d'un environnement pro-inflammatoire dans le switch fonctionnel et phénotypique des cellules tumorales quiescentes de mélanome. Dans ce but, nous avons utilisé un système d'expression inductible de la GFP couplé à l'histone 2B permettant d'identifier les cellules quiescentes (H2B-GFP+) dans des modèles de culture en 3D qui sont ceux des équivalents de peau et des mélanosphères. Ces modèles ont l'avantage de se rapprocher de l'organisation tumorale observée *in vivo*. Afin de mimer l'environnement inflammatoire observé chez certains patients *in vivo*, nous avons opté pour une approche globale. Nous avons préparé des milieux conditionnés, obtenus après stimulation avec des anticorps anti CD3/CD28 de lymphocytes humains isolés. Ce modèle a été utilisé afin d'étudier les effets de l'inflammation sur la transition des cellules tumorales de mélanome de l'état quiescent à l'état activé et nous avons également décrypté l'implication d'un facteur pro-inflammatoire le TNF (Tumor Necrosis Factor).

Nos résultats montrent que l'environnement pro-inflammatoire ainsi que le TNF augmente la proportion des mélanocytes H2B-GFP+, qualifiés de « label retaining cells ». Par ailleurs, le prétraitement des cellules de mélanome avec des milieux conditionnés ou du TNF induit une augmentation du nombre de mélanosphères formées, provoque un enrichissement en marqueurs de cellules souches du mélanome (ABCB5) et augmente la capacité de ces cellules à exclure la rhodamine 123. Dans les équivalents de peau, la présence des milieux conditionnés ou de TNF, semble empêcher la différenciation des cellules de mélanome et augmenter le compartiment des cellules souches. Cet effet semble être régi par l'activation de la voie PI3K/Akt.

En conclusion, ces données montrent qu'un environnement inflammatoire, induit par les milieux conditionnés ou le TNF, active les cellules souches de mélanome quiescentes et augmente le compartiment des cellules souches dans les équivalents de peau en empêchant leur différenciation. Par conséquent, le contrôle de l'inflammation et des voies de signalisation impliquées dans le maintien de la dormance tumorale, au cours du traitement de la tumeur initiale, constituerait une bonne stratégie thérapeutique dans la lutte contre les récurrences du cancer.

3D models of melanoma to study relationship between cellular quiescence/activation, chemoresistance and tumor dormancy. Effect of TNF

Pauline Ostyn^{1, 3*}, Raja El-Machhour^{1*}, Pascaline Segard^{1, 2}, Bernadette Masselot^{1, 2},
Pierre Formstecher^{1, 2, 3}, Yasmine Touil^{1, 4*} & Renata Polakowska^{1*}

¹Univ. Lille, UMR-S 1172 - JPArc - Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT Neurosciences et Cancer, F-59000 Lille, France, Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), ²Univ Lille Nord de France, F-59000 Lille, France. ³CHULille, F-59000 Lille, France. ⁴SIRIC ONCOLille, Lille, France.

*Equal contribution.

7th PhD Student Day, Lille, 2016, prix de la meilleure communication orale.

Introduction. It is well established that inflammation promotes cancer, including melanoma, although the exact mechanisms involved are less known. In this study, we tested the hypothesis that inflammatory factors affect the cancer stem cell (CSC) compartment responsible for tumor development and relapse.

Methods. For this, we used a GFP inducible expression system coupled to histone 2B to identify quiescent cells (H2B-GFP+) in sphere and skin equivalent models.

Results. We determined that tumor necrosis factor (TNF), which is a classical pro-inflammatory cytokine, enlarged the CSC pool of GFP+ label-retaining cells (LRCs) in tumor-like melanospheres. Although these cells acquired melanoma stem cell markers, including ABCB5, and self-renewal ability, they lost their capacity to differentiate, as evidenced by the diminished MelanA expression in melanosphere cells and the loss of pigmentation in skin equivalent model. The undifferentiated cell phenotype could be reversed by LY294002, which is an inhibitor of the PI3K/AKT signaling pathway. Importantly, the changes induced by a transient exposure to TNF were long-lasting and observed for many generations after TNF withdrawal.

Conclusions. We conclude that TNF targets the quiescent/slow-cycling melanoma SC compartment and promotes PI3K/AKT-driven expansion of melanoma SCs most likely by preventing their asymmetrical self-renewal. This TNF effect is maintained and transferred to descendants of LRC CSCs and is manifested in the absence of TNF, suggesting that a transient exposure to inflammatory factors imprints long-lasting molecular and/or cellular changes with functional consequences long after inflammatory signal suppression. Clinically, these results may translate into an inflammation-triggered accumulation of quiescent/slow-cycling CSCs and a post-inflammatory onset of an aggressive tumor.

Matériels et méthodes

A - Traitements appliqués aux cellules

Les différents traitements appliqués aux cellules sont les suivants :

- PLX4032 ou vemurafenib (Axon Medchem), à la concentration de 5 μ M
- un inhibiteur de la PI3K : le LY294002 (Calbiochem®), à la concentration de 10 μ M
- un inhibiteur de NF κ B (inhibiteur de la phosphorylation d'I κ B α) : le BAY 11-7082 (Calbiochem®), à la concentration de 1 μ M
- un anti-CD47 (BD Pharmingen), à la concentration de 1 μ M

B - Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est réalisée grâce au cytomètre EPICS-CYAN (Beckman-Coulter). Les résultats obtenus sont analysés à l'aide du logiciel Summit 4.3®.

1. Phénotypage des cellules

Les cellules (200 000 cellules/500 μ L) sont incubées avec l'anticorps primaire, dilué au 1/50^e dans du milieu supplémenté avec 10% de sérum de vœu fœtal et 1% de pénicilline/streptomycine (milieu complet), pendant 30 minutes dans la glace et à l'obscurité. A la suite de cette incubation, les cellules sont rincées avec du milieu complet puis incubées avec l'anticorps secondaire, dilué au 1/2000^e dans du milieu complet, pendant 30 minutes dans la glace et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite lavées avec du milieu complet puis resuspendues dans 500 μ L de milieu complet. Le contrôle négatif est représenté par les cellules incubées avec l'anticorps secondaire seul. L'anticorps primaire utilisé est : CD47 (BD Pharmingen) et l'anticorps secondaire utilisé est : Goat anti-mouse Cy5 (Invitrogen®)

2. Etude de la phase G0 du cycle cellulaire

Afin d'étudier la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire, les cellules sont reprises dans 500 μ L de solution de marquage. Cette dernière se compose de Pyronine Y (Life Technologies) à 1 μ g/mL et de Hoechst 33342 (BD Bioscience) à 7 μ g/mL dans du milieu complet. Après une incubation de 35 minutes à 37°C à l'obscurité, les cellules sont conservées à 4°C. Les débris sont exclus de l'analyse.

