

UNIVERSITE PARIS DIDEROT (Paris 7) SORBONNE PARIS CITE
Ecole Doctorale HOB

UNITE DE RECHERCHE U1021-UMR3347

Institut Curie

THESE DE DOCTORAT

Présentée Par

Céline BARBOTIN

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS 7

Spécialité: Oncogénèse - Biologie des cellules souches

**Auto-renouvellement des cellules souches mélanocytaires:
rôle des kinases RAF et MET**

Thèse dirigée par le Dr. Alain EYCHENE

Soutenue le 6 Septembre 2016

JURY

Pr. Jonathan Weitzman	Président
Dr. Heather Etchevers	Rapporteur
Dr. Charles Durand	Rapporteur
Dr. Flavio Maina	Examineur
Dr. Alain Eychène	Directeur de thèse

UNIVERSITE PARIS DIDEROT (Paris 7) SORBONNE PARIS CITE
Ecole Doctorale HOB

UNITE DE RECHERCHE U1021-UMR3347

Institut Curie

THESE DE DOCTORAT

Présentée Par

Céline BARBOTIN

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS 7

Spécialité: Oncogénèse - Biologie des cellules souches

**Auto-renouvellement des cellules souches mélanocytaires:
rôle des kinases RAF et MET**

Thèse dirigée par le Dr. Alain EYCHENE

Soutenue le 6 Septembre 2016

JURY

Pr. Jonathan Weitzman	Président
Dr. Heather Etchevers	Rapporteur
Dr. Charles Durand	Rapporteur
Dr. Flavio Maina	Examineur
Dr. Alain Eychène	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Et voici la partie la plus attendue de tout manuscrit de thèse, écrite en dernier c'est pourtant toujours la plus lue, j'ai nommé les Remerciements!

Pour commencer, je remercie les membres de mon jury d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit et d'assister à ma soutenance. Merci au Dr. Etchevers et au Dr. Durand pour votre lecture attentive et vos remarques pertinentes qui m'ont permis d'améliorer le fond et la forme. Je remercie le Dr. Flavio Maina d'avoir accepté de faire partie de ce jury, ainsi que pour sa précieuse contribution à ce projet de recherche. Enfin, merci au Pr. Jonathan Weitzman de présider ce jury aujourd'hui, et de m'avoir fait découvrir l'épigénétique il y a de cela quelques années! Je n'ai pas oublié l'incontournable paysage épigénétique de Waddington, qui restera sans doute gravé dans la mémoire de générations entières de magistériens grâce à vous!

Je souhaiterais tout d'abord remercier particulièrement mon directeur de thèse, Alain Eychène, de m'avoir permis de réaliser mon doctorat dans son laboratoire. Merci pour ta confiance tout au long de ces années, merci de m'avoir laissé une grande liberté et la possibilité de prendre de nombreuses initiatives. J'ai appris énormément de choses à la fois sur les plans scientifique et humain et ai le sentiment d'avoir repoussé mes limites. Je sors plus forte de cette thèse, et pour tout cela merci!

J'en arrive au reste de l'équipe des Bisounours! Je tiens à remercier tous les membres de cette super équipe. Commençons par ceux qui permettent à l'esprit du laboratoire de perdurer, ceux qui étaient là avant et le seront toujours après!

Celio, je te suis extrêmement reconnaissante d'avoir toujours pris le temps de me conseiller, de me booster, d'avoir contribué par tes incessantes idées à l'avancement de ce projet. Ta bienveillance et ton écoute m'ont beaucoup aidé pendant les périodes les plus difficiles de cette thèse. Ta passion pour la science est terriblement contagieuse, merci donc pour ces discussions scientifiques stimulantes!

Sab, merci pour ton aide et ta gentillesse tout au long de cette thèse. Tu as su me rassurer à de très nombreuses reprises, m'aider à y voir plus clair, tu as toujours

d'excellents conseils et réponse à tout sur les manips!! Un énorme merci d'avoir été à mes côtés!

Ma chère Mag, merci pour....tout! Je ne pourrais pas faire la liste de tout ce pour quoi je tiens à te remercier! Tu es la collègue idéale! Travailler avec toi c'est facile, tout est parfaitement fait en un tour de main et tu es toujours prête à aider tout le monde! Mais il n'y a pas que le travail dans la vie! Nos pauses thé, nos papotages et ton petit côté gremlins de 17h font partie intégrante de cette thèse et vont me manquer à l'avenir!