3. Exclusion de la rhodamine 123

Les cellules (500 000 cellules/500µL) sont incubées dans la solution de marquage, composée de 100ng/mL de rhodamine 123 (Life Technologies) dans du milieu complet, pendant 20min à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées au PBS puis placées à 4°C (afin de bloquer les pompes d'efflux) ou à 37°C pendant une heure (afin de permettre l'efflux de la rhodamine 123) puis conservées à 4°C.

4. Exclusion du CFSE (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester)

Les cellules adhérentes, en plaques 6 puits, sont rincées au PBS puis incubées dans une solution de PBS contenant le CFSE (PromoKine) à la concentration de 1µM pendant 15min à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées au PBS puis incubées dans du milieu complet pendant 15min à température ambiante. Elles sont ensuite récupérées et analysées en cytométrie en flux.

C - Etude de l'expression des gènes au niveau protéique - Phospho Array - Western blot

L'analyse par Phospho Array est réalisée grâce à l'utilisation du kit : « Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit » selon les instructions du fournisseur (R&D Systems).

L'analyse par Western blot est réalisée grâce à l'utilisation de gels NuPAGE 4%–12% Bis-Tris polyacrylamide, selon les instructions du fournisseur (Invitrogen™, St. Aubin, Paris, France).

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : Actine (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), phospho-FOXO3A (Ser253) (Cell signaling), phospho-CREB-1 (Ser133) (Santa Cruz Biotechnologies), phospho-AMPKα1/2 (Thr183/172) (Santa Cruz Biotechnologies), anti-p27 KIP1 (phospho T198) (Abcam), cycline D1 (Santa Cruz Biotechnologies), cycline D2 (Santa Cruz Biotechnologies) et p21 (Santa Cruz Biotechnologies). Les anticorps secondaires utilisés sont : Chicken anti-rabbit IgG Peroxydase Conjugated (Rockland®), Donkey anti-mouse Peroxydase Conjugated (Rockland®) et Chicken anti-goat IgG Peroxydase Conjugated (Rockland®). Le témoin utilisé est l'actine (A5441) (Sigma®).

L'immunodétection a été réalisée en utilisant un kit ECL+ de Amersham. Les résultats représentés en terme d'expression de protéines ont été obtenus à l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ®.

D - Production des surnageants

Des lymphocytes humains du sang périphérique (PBL) (fournit par l'EFS) sont isolés par Ficoll, grâce à l'utilisation de milieu de séparation de lymphocytes (PAA Laboratories – GE Healthcare Life Sciences). Ils sont ensuiteensemencés en T75 à la densité de 1 million par mL, en présence ou non de billes coatées avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (Miltenyi Biotech) pour une durée de 5 jours. A l'issue de ces 5 jours, le contenu des T75 est récupéré et centrifugé. Les surnageants de lymphocytes stimulés par les billes et non stimulés par les billes sont récupérés et conservés à -80°C.

E - Phagocytose des cellules de mélanome par des macrophages

Des monocytes (THP1) sont différenciés en macrophages grâce à l'utilisation de PMA (Phorbol Myristate Acetate) pendant 3 jours (Sigma), ils sont ensuiteensemencés en plaques 24 puits à raison de 125 000 cellules par puits. Après 5 jours, des cellules de mélanome H2B-GFP positives sont ajoutées aux macrophages à la densité de 25 000 cellules par puits. La plaque 24 puits est ensuite placée à 37°C et des photos sont prises toutes les deux heures. L'expression de l'H2B-GFP permet de détecter et de dénombrer les cellules de mélanome phagocytées par les macrophages.

F - Greffe d'équivalents de peau à des souris immunodéficientes BALB/c-nude

Cinq souris femelles Balb/c An NRJ-Fox1nv (Janvier Labs, France) ont été greffées avec un équivalent de peau non traité au TNF et cinq autres souris ont été greffées avec un équivalent de peau traité au TNF (à 500ng/mL pendant 3 semaines). Les souris ont été sacrifiées à l'apparition de tumeurs ou, au plus tard, 4 mois après la greffe.

G - Injection de cellules de mélanome à des souris immunodéficientes CB17 SCID

Dix souris femelles CB17SCID âgées de 8 semaines ont reçues une injection sous-cutanée de 200 000 cellules de mélanome SK-Mel28 traitées ou non au TNF. Après induction de l'H2B-GFP et de l'H2B-mCherry, les cellules ont été traitées ou non au TNF à 500ng/mL pour une durée de 7 jours. Les cellules ont ensuite été triées sur la base de l'expression de la GFP ou de mCherry et remises en culture sur la nuit. Le lendemain, les cellules ont été collectées et mixées de la manière suivante:

- 100 000 cellules GFP positives + 100 000 cellules mCherry négatives, non traitées
- 100 000 cellules GFP négatives + 100 000 cellules mCherry positives, non traitées
- 100 000 cellules GFP positives + 100 000 cellules mCherry négatives, traitées au TNF
- 100 000 cellules GFP négatives + 100 000 cellules mCherry positives, traitées au TNF

Les cellules ont été resuspendues dans du PBS puis injectées aux souris de la manière suivante:

- GFP+ / mCherry- non traitées = 4 souris
- GFP- / mCherry+ non traitées = 2 souris
- GFP+ / mCherry- traitées au TNF = 2 souris
- GFP- / mCherry+ traitées au TNF = 2 souris

H – Analyses statistiques

Le logiciel *GraphPad Prism®* a été utilisé afin de réaliser les tests statistiques. Un test d'analyse de variance, le test ANOVA a été utilisé afin de comparer les différents échantillons avec l'échantillon témoin. La probabilité obtenue après l'analyse statistique reflète le degré de différence significative. Ainsi * signifie que la probabilité est inférieure à 0,05, ** signifie que la probabilité est inférieure à 0,01, et *** signifie que la probabilité est inférieure 0.001.

Bibliographie

Bibliographie

- Adam, A.P., George, A., Schewe, D., Bragado, P., Iglesias, B.V., Ranganathan, A.C., Kourtidis, A., Conklin, D.S., & Aguirre-Ghiso, J.A. Computational identification of a p38SAPK-regulated transcription factor network required for tumor cell quiescence. *Cancer Res.* 2009 Jul 15;69(14):5664-72.
- Aggarwal., Bharat., Subash., Gupta, & Hye Kim. Historical Perspectives on Tumor Necrosis Factor and Its Superfamily: 25 Years Later, a Golden Journey. *Blood* 119, n° 3 (2012): 651- 65.
- Aguirre-Ghiso, J.A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer.* 2007 Nov;7(11):834-46.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., & Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 1;100(7):3983-8.
- Al-Lamki, R.S., Wang, J., Yang, J., Burrows, N., Maxwell, P.H., Eisen, T., Warren, A.Y., Vanharanta, S., Pacey, S., Vandenabeele, P., *et al.* Tumor necrosis factor receptor 2-signaling in CD133-expressing cells in renal clear cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016 Mar 16.
- Allavena, P., Garlanda, C., Borrello, M.G., Sica, A., & Mantovani, A. Pathways connecting inflammation and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2008 Feb;18(1):3-10.
- Amabile., Giovanni., & Meissner. Induced Pluripotent Stem Cells: Current Progress and Potential for Regenerative Medicine. *Trends in Molecular Medicine* 15, n° 2 (2009): 59- 68.
- Ando, H., Kondoh, H., Ichihashi, M., & Hearing, V.J. Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. *J Invest Dermatol.* 2007 Apr;127(4):751-61.
- Auxenfans, C., Fradette, J., Lequeux, C., Germain, L., Kinikoglu, B., Bechetoille, N., Braye, F., Auger, F.A., & Damour, O. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. *Eur J Dermatol.* 2009 Mar-Apr;19(2):107-13.
- Barker, N., Van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., Van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature.* 2007 Oct 25;449(7165):1003-7.
- Barker, N., & Clevers, H. Lineage tracing in the intestinal epithelium. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2010 May;Chapter 5:Unit5A.4.
- Bataille, V. Melanoma. Shall We Move Away from the Sun and Focus More on Embryogenesis, Body Weight and Longevity? *Medical Hypotheses* 81, n° 5 (2013): 846- 50.
- Bhat-Nakshatri, P., Hitesh A., Christopher B., Patricia P.F., Robert G., Sunil B., Edward F. S., & Harikrishna N. SLUG/SNAI2 and Tumor Necrosis Factor Generate Breast Cells with CD44+/CD24- Phenotype. *BMC Cancer* 10 (2010): 411.
- Blanpain, C., Williams, E., Lowry., Geoghegan, A., Polak, L., & Fuchs, E. Self-Renewal, Multipotency, and the Existence of Two Cell Populations within an Epithelial Stem Cell Niche. *Cell* 118, n° 5 (2004): 635- 48.
- Blanpain, C., & Fuchs, E. Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22 (2006): 339- 73.

Bibliographie

- Blanpain, C., Horsley, V., & Fuchs, E. Epithelial Stem Cells: Turning over New Leaves. *Cell* 128, n° 3 (2007): 445- 58.
- Blanpain, C., & Fuchs, E. Stem cell plasticity. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. *Science*. 2014 Jun 13;344(6189):1242281.
- Bleau, A.M., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E.I., Huse, J.T., Brennan, C.W., & Holland, E.C. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell*. 2009 Mar 6;4(3):226-35.
- Boiko, A.D., Razorenova, O.V., Van de Rijn, M., Swetter, S.M., Johnson, D.L., Ly, D.P., Butler, P.D., Yang, G.P., Joshua, B., Kaplan, M.J., *et al.* Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*. 2010 Jul 1;466(7302):133-7.
- Bonnet, D., & Dick, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997 Jul;3(7):730-7.
- Boyer, M. J., & Cheng, T. The CDK Inhibitors: Potential Targets for Therapeutic Stem Cell Manipulations? *Gene Therapy* 15, n° 2 (2008): 117- 25.
- Brohem, CA., Cardeal, L.B., Tiago, M., Soengas, M.S., Barros, S.B., & Maria-Engler, S.S. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011 Feb;24(1):35-50.
- Brozyna, A.A., Van Middlesworth, L., & Slominski, A.T. Inhibition of melanogenesis as a radiation sensitizer for melanoma therapy. *Int J Cancer*. 2008 Sep 15;123(6):1448-56.
- Carswell, E.A., Old, L., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. An Endotoxin-Induced Serum Factor That Causes Necrosis of Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, n° 9 (1975): 3666- 70.
- Cencioni, C., Spallotta, F., Greco, S., Martelli, F., Zeiher, A.M., & Gaetano, C. Epigenetic mechanisms of hyperglycemic memory. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Jun;51:155-8.
- Challen., G.A., & Little, M.H. A Side Order of Stem Cells: The SP Phenotype. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24, n° 1 (2006): 3- 12.
- Chambard, J.C., Lefloch, R., Pouysségur, J., & Lenormand, P. ERK Implication in Cell Cycle Regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1773, n° 8 (2007): 1299- 1310.
- Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Tang, C., Jan, M., Weissman-Tsukamoto, R., Zhao, F., Park, C.Y., Weissman, I.L., & Majeti, R. Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2011 Feb 15;71(4):1374-84.
- Chao, M.P., Weissman, I.L., & Majeti, R. The CD47-SIRPα pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Curr Opin Immunol*. 2012 Apr;24(2):225-32.
- Chartrain, M., Riond, J., Stennevin, A., Vandenberghe, I., Gomes, B., Lamant, L., Meyer, N., Gairin, J.E., Guilbaud, N., & Annereau, J.P. Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e36762.
- Chen, F.M., Wu, L.A., Zhang, M., Zhang, R., & Sun, H.H. Homing of Endogenous Stem/progenitor Cells for in Situ Tissue Regeneration: Promises, Strategies, and Translational Perspectives. *Biomaterials* 32, n° 12 (2011): 3189- 3209.