Je souhaite ensuite remercier les doctorantes (oui que des filles!) passées et actuelles du laboratoire. Agathe, qui a initié le sujet des cellules souches, merci de m'avoir passé le relais, nous n'avons travaillé ensemble que quelques mois mais ce fut très agréable. Alex et Coralie, mes aînées en thèse, vous avez été mes modèles, j'ai essayé de marcher dans vos pas avec plus ou moins de succès, j'espère avoir été (un petit peu) à la hauteur! Les actuelles, enfin juste l'actuelle, mais elle prend beaucoup de place: Morgane! Ma petite Momo, ne baisse pas les bras, tu vas y arriver! Merci pour ta bonne humeur, les potins, les pauses cocas et thés, les fous rires, tous nos trajets RER... et merci pour tout le reste que j'oublie! Tu as illuminé ces deux dernières années de thèse! Et à présent l'avenir du labo: Chaha! Charlène, bonne chance, le voyage de ta thèse ne fait que commencer! Tu as un océan à traverser, des tempêtes à affronter, quelques vagues scélérates à franchir mais heureusement des îlots paradisiaques en chemin! Je te souhaite le meilleur, conserve précieusement ton incroyable enthousiasme et ton petit grain de folie!

Dans la catégorie des indispensables, merci à Jessy et à Mathieu qui ont génotypé des milliers de souris, parfois dans des délais dignes de mission impossible, pour que je puisse faire mes manips! Chloé, tu es arrivée récemment, nous n'avons pas eu l'occasion de travailler ensemble, mais c'est un plaisir de t'avoir dans l'équipe, merci à toi pour tes bons conseils théâtre!

Sortons un peu du labo, je voudrais avoir une pensée dans ces remerciements pour tous les gens de l'U1021. Grâce à vous devoir monter deux étages pour récupérer une impression est toujours un plaisir, c'est-à-dire synonyme de papotage (plus ou moins silencieux!) dans les couloirs.

Un grand merci à tout le personnel de l'animalerie de s'occuper si bien de nos petites souris. Un merci tout particulier à Fred, toujours prêt à m'aider pour les manip (même quand je te préviens à la dernière minute), et à rattraper les souris qui m'ont échappé (!!). Quand on vient à l'animalerie on est toujours sûr de passer un bon moment à blaguer avec toi! Et merci de m'avoir fait découvrir la moto!

Je remercie aussi les plateformes de l'Institut Curie: cytométrie, imagerie, histologie, et surtout les personnes formidables toujours prêtes à délivrer conseils et aide pratique: Charlène, Marie-Noëlle et Sophie. Charlène, un spécial merci à toi pour ta disponibilité. Merci pour ces plus de 100 créneaux de tri (j'en ai perdu le compte!!) qui ont été autant d'occasions de papoter et de se raconter nos vies dans ton petit bocal (et il s'en est passé des choses!!). Mais n'oublions pas la science, sans toi je n'aurais pas pu mettre au point le tri des cellules souches, alors merci tout simplement!

Merci à mes amis du Magistère Européen de Génétique: mon incroyablement déjantée et meilleure amie Anne-Laure, GuiGui (un immense merci pour la mise en page de cette thèse et pour avoir répondu à chacun de mes coups de fils paniqués!!), Kévin, Leo, Lucille, Julie et Mehdi. Nous avons débuté notre voyage scientifique ensemble en L3, on a visité émerveillés les labos de plusieurs continents, on en a bavé en thèse, et maintenant nous voilà (presque) tous docteurs, quel chemin! Je suis fière de nous!

Dans la catégorie amis, je ne pouvais pas vous oublier vous, les copines de prépas!! 10 ans d'études, 10 ans d'amitié! Une décennie plus tard qui aurait parié qu'on se retrouverait à parler de thèse sur le bleu d'auvergne, l'influence de la noix de coco sur la pousse des concombres et maintenant les souris qui deviennent blanches??? Merci les filles pour votre soutien, vous répondez toujours présentes! Vos sms d'encouragement quotidiens pendant la rédaction m'ont donné la patate chaque jour!

Et maintenant, ma famille, sans eux rien n'aurait été possible! Mes parents qui m'ont toujours soutenu et cru en moi. Vous m'avez fait le plus précieux des cadeaux en me donnant le goût de la découverte et du dépassement de soi, et en me permettant de faire d'aussi longues études! Merci de votre indéfectible soutien à tous les niveaux, et de tous les sacrifices que vous avez fait pour que je puisse aller aussi loin. Aujourd'hui, je veux vous rendre fière! Et bien sûr, merci à toi, soeurette, mon petit reporter, pour ton

soutien et ta relecture patiente et méticuleuse de cette thèse même si tu n'as rien compris!

Et enfin, le meilleur pour la fin! Nazih, c'est un peu grâce à cette thèse que je t'ai rencontré (c'est fou ce qui peut arriver dans un tramway un lundi matin!). Quatre ans de doctorat plus tard et un manuscrit de thèse écrit, je peux dire que je te dois une fière chandelle! Je vais avoir du mal à te dire combien je te suis reconnaissante pour ton soutien au quotidien, pour m'avoir remonté le moral un nombre incalculable de fois, avoir supporté ma mauvaise humeur, essuyer mes larmes, réussi à canaliser mon stress et surtout surtout de croire autant en moi!!! Pour tout cela MERCI !! Un dernier mot: FINO ALLA FINE, on va la finir cette thèse!!

Au cas où j'aurais oublié quelqu'un précédemment, voici le paragraphe pour y remédier. Ô toi que j'ai malencontreusement oublié de citer, sache que je te remercie!

Ceci étant dit, maintenant place à la Science...

RÉSUMÉ

L'activation constitutive de la voie RAS/RAF/MEK/ERK est observée dans environ 65% des mélanomes cutanés, tumeurs dérivées des mélanocytes. Des mutations dans les gènes *NRAS* (~15%) et *BRAF* (~50%) sont présentes dans les cellules à l'origine du mélanome (tumor initiating cells, parfois appelées cancer stem cells) qui partagent de nombreuses similitudes avec les cellules souches mélanocytaires normales (MSCs). Paradoxalement, alors que la voie RAS/RAF/MEK/ERK fait l'objet de nombreuses études dans le mélanome, peu de choses sont connues sur son rôle dans le développement normal du lignage mélanocytaire.

Notre laboratoire a généré des lignées de souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f}* porteuses d'une double invalidation conditionnelle (knockout) des gènes *raf* spécifiquement dans le lignage mélanocytaire. Ces animaux ne présentent pas de défaut de pigmentation à la naissance, indiquant que B-RAF et C-RAF ne sont pas nécessaires pour la mise en place du lignage mélanocytaire au cours du développement embryonnaire. En revanche, à partir de la première mue, les animaux knockout développent un phénotype progressif d'éclaircissement du pelage appelé "hair graying", causé par le remplacement des poils noirs par des poils non pigmentés. Nous avons montré que ce phénotype résultait de la disparition des MSCs au niveau des follicules pileux, indiquant un rôle essentiel des protéines RAF dans l'auto-renouvellement des MSCs.

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de l'auto-renouvellement des MSC par la voie RAF/MEK/ERK, nous avons réalisé une étude transcriptomique comparative entre les MSCs des animaux knockout et celles des contrôles. Pour cela, nous avons généré des lignées de souris knockout *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o* exprimant la protéine GFP uniquement dans le lignage mélanocytaire après action de la recombinaison Cre, afin de purifier les MSCs par tri cellulaire. Ceci nous a permis de mettre en évidence une diminution remarquable de la transcription du gène *c-met* chez les animaux, que nous avons confirmée par des expériences de RT-QPCR et d'immunohistochimie. Ce gène code pour un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase activant la voie RAS/RAF/MEK/ERK, et impliqué dans la prolifération, la survie, ainsi que la dispersion et la morphogénèse cellulaires. La mise au point d'un système de

culture *in vitro* des MSCs nous a permis de montrer que la prolifération des MSCs était dépendante du HGF, le ligand du récepteur c-MET. A l'inverse, le traitement des MSCs contrôles avec le crizotinib, un inhibiteur pharmacologique de c-MET, provoque la mort des MSCs. Ces données suggèrent que le gène *c-met* est une cible transcriptionnelle de la voie RAF/MEK/ERK jouant un rôle primordial dans l'homéostasie des MSCs.