Bibliographie

- Chen, D., Jiao, Y., & Torquato, S. A cellular automaton model for tumor dormancy: emergence of a proliferative switch. *PLoS One*. 2014 Oct 16;9(10):e109934.
- Cheung., Tom., & Rando. Molecular Regulation of Stem Cell Quiescence. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14, n° 6 (2013): 329- 40.
- Cichorek., Mirosława., Wachulska., Stasiewicz., & Tymińska. Skin Melanocytes: Biology and Development. *Postępy Dermatologii i Alergologii* 30, n° 1 (2013): 30- 41.
- Crea, F., Ridzwan, N., Saidy, N., Collins, C.C., & Wang, Y. The Epigenetic/noncoding Origin of Tumor Dormancy. *Trends in Molecular Medicine* 21, n° 4 (2015): 206- 11.
- Croft, M., Benedict, C.A., & Ware, C.F. Clinical Targeting of the TNF and TNFR Superfamilies. *Nature Reviews. Drug Discovery* 12, n° 2 (2013): 147- 68.
- Davey, R.J., Van der Westhuizen, A., & Bowden, N.A. Metastatic melanoma treatment: Combining old and new therapies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Feb;98:242-53.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., *et al*. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.
- Dean, M. ABC Transporters, Drug Resistance, and Cancer Stem Cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 14, n° 1 (2009): 3- 9.
- Deroose, J.P., Eggermont, A.M., Van Geel, A.N., & Verhoef, C. Isolated limb perfusion for melanoma in-transit metastases: developments in recent years and the role of tumor necrosis factor alpha. *Curr Opin Oncol*. 2011 Mar;23(2):183-8.
- Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J., & Wicha, M.S. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*. 2003 May 15;17(10):1253-70.
- Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W.M., Clarke, M.F., & Wicha, M.S. Stem Cells in Normal Breast Development and Breast Cancer. *Cell Proliferation* 36 Suppl 1 (2003): 59- 72.
- Dupin, E. Phenotypic plasticity of neural crest-derived melanocytes and Schwann cells. *Biol Aujourdhui*. 2011;205(1):53-61.
- Dupin, E., & Sommer, L. Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood. *Dev Biol*. 2012 Jun 1;366(1):83-95.
- Dupin, E., & Coelho-Aguiar, J.M. Isolation and differentiation properties of neural crest stem cells. *Cytometry A*. 2013 Jan;83(1):38-47.
- Dylla, S.J., Beviglia, L., Park, I.K., Chartier, C., Raval, J., Ngan, L., Pickell, K., Aguilar, J., Lazetic, S., Smith-Berdan, S., *et al*. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One*. 2008 Jun 18;3(6):e2428.
- Eves, P., Layton, C., Hedley, S., Dawson, R.A., Wagner, M., Morandini, R., Ghanem, G., & Mac Neil, S. Characterization of an in vitro model of human melanoma invasion based on reconstructed human skin. *Br J Dermatol*. 2000 Feb;142(2):210-22.
- Fedorenko, I. V., Gibney, G. T., Sondak, V. K., & Smalley, K. S. M. Beyond BRAF: Where next for Melanoma Therapy? *British Journal of Cancer* 112, n° 2 (2015): 217- 26.

Bibliographie

- Fellermann, K. Adverse events of tumor necrosis factor inhibitors. *Dig Dis.* 2013;31(3-4):374-8.
- Fleischman, A.G., Aichberger, K.J., Luty, S.B., Bumm, T.G., Petersen, C.L., Doratotaj, S., Vasudevan, K.B., LaTocha, D.H., Yang, F., Press, R.D., *et al.* TNF α facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2011 Dec 8;118(24):6392-8.
- Foletto, M.C., & Haas, S.E. Cutaneous melanoma: new advances in treatment. *An Bras Dermatol.* 2014 Mar-Apr;89(2):301-10.
- Forni, M.F., Trombetta-Lima, M., & Sogayar, M.C. Stem Cells in Embryonic Skin Development. *Biological Research* 45, n° 3 (2012): 215- 22.
- Fuchs, E., & Raghavan, S. Getting under the Skin of Epidermal Morphogenesis. *Nature Reviews. Genetics* 3, n° 3 (2002): 199- 209.
- Fuchs, E., Tumber, T., & Guasch, G. Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche. *Cell* 116, n° 6 (2004): 769- 78.
- Fuchs, E. Scratching the Surface of Skin Development. *Nature* 445, n° 7130 (2007): 834- 42.
- Fuchs, E., & Chen, T. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep.* 2013 Jan;14(1):39-48.
- Fukushima, K., Tsuchiya, K., Kano, Y., Horita, N., Hibiya, S., Hayashi, R., Kitagaki, K., Negi, M., Itoh, E., Akashi, T., *et al.* Atonal homolog 1 protein stabilized by tumor necrosis factor α induces high malignant potential in colon cancer cell line. *Cancer Sci.* 2015 Aug;106(8):1000-7.
- Gariyban, L., & Fisher, D.E. How sunlight causes melanoma. *Curr Oncol Rep.* 2010 Sep;12(5):319-26.
- Giancotti, F.G. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell.* 2013 Nov 7;155(4):750-64.
- Giblin, A.V., & Thomas, J. M. Incidence, Mortality and Survival in Cutaneous Melanoma. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery: JPRAS* 60, n° 1 (2007): 32- 40.
- Goulas, S., Conder, R., & Knoblich, J.A. The Par complex and integrins direct asymmetric cell division in adult intestinal stem cells. *Cell Stem Cell.* 2012 Oct 5;11(4):529-40.
- Grichnik, J.M. Melanoma, Nevogenesis, and Stem Cell Biology. *The Journal of Investigative Dermatology* 128, n° 10 (2008): 2365- 80.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):883-99.
- Hanahan, D., & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- Hattori, T., Hayashi, H., Chiba, T., & Onozaki, K. Activation of two distinct anti-proliferative pathways, apoptosis and p38 MAP kinase-dependent cell cycle arrest, by tumor necrosis factor in human melanoma cell line A375. *Eur Cytokine Netw.* 2001 Apr-Jun;12(2):244-52.
- He., Shenghui, Nakada, D., & Morrison, S.J. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annual*

Bibliographie

Review of Cell and Developmental Biology 25 (2009): 377- 406.

Ho, K.K., Myatt, S.S., & Lam, E.W.F. Many Forks in the Path: Cycling with FoxO. *Oncogene* 27, n° 16 (2008): 2300- 2311.

Hoek, K.S., & Goding, C.R. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010 Dec;23(6):746-59.

Hoekstra, H.J., Veerman, K., & Van Ginkel, R.J. Isolated limb perfusion for in-transit melanoma metastases: melphalan or TNF-melphalan perfusion? *J Surg Oncol.* 2014 Mar;109(4):338-47.

Hoerter, J.D, Bradley, P., Casillas, A., Chambers, D., Weiswasser, B., Clements, L., Gilbert, S., & Jiao, A. Does melanoma begin in a melanocyte stem cell? *J Skin Cancer.* 2012;2012:571087.

Holderfield, M., Marian, M., Deuker., McCormick, F., & McMahon, M. Targeting RAF Kinases for Cancer Therapy: BRAF-Mutated Melanoma and beyond. *Nature Reviews. Cancer* 14, n° 7 (2014): 455- 67.

Hsu, Y.C., Li, L., & Fuchs, E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med.* 2014 Aug;20(8):847-56.