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS	1
INTRODUCTION	7
Chapitre I Les Cellules Souches Mélanocytaires	9
I.A. Le Lignage Mélanocytaire.....	9
I.A.1. Localisation dans la peau.....	9
I.A.2. Les mélanocytes et la pigmentation.....	11
I.A.2.a. Les mélanocytes	11
I.A.2.b. La mélanogénèse	12
I.A.2.c. Mise en place du lignage au cours du développement embryonnaire.....	14
I.B. Le Follicule Pileux	15
I.B.1. Description du follicule pileux et de ses annexes.....	15
I.B.2. Mise en place du follicule pileux au cours du développement	18
I.B.3. Le cycle du poil	19
I.C. La niche des cellules souches du follicule pileux.....	22
I.C.1. Brève définition des cellules souches adultes.....	22
I.C.2. Le bulge et le hair germ composent la niche des cellules souches du follicule pileux	23
I.C.3. Les cellules souches kératinocytaires	25
I.C.3.a. Les marqueurs des cellules souches kératinocytaires.....	26
I.C.3.b. Maintien de la quiescence dans les cellules souches kératinocytaires au cours de la télogène	26
I.C.3.c. Sortie de quiescence des KSCs au début de l'anagène.....	28
I.C.4. Les cellules souches mélanocytaires.....	31
I.D. Voies de Signalisation impliquées dans l'auto-renouvellement des cellules souches mélanocytaires.....	33
I.D.1. Le défaut de maintien des MSCs dans la niche provoque le phénotype de « Hair Graying »	33

I.D.2. Protection contre l'apoptose des MSCs	33
I.D.2.a. Rôle de <i>Bcl2</i>	33
I.D.2.b. Rôle de la voie Notch.....	35
I.D.3. Maintien en quiescence des MSCs	36
I.D.3.a. Rôle du gène <i>Mitf</i> et de la protéine ATM	36
I.D.3.b. Rôle de la voie Wnt	37
I.D.3.c. Rôle de la signalisation TGFβ.....	38
I.D.4. Les KSCs ont un rôle primordial dans le maintien des MSCs au sein de la niche du follicule.....	39
I.D.4.a. L'activation de la voie Wnt dans les MSCs en anagène est contrôlée par les KSCs, via la signalisation Edn1/EdnrB.....	40
I.D.4.b. Le facteur nucléaire I/B produit par les KSCs régule la prolifération des MSCs	41
I.D.4.d. L'activation de la voie TGFβ dans les KSCs permet le maintien des MSCs dans la niche	42

I.E. La signalisation RAS/RAF/MEK/ERK dans le lignage mélanocytaire 44

I.E.1. Présentation de la voie.....	45
I.E.2. Protéines RAF	49
I.E.2.a. Structure des protéines RAF	49
I.E.2.b. Expression et rôles physiologiques des protéines RAF	51
I.E.3. Voie MAPK et mélanome	54
I.E.3.a. Le mélanome	54
I.E.3.b. Mutation BRAf ^{V600E}	55
I.E.3.c. Mutation <i>N-RAS</i> ^{Q61K}	56
I.E.3.d. Rôle des protéines RAF dans le développement du mélanome induit par <i>N- ras</i> ^{Q61K}	58

Chapitre II La voie de signalisation HGF/SF-MET 61

II.A. Rôle physiologique de MET et voies de signalisation associées 61

II.A.1. Le récepteur tyrosine kinase MET	61
II.A.2. L'Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor est l'unique ligand du récepteur MET	62

II.A.3. Activation de MET et signalisation en aval.....	64
II.B. Rôle de la signalisation HGF/SF-MET dans la mise en place et l'homéostasie des tissus épithéliaux	66
II.B.1. Rôles au cours du développement embryonnaire	66
II.B.1.a. Développement du placenta.....	66
II.B.1.b. Migration des progéniteurs myogéniques.....	67
II.B.1.c. Développement du système nerveux.....	68
II.B.1.d. Survie des hépatocytes.....	68
II.B.2. Rôles chez l'adulte.....	68
II.C. Signalisation HGF/SF-MET et cancer.....	69
II.C.1. Activation constitutive de la voie dans les tumeurs	69
II.C.2. La voie HGF/SF-MET en tant que cible thérapeutique.....	71
II.D. Signalisation HGF/SF-MET et lignage mélanocytaire... 72	
II.D.1. Rôle physiologique dans le lignage mélanocytaire.....	72
II.D.2. Rôle dans le cycle du follicule pileux.....	73
II.D.3. Rôle dans le mélanome	74
Objectifs de la thèse.....	77
RÉSULTATS	79
Article 1	81
Les protéines B-RAF et C-RAF sont nécessaires au maintien des cellules souches mélanocytaires	
Article 2	105
Rôle des kinases RAF et MET dans l'auto-renouvellement des cellules souches mélanocytaires	
I. Analyse Transcriptomique des MSCs wild-type et knock-out pour <i>B-raf</i> et <i>C-raf</i>	105
I.A. Génération de la lignée de souris <i>B-raf^{ff/f};C-raf^{ff/f};Tyr::Cre/o;mT/mG</i>	105

I.B. Mise en place d'un protocole de purification des MSCs	106
I.C. La population triée appartient au lignage mélanocytaire et présente un profil de cellule indifférenciée	107
I.D. Analyse transcriptomique des MSCs B-raf ^{+/+} ; C-raf ^{+/+} , des MSCs B-raf ^{-/-} ; C-raf ^{-/-} et des mélanoblastes B-raf ^{+/+} ; C-raf ^{+/+}	108
II. Identification du gène <i>c-Met</i> comme cible de la voie RAS/RAF/MEK/ERK dans les MSCs:.....	110
II.A. Importante réduction de l'expression de <i>c-Met</i> dans les MSCs invalidées pour <i>B-raf</i> et <i>C-raf</i>	110
II.B. Profil d'expression de MET et de son ligand dans la peau	111
III. Rôle de la signalisation HGF/SF-MET dans les MSCs contrôles et mutantes <i>in vitro</i>.....	112
III.I. Mise en culture des MSCs	112
III.2. Régulation de l'expression de <i>c-Met</i> par la voie RAF/MEK/ERK dans des lignées de mélanocytes.....	114
IV. Rôle de MET dans les MSCs <i>in vivo</i>.....	115
Conclusion	116
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	139
Lignées de Souris	145
Protocole de purification des MSCs et des mélanoblastes.....	145
Culture des MSCs	146
Préparation de cDNA et RT-qPCR à partir des MSCs	146
IHC sur peaux de souris:.....	146
Acquisition et analyse des images.....	147
Culture cellulaire	147
Western Blot.....	147
DISCUSSION.....	145
La délétion de <i>B-raf</i> et <i>C-raf</i> entraîne une disparition des MSCs	151

Redondance fonctionnelle de B-RAF et C-RAF dans les MSCs	152
Les MSCs n'exprimant plus <i>B-raf</i> et <i>C-raf</i> présentent un défaut d'entrée dans le cycle cellulaire	153
Mise au point des analyses transcriptomiques	153
Analyse transcriptomique des MSCs et des mélanoblastes	154
Analyse transcriptomique des MSCs contrôles et des MSCs délétées pour <i>B-raf</i> et <i>C-raf</i>	155
Rôle de MET dans la division des MSCs <i>in vitro</i>	156
Régulation de l'expression de <i>c-Met</i> par la voie RAF/MEK/ERK:	157
Rôle du récepteur MET <i>in vivo</i> dans les MSCs	157
Par quelle voie le récepteur MET promeut l'auto-renouvellement des MSCs? Hypothèse d'une boucle d'activation positive de MET dans les MSCs	160
PERSPECTIVES	162
CONCLUSION GENERALE	164
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	163
ANNEXE	195