Huang, H., Zhao, N., Xu, X., Xu, Y., Li, S., Zhang, J., & Yang, P. Dose-specific effects of tumor necrosis factor alpha on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Prolif.* 2011 Oct;44(5):420-7.

Hu-Lieskovan., Siwen., Robert, L., Homet Moreno, B., & Ribas, A. Combining Targeted Therapy with Immunotherapy in BRAF-Mutant Melanoma: Promise and Challenges. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 32, n° 21 (2014): 2248- 54.

Ilieva, K.M., Correa, I., Josephs, D.H., Karagiannis, P., Egbuniwe, I.U., Cafferkey, V., Spicer, J.F., Harries, M., Nestle, F.O., Lacy, K.E., *et al.* Effects of BRAF Mutations and BRAF Inhibition on Immune Responses to Melanoma. *Molecular Cancer Therapeutics* 13, n° 12 (2014): 2769- 83.

Islam, F., Gopalan, V., Smith, R.A., & Lam, A.K. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res.* 2015 Jul 1;335(1):135-47.

Ito, M., Liu, Y., Yang, Z., Nguyen, J., Liang, F., Morris, R.J., & Cotsarelis, G. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med.* 2005 Dec;11(12):1351-4. Epub 2005 Nov 20.

Ito, S., & Wakamatsu, K. Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. *Photochem Photobiol.* 2008 May-Jun;84(3):582-92.

Jaenisch, R., & Young, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell.* 2008 Feb 22;132(4):567-82.

Jaiswal, S., Jamieson, C.H., Pang, W.W., Park, C.Y., Chao, M.P., Majeti, R., Traver, D., Van Rooijen, N., & Weissman, I.L. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell.* 2009 Jul 23;138(2):271-85.

Bibliographie

- Jiang, B.H., & Liu, L.Z. PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. *Advances in Cancer Research* 102 (2009): 19- 65.
- Jones, D.L., & Wagers, A.J. No Place like Home: Anatomy and Function of the Stem Cell Niche. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9, n° 1 (2008): 11- 21.
- Kaiser, J. The cancer stem cell gamble. *Science*. 2015 Jan 16;347(6219):226-9.
- Kalas, W., Swiderek, E., Switalska, M., Wietrzyk, J., Rak, J., & Strzadala, L. Thrombospondin-1 receptor mediates autophagy of RAS-expressing cancer cells and triggers tumour growth inhibition. *Anticancer Res.* 2013 Apr;33(4):1429-38.
- Kalish, R.S., Simon, M., Harrington, R., Gottlieb, A.B., & Gilhar, A. Skin equivalent and natural killer cells: a new model for psoriasis and GVHD. *J Invest Dermatol.* 2009 Mar;129(3):773-6.
- Kanitakis, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002 Jul-Aug;12(4):390-9; quiz 400-1.
- Khaled, M., Larribere, L., Bille, K., Ortonne, J.P., Ballotti, R., & Bertolotto, C. Microphthalmia Associated Transcription Factor Is a Target of the Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway. *The Journal of Investigative Dermatology* 121, n° 4 (2003): 831- 36. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12420.x.
- Knoblich, J.A. Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell* 132, n° 4 (2008): 583- 97.
- Kops, G.J., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W., Coffey, P.J., Huang, T.T., Bos, J.L., Medema, R.H., & Burgering, B.M. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*. 2002 Sep 19;419(6904):316-21.
- Kouklakis, G., Efremidou, E.I., Pitiakoudis, M., Liratzopoulos, N., & Polychronidis, A.Ch. Development of primary malignant melanoma during treatment with a TNF- α antagonist for severe Crohn's disease: a case report and review of the hypothetical association between TNF- α blockers and cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2013;7:195-9.
- Kreso, A., & Dick, J.E. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell.* 2014 Mar 6;14(3):275-91.
- Kundu, J.K., & Surh, Y.J. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med.* 2012 May 1;52(9):2013-37.
- Ladányi, A., Nagy, J.O., Jeney, A., & Tímár, J. Cytokine sensitivity of metastatic human melanoma cell lines simultaneous inhibition of proliferation and enhancement of gelatinase activity. *Pathol Oncol Res.* 1998;4(2):108-14.
- Lam, E.W.F., Jan, J., Brosens, A.R., Gomes., & Koo, C.Y. Forkhead Box Proteins: Tuning Forks for Transcriptional Harmony. *Nature Reviews. Cancer* 13, n° 7 (2013): 482- 95.
- Lander, A.D., Kimble, J., Clevers, H., Fuchs, E., Montarras, D., Buckingham, M., Calof, A.L., Trumpp, A., & Oskarsson, T. What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC Biol.* 2012 Mar 9;10:19.
- Landsberg, J., Kohlmeyer, J., Renn, M., Bald, T., Rogava, M., Cron, M., Fatho, M., Lennerz, V., Wölfel, T., Hölzel, M., *et al.* Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature*. 2012 Oct 18;490(7420):412-6.

Bibliographie

Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., & Hermoso, M.A. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*. 2014;2014:149185.

Lang, D., Mascarenhas, J.B., & Shea, C.R. Melanocytes, Melanocyte Stem Cells, and Melanoma Stem Cells. *Clinics in Dermatology* 31, n° 2 (2013): 166- 78.

Lebrec, H., Ponce, R., Preston, B.D., Iles, J., Born, T.L., & Hooper, M. Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor inhibition, and cancer risk. *Curr Med Res Opin*. 2015 Mar;31(3):557-74.

Lee, S.H., Hong, H.S., Liu, Z.X., Kim, R.H., Kang, M.K., Park, N.H., & Shin, K.H. TNF α enhances cancer stem cell-like phenotype via Notch-Hes1 activation in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jul 20;424(1):58-64.

Levy, C., Khaled, M., & Fisher, D.E. MITF: Master Regulator of Melanocyte Development and Melanoma Oncogene. *Trends in Molecular Medicine* 12, n° 9 (2006): 406- 14.

Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., *et al*. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2008 May 7;100(9):672-9.

Li, L., & Clevers, H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*. 2010 Jan 29;327(5965):542-5.

Li, L., & Bhatia, R. Stem cell quiescence. *Clin Cancer Res*. 2011 Aug 1;17(15):4936-41.

Li, L., Fukunaga-Kalabis, M., & Herlyn, M. The three-dimensional human skin reconstruct model: a tool to study normal skin and melanoma progression. *J Vis Exp*. 2011 Aug 3;(54). pii: 2937.

Li, F.Z., Dhillon, A.S., Anderson, R.L., McArthur, G., & Ferrao, P.T. Phenotype switching in melanoma: implications for progression and therapy. *Front Oncol*. 2015 Feb 13;5:31.