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Schéma d'une coupe de peau.....	10
Figure 2. Schéma de l'épiderme inter-folliculaire	12
Figure 3. Schéma de la synthèse de la mélanine	13
Figure 4. Mise en place du lignage mélanocytaire au cours du développement embryonnaire.....	15
Figure 5. Structure du follicule pileux.....	16
Figure 6. Les différents types cellulaires formant le follicule pileux.....	17
Figure 7. Développement embryonnaire du follicule pileux.	19
Figure 8. Le cycle du follicule pileux.....	21
Figure 9. Les cycles du follicule pileux au cours du temps chez la souris.....	21
Figure 10. La niche des cellules souches du follicule pileux	25
Figure 11. Régulation de la quiescence et de l'activation des KSCs dans la niche du follicule au cours du cycle du poil.....	28
Figure 12. Rôle de la voie Wnt dans la régulation de la sortie de l'anagène.....	30
Figure 13. Les KSCs forment un environnement nécessaire au maintien des MSCs dans la niche.	44
Figure 14. Signalisation RAS/RAF/MEK/ERK.....	45
Figure 15. Structure et activation du récepteur à activité tyrosine kinase.	47
Figure 16. Activation des protéines Ras par les RTK.	47
Figure 17. Structure primaire des protéines Raf.	50
Tableau 1. Profil d'expression des protéines RAF et phénotype des KO constitutifs.....	53
Figure 18. Les différentes étapes de progression du mélanome cutané.	55
Figure 19. Effet paradoxal du traitement vemurafenib sur les mélanomes mutés NRas.	58
Figure 20. Structure et modèle tri-dimensionnel de la protéine MET.....	62
Figure 21: Structure et modèle tri-dimensionnel de l'HGF/SF.....	63
Figure 22: Voies de signalisation en aval du récepteur MET.....	65

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
BMP	Bone Morphogenic Protein
BrdU	Bromodésoxyuridine
CRD	Cystein Rich Domain
CR 1/2/3	Conserved Region 1/2/3
Dct	DopaChrome Tautomerase
DP	Papille Dermique
EDN	Endothelin
EdnrB	Edn receptor B
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epitelio-Mesenchymal Transformation
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GAP	GTPase-Activating Proteins
GDP	Guanine Di-Phosphate

GEF	Guanine nucleotide exchange factors
GFE	Gaine Folliculaire Externe
GFI	Gaine Folliculaire Interne
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
HFSC	Hair Follicle Stam Cells
HG	Hair Graying
HGF	Hepatocyte Growth factor
IGFR	Insulin-Like Growth Factor Receptor
IRS	Internal Root Sheath
KI	Knock-In
KO	Knock-Out
KSC	Keratinocyte Stem Cells
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MITF	Microphthalmia Transcription Factor
MSCs	Melanocyte Stem Cells
MSH	Melanocyte Stimulating Hormone
ORS	Outer Root Sheath
PCR	Polymerase Chain Reaction

PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RBD	Ras-Binding Domain
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SCF	Stem Cell Factor
SHH	Sonic Hedgehog
SH2	Src homology-2
TEM	Transition Epithelio-Mésenchymateuse
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TPA	12-O-Tetredecanylphorbol -13-acetate
TYRP-1 ou2	Tyrosinase-Related Protein 1 ou 2
UVR	UltraViolet Radiation
WT	Wild-Type

INTRODUCTION

Chapitre I

Les Cellules Souches Mélanocytaires

I.A. Le Lignage Mélanocytaire

I.A.1. Localisation dans la peau

La peau est un organe sensoriel assurant un rôle de barrière contre les agressions extérieures. Elle possède, en outre, une fonction immunologique, un rôle de régulateur thermique et est le lieu de synthèse de la vitamine D. Anatomiquement, la peau est constituée de trois couches de tissus: l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Figure 1**).

L'**épiderme**, couche superficielle d'origine épithéliale, joue le rôle de barrière cutanée et contient quatre types cellulaires: les kératinocytes qui constituent 80% de l'épiderme, les mélanocytes, les cellules immunitaires de langherans et les cellules de merkel. L'homéostasie de l'épiderme est assurée par la présence de **cellules souches kératinocytaires** dans sa couche la plus profonde, ancrées à une lame basale riche en protéines de la matrice extracellulaire. Ces cellules souches prolifèrent et se différencient en progressant à travers l'épiderme de la base vers sa couche la plus externe. Celle-ci est composée de kératinocytes morts qui ont perdu leur noyau et dont le cytoplasme est rempli de filaments de kératine: les cornéocytes. Ils sont continuellement éliminés et remplacés par les cellules de la couche inférieure selon un processus de desquamation: exfoliation causée par l'action de protéases qui détruisent la cohésion entre les cellules. Entre les kératinocytes de la lame basale se trouvent les cellules de Merkel, mécanorécepteurs présents au contact d'une terminaison nerveuse qui assurent un rôle sensoriel. Les **mélanocytes**, qui seront décrits plus en détails dans le paragraphe suivant, sont localisés dans la couche la plus profonde de l'épiderme et assurent la pigmentation et la protection contre les rayonnements ultra-violets (UVR).

Le **derme**, couche intermédiaire, est un tissu conjonctif soutenant l'épiderme et protégeant le réseau vasculaire et nerveux. Il débute en dessous de la lame basale, qui sert de barrière physique limitant le passage de molécules et de cellules entre derme et

épiderme. Il est composé de deux types de cellules: les fibroblastes, cellules productrices du collagène assurant l'élasticité de la peau, et les mastocytes impliqués dans les processus immunitaires.

L'**hypoderme** est un tissu adipeux situé sous le derme et traversé par les vaisseaux et les fibres nerveuses rejoignant ce dernier. Il est essentiellement composé d'adipocytes.

Selon les espèces, différentes annexes de la peau, appelées phanères, sont présentes au niveau de l'épiderme. On peut ainsi citer les follicules pileux, les ongles, les griffes, les écailles et les plumes. Ces annexes participent notamment à la régulation thermique et à la protection contre les UVR. Chez l'homme, on trouve les annexes de la peau suivantes:

- Les glandes sudorales (productrices de la sueur)
- Les glandes sébacées (sécrétrices du sébum: film hydrolique protégeant l'épiderme)
- Le follicule pileux (associé à une glande sébacée).

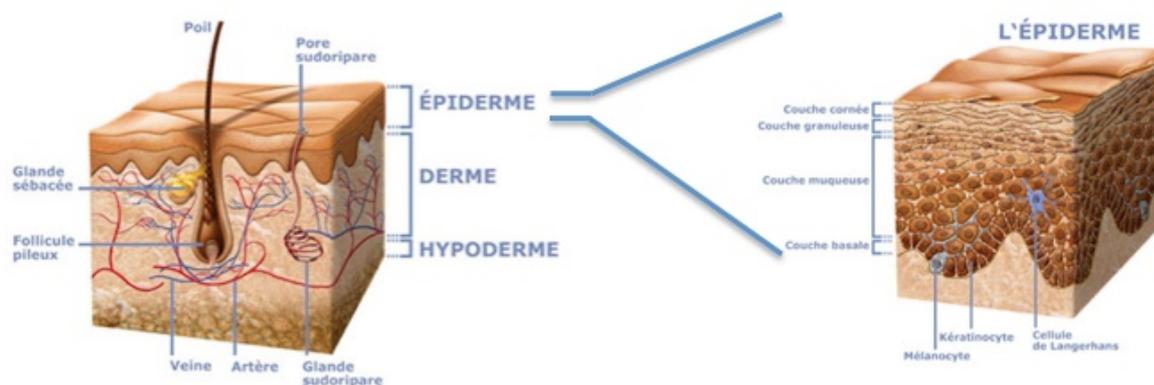


Figure 1. Schéma d'une coupe de peau.

La peau est constituée de trois couches distinctes : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme est la couche la plus superficielle, séparée du derme par une membrane basale. La différenciation des kératinocytes se fait de la couche basale vers la surface. Au niveau de cette couche basale se trouvent les mélanocytes.

I.A.2. Les mélanocytes et la pigmentation

I.A.2.a. Les mélanocytes

Les mélanocytes sont des **cellules dendritiques** spécialisées dans la production de la **mélanine**, un pigment protecteur responsable de la coloration de la peau, des poils, des plumes et des yeux. Chez l'Homme, la plupart des mélanocytes sont localisés dans l'épiderme, à la jonction du derme, où ils établissent des contacts avec les kératinocytes adjacents par l'intermédiaire des dendrites (**Figure 2**). On les trouve également dans les follicules pileux, l'oreille interne (cochlée), les leptoméniges, le cœur et l'œil (choroïde et iris) (Goding, 2000; Tachibana, 1999; Yajima and Larue, 2008).

La mélanine est produite dans des organites intracellulaires spécialisés: les **mélanosomes**. Ceux-ci migrent de la région péri-nucléaire des mélanocytes jusqu'à l'extrémité des dendrites via les microtubules avant d'être transférés aux kératinocytes. Ce transport peut être déclenché ou intensifié par certains facteurs : intensité du rayonnement ultraviolet (UVR), facteurs hormonaux ou neuraux (changements de couleur liés à l'environnement ou aux émotions/comportements chez certains animaux). En réponse aux UVR, les mélanosomes se répartissent au-dessus des noyaux des kératinocytes, les protégeant ainsi des radiations. Chez l'Homme