Lo, J.A., & Fisher, D.E. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science*. 2014 Nov 21;346(6212):945-9.

Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D., & Clarke, M.F. The Biology of Cancer Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23 (2007): 675- 99.

Mackie, R.M., Reid, R., & Junor, B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):567-8.

MacNeil, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):874-80.

Majeti, R., Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Pang, W.W., Jaiswal, S., Gibbs, K.D Jr., Van Rooijen, N., & Weissman, I.L. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*. 2009 Jul 23;138(2):286-99.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. Cancer-Related Inflammation. *Nature* 454, n° 7203 (2008): 436- 44.

Martínez-Esparza, M., Jiménez-Cervantes, C., Beermann, F., Aparicio, P., Lozano, J.A., & García-Borrón, J.C. Transforming growth factor-beta1 inhibits basal melanogenesis in B16/F10 mouse melanoma cells by increasing the rate of degradation of tyrosinase and

Bibliographie

tyrosinase-related protein-1. *J Biol Chem.* 1997 Feb 14;272(7):3967-72.

Martínez-Esparza, M., Jiménez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J.A., & García-Borrón, J.C. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem.* 1998 Jul 1;255(1):139-46.

Marzuka, A., Huang, L., Theodosakis, N., & Bosenberg, M. Melanoma Treatments: Advances and Mechanisms. *J Cell Physiol.* 2015 Nov;230(11):2626-33.

Melnikova, V.O., & Bar-Eli, M. Inflammation and melanoma metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009 Jun;22(3):257-67.

Menzies, A.M., & Long, G.V. Systemic Treatment for BRAF-Mutant Melanoma: Where Do We Go Next? *The Lancet. Oncology* 15, n° 9 (2014): e371-381.

Miyamoto, K., Araki, K.Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., *et al.* Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell.* 2007 Jun 7;1(1):101-12.

Mogi, M., Yang, J., Lambert, J.F., Colvin, G.A., Shiojima, I., Skurk, C., Summer, R., Fine, A., Quesenberry, P.J., & Walsh, K. Akt signaling regulates side population cell phenotype via Bcrp1 translocation. *J Biol Chem.* 2003 Oct 3;278(40):39068-75.

Mort, R.L., Jackson, I.J., & Patton, E.E. The Melanocyte Lineage in Development and Disease. *Development (Cambridge, England)* 142, n° 7 (2015): 1387.

Mueller, M.T., Hermann, P.C., Witthauer, J., Rubio-Viqueira, B., Leicht, S.F., Huber, S., Ellwart, J.W., Mustafa, M., Bartenstein, P., D'Haese, J.G., *et al.* Combined Targeted Treatment to Eliminate Tumorigenic Cancer Stem Cells in Human Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 137, n° 3 (2009): 1102- 13.

Muñoz-Couselo, E., García, J.S., Pérez-García, J.M., Cebrián, V.O., & Castán, J.C. Recent advances in the treatment of melanoma with BRAF and MEK inhibitors. *Ann Transl Med.* 2015 Sep;3(15):207.

Myung, P., & Ito, M. Dissecting the bulge in hair regeneration. *J Clin Invest.* 2012 Feb;122(2):448-54.

Natarajan, V.T., Ganju, P., Ramkumar, A., Grover, R., & Gokhale, R.S. Multifaceted Pathways Protect Human Skin from UV Radiation. *Nature Chemical Biology* 10, n° 7 (2014): 542- 51.

Nebreda, A.R., & Porras, A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci.* 2000 Jun;25(6):257-60.

Nenu, I., Tudor, D., Filip, A.G., & Baldea, I. Current position of TNF- α in melanomagenesis. *Tumour Biol.* 2015 Sep;36(9):6589-602.

Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z., & Nickoloff, B.J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009 Oct;9(10):679-91.

Nishimura, E.K. Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011 Jun;24(3):401-10.

O'Connor, T.P., & Crystal, R.G. Genetic Medicines: Treatment Strategies for Hereditary

Bibliographie

Disorders. *Nature Reviews. Genetics* 7, n° 4 (2006): 261- 76.

Oeztuerk-Winder, F., & Ventura, J.J. The many faces of p38 mitogen-activated protein kinase in progenitor/stem cell differentiation. *Biochem J.* 2012 Jul 1;445(1):1-10.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells without Viral Vectors. *Science (New York, N.Y.)* 322, n° 5903 (2008): 949- 53.

Ooi, A.T., Ram, S., Kuo, A., Gilbert, J.L., Yan, W., Pellegrini, M., Nickerson, D.W., Chatila, T.A., & Gomperts, B.N. Identification of an interleukin 13-induced epigenetic signature in allergic airway inflammation. *Am J Transl Res.* 2012;4(2):219-28.

Orford, K.W., & Scadden, D.T. Deconstructing Stem Cell Self-Renewal: Genetic Insights into Cell-Cycle Regulation. *Nature Reviews. Genetics* 9, n° 2 (2008): 115- 28.

Osawa, Masatake. Melanocyte Stem Cells. In *StemBook*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute, 2008.

Oskarsson, T., Batlle, E., & Massagué, J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell.* 2014 Mar 6;14(3):306-21.

Ossowski, L., & Aguirre-Ghiso, J.A. Dormancy of Metastatic Melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research* 23, n° 1 (2010): 41- 56.

Ostyn, P., El Machhour, R., Begard, S., Kotecki, N., Vandomme, J., Flamenco, P., Segard, P., Masselot, B., Formstecher, P., Touil, Y., *et al.* Transient TNF regulates the self-renewing capacity of stem-like label-retaining cells in sphere and skin equivalent models of melanoma. *Cell Commun Signal.* 2014 Sep 17;12:52.

Park, H.Y., Kosmadaki, M., Yaar, M., & Gilchrist, B.A. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2009 May;66(9):1493-506.

Parmiani, G. Melanoma Cancer Stem Cells: Markers and Functions. *Cancers (Basel).* 2016 Mar 11;8(3). pii: E34.

Pattabiraman, D.R., & Weinberg, R.A. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Jul;13(7):497-512.

Pellicano, F., Scott, M.T., Helgason, G.V., Hopcroft, L.E., Allan, E.K., Aspinall-O'Dea, M., Copland, M., Pierce, A., Huntly, B.J., Whetton, A.D., *et al.* The antiproliferative activity of kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia cells is mediated by FOXO transcription factors. *Stem Cells.* 2014 Sep;32(9):2324-37.

Piérard-Franchimont, C., Piérard, G.E., & Quatresooz, P. Focus on skin cancer association and progression under TNF antagonist therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2011 Sep;11(9):1215-22.

Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M., & Morrison, S.J. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature.* 2008 Dec 4;456(7222):593-8.

Raposo, T.P., Beirão, B.C., Pang, L.Y., Queiroga, F.L., & Argyle, D.J. Inflammation and cancer: till death tears them apart. *Vet J.* 2015 Aug;205(2):161-74.

Bibliographie

Regad, T. Molecular and Cellular Pathogenesis of Melanoma Initiation and Progression. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS 70, n° 21 (2013): 4055- 65.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F, & Weissman, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001 Nov 1;414(6859):105-11.

Roesch, A., Fukunaga-Kalabis, M., Schmidt, E.C., Zabierowski, S.E., Brafford, P.A., Vultur, A., Basu, D., Gimotty, P., Vogt, T., & Herlyn, M. A Temporarily Distinct Subpopulation of Slow-Cycling Melanoma Cells Is Required for Continuous Tumor Growth. Cell 141, n° 4 (2010): 583- 94.

Rohani, L., Johnson, A.A., Arnold, A., & Stolzing, A. The aging signature: a hallmark of induced pluripotent stem cells? Aging Cell. 2014 Feb;13(1):2-7.

Routier, É., Robert, C., & Mateus, C. Immunotherapies and melanoma. Bull Cancer. 2014 Dec;101 Suppl 2:S13-24.

Rumman, M., Dhawan, J., & Kassem, M. Concise Review: Quiescence in Adult Stem Cells: Biological Significance and Relevance to Tissue Regeneration. Stem Cells. 2015 Oct;33(10):2903-12.

Sánchez Alvarado, A., & Yamanaka, S. Rethinking differentiation: stem cells, regeneration, and plasticity. Cell. 2014 Mar 27;157(1):110-9.

Sang, L., Collier, H.A., & Roberts, J.M. Control of the Reversibility of Cellular Quiescence by the Transcriptional Repressor HES1. Science (New York, N.Y.) 321, n° 5892 (2008): 1095- 1100.

Schatton, T., & Frank, M.H. Cancer Stem Cells and Human Malignant Melanoma. Pigment Cell & Melanoma Research 21, n° 1 (2008): 39- 55.

Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., *et al.* Identification of Cells Initiating Human Melanomas. Nature 451, n° 7176 (2008): 345- 49.

Schatton, T., Frank, N.Y., & Frank, M.H. Identification and Targeting of Cancer Stem Cells. BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology 31, n° 10 (2009): 1038- 49.

Sell, S. Stem Cell Origin of Cancer and Differentiation Therapy. Critical Reviews in Oncology/Hematology 51, n° 1 (2004): 1- 28.

Semlin, L., Schäfer-Korting, M., Borelli, C., & Korting, H.C. In vitro models for human skin disease. Drug Discov Today. 2011 Feb;16(3-4):132-9.

Senft, D., & Ronai, Z.A. Immunogenic, Cellular, and Angiogenic Drivers of Tumor Dormancy-a Melanoma View. Pigment Cell & Melanoma Research 29, n° 1 (2016): 27- 42.

Shahriyari, L., & Komarova, N.L. Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer? PLoS One. 2013 Oct 29;8(10):e76195.

Shain, A.H., & Bastian, B.C. From melanocytes to melanomas. Nat Rev Cancer. 2016 Jun;16(6):345-58.

Sharma, P., & Allison, J.P. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward

combination strategies with curative potential. *Cell*. 2015 Apr 9;161(2):205-14.

Sharples, A.P., Polydorou, I., Hughes, D.C., Owens, D.J., Hughes, T.M., & Stewart, C.E. Skeletal Muscle Cells Possess a "Memory" of Acute Early Life TNF- α Exposure: Role of Epigenetic Adaptation. *Biogerontology*, 2015.

Shenenberger, D.W. Cutaneous malignant melanoma: a primary care perspective. *Am Fam Physician*. 2012 Jan 15;85(2):161-8.

Shigdar, S., Li, Y., Bhattacharya, S., O'Connor, M., Pu, C., Lin, J., Wang, T., Xiang, D., Kong, L., Wei, M.Q., *et al*. Inflammation and cancer stem cells. *Cancer Lett*. 2014 Apr 10;345(2):271-8

Sick, E., Jeanne, A., Schneider, C., Dedieu, S., Takeda, K., & Martiny, L. CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest. *Br J Pharmacol*. 2012 Dec;167(7):1415-30.

Siller, K.H., & Doe, C.Q. Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol*. 2009 Apr;11(4):365-74.

Slominski, A., Zbytek, B., & Slominski, R. Inhibitors of melanogenesis increase toxicity of cyclophosphamide and lymphocytes against melanoma cells. *Int J Cancer*. 2009 Mar 15;124(6):1470-7.

Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S., & Wortsman, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev*. 2004 Oct;84(4):1155-228.

Sosa, M.S., Bragado, P., & Aguirre-Ghiso, J.A. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer*. 2014 Sep;14(9):611-22.

Spagnolo, F., Ghiorzo, P., & Queirolo, P. Overcoming Resistance to BRAF Inhibition in BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *Oncotarget* 5, n° 21 (2014): 10206- 21.

Stange, D.E., Koo, B.K., Huch, M., Sibbel, G., Basak, O., Lyubimova, A., Kujala, P., Bartfeld, S., Koster, J., Geahlen, J.H., *et al*. Differentiated Troy+ chief cells act as reserve stem cells to generate all lineages of the stomach epithelium. *Cell*. 2013 Oct 10;155(2):357-68.

Storci, G., Sansone, P., Mari, S., D'Uva, G., Tavolari, S., Guarnieri, T., Taffurelli, M., Ceccarelli, C., Santini, D., Chieco, P., *et al*. TNFalpha up-Regulates SLUG via the NF-kappaB/HIF1alpha Axis, Which Imparts Breast Cancer Cells with a Stem Cell-like Phenotype. *Journal of Cellular Physiology* 225, n° 3 (2010): 682- 91.

Strauss, D.C., & Thomas, J.M. Transmission of donor melanoma by organ transplantation. *Lancet Oncol*. 2010 Aug;11(8):790-6.

Sulaimon, S.S., & Kitchell, B.E. The biology of melanocytes. *Vet Dermatol*. 2003 Apr;14(2):57-65.

Sullivan, R.J., & Fisher, D.E. Understanding the Biology of Melanoma and Therapeutic Implications. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 28, n° 3 (2014): 437- 53.

Swope, V.B., Abdel-Malek, Z., Kassem, L.M., & Nordlund, J.J. Interleukins 1 alpha and 6 and tumor necrosis factor-alpha are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis. *J Invest Dermatol*. 1991 Feb;96(2):180-5.

Bibliographie

Takebe, N., Miele, L., Harris, P.J., Jeong, W., Bando, H., Kahn, M., Yang, S.X., & Ivy, S.P. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015 Aug;12(8):445-64.

Tam, I., & Stępień, K. Secretion of proinflammatory cytokines by normal human melanocytes in response to lipopolysaccharide. *Acta Biochim Pol*. 2011;58(4):507-11.

Tanno, T., & Matsui, W. Development and Maintenance of Cancer Stem Cells under Chronic Inflammation. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku Zasshi* 78, n° 3 (2011): 138- 45.

Tata, P.R., Mou, H., Pardo-Saganta, A., Zhao, R., Prabhu, M., Law, B.M., Vinarsky, V., Cho, J.L., Breton, S., Sahay, A., *et al*. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature*. 2013 Nov 14;503(7475):218-23.

Tiede, S., Kloepper, J.E., Bodò, E., Tiwari, S., Kruse, C., & Paus, R. Hair follicle stem cells: walking the maze. *Eur J Cell Biol*. 2007 Jul;86(7):355-76

Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., La Noce, M., Laino, L., De Francesco, F., & Papaccio, G. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J*. 2013 Jan;27(1):13-24. doi: 10.1096/fj.12-218222.

Tronnier, M., Semkova, K., Wollina, U., & Tchernev, G. Malignant Melanoma: Epidemiologic Aspects, Diagnostic and Therapeutic Approach. *Wiener Medizinische Wochenschrift* (1946) 163, n° 15- 16 (2013): 354- 58.

Tomellini, E., Touil, Y., Lagadec, C., Julien, S., Ostyn, P., Ziental-Gelus, N., Meignan, S., Lengrand, J., Adriaenssens, E., Polakowska, R., *et al*. Nerve growth factor and proNGF simultaneously promote symmetric self-renewal, quiescence, and epithelial to mesenchymal transition to enlarge the breast cancer stem cell compartment. *Stem Cells*. 2015 Feb;33(2):342-53.

Touil, Y., Zuliani, T., Wolowczuk, I., Kuranda, K., Prochazkova, J., Andrieux, J., Le Roy, H., Mortier, L., Vandomme, J., Jouy, N., *et al*. The PI3K/AKT signaling pathway controls the quiescence of the low-Rhodamine123-retention cell compartment enriched for melanoma stem cell activity. *Stem Cells*. 2013 Apr;31(4):641-51.

Touil, Y., Igoudjil, W., Corvaisier, M., Dessein, A.F., Vandomme, J., Monté, D., Stechly, L., Skrypek, N., Langlois, C., Grard, G., *et al*. Colon cancer cells escape 5FU chemotherapy-induced cell death by entering stemness and quiescence associated with the c-Yes/YAP axis. *Clin Cancer Res*. 2014 Feb 15;20(4):837-46.

Touil, Y., Segard, P., Ostyn, P., Begard, S., Aspor, C., El Machhour, R., Masselot, B., Vandomme, J., Flamenco, P., Idziorek, T., *et al*. Melanoma dormancy in a mouse model is linked to GILZ/FOXO3A-dependent quiescence of disseminated stem-like cells. *Sci Rep*. 2016 ; 6:30405. DOI: 10.1038/srep30405.

Uong, A., & Zon, L.I. Melanocytes in Development and Cancer. *Journal of Cellular Physiology* 222, n° 1 (2010): 38- 41.

Vandomme, J., Touil, Y., Ostyn, P., Olejnik, C., Flamenco, P., El Machhour, R., Segard, P., Masselot, B., Bailliez, Y., Formstecher, P., *et al*. Insulin-like growth factor 1 receptor and p38 mitogen-activated protein kinase signals inversely regulate signal transducer and activator of

Bibliographie

transcription 3 activity to control human dental pulp stem cell quiescence, propagation, and differentiation. *Stem Cells Dev.* 2014 Apr 15;23(8):839-51.

Venkatraman, L., & Tucker-Kellogg, L. The CD47-binding peptide of thrombospondin-1 induces defenestration of liver sinusoidal endothelial cells. *Liver Int.* 2013 Oct;33(9):1386-97.

Videira, I.F., Moura, D.F., & Magina, S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol.* 2013 Jan-Feb;88(1):76-83.

Visvader, J.E. Cells of Origin in Cancer. *Nature* 469, n° 7330 (2011): 314- 22.

Wang, S.H., & Lin, S.Y. Tumor dormancy: potential therapeutic target in tumor recurrence and metastasis prevention. *Exp Hematol Oncol.* 2013 Oct 16;2(1):29.

Wang, C.Q., Akalu, Y.T., Suarez-Farinas, M., Gonzalez, J., Mitsui, H., Lowes, M.A., Orlow, S.J., Manga, P., & Krueger, J.G. IL-17 and TNF synergistically modulate cytokine expression while suppressing melanogenesis: potential relevance to psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2013 Dec;133(12):2741-52.

Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., Van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., *et al.* Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell* 135, n° 6 (2008): 1118- 29.

Wu, C.P., & Ambudkar, S.V. The pharmacological impact of ATP-binding cassette drug transporters on vemurafenib-based therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2014 Apr;4(2):105-11.

Yeh, A.C., & Ramaswamy, S. Mechanisms of Cancer Cell Dormancy--Another Hallmark of Cancer? *Cancer Research* 75, n° 23 (2015): 5014- 22.

Yamaguchi, Y., Brenner, M., & Hearing, V.J. The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem.* 2007 Sep 21;282(38):27557-61.

Yang, X., Zhang, S., Pang, X., & Fan, M. Pro-inflammatory cytokines induce odontogenic differentiation of dental pulp-derived stem cells. *J Cell Biochem.* 2012 Aug;113(8):2796.

Zhang, L., Jiao, M., Wu, K., Li, L., Zhu, G., Wang, X., He, D., & Wu, D. TNF- α induced epithelial mesenchymal transition increases stemness properties in renal cell carcinoma cells. *Int J Clin Exp Med.* 2014 Dec 15;7(12):4951-8. eCollection 2014.

Zubrilov, I., Sagi-Assif, O., Izraely, S., Meshel, T., Ben-Menahem, S., Ginat, R., Pasmanik-Chor, M., Nahmias, C., Couraud, P.O., Hoon, D.S., *et al.* Vemurafenib resistance selects for highly malignant brain and lung-metastasizing melanoma cells. *Cancer Lett.* 2015 May 28;361(1):86-96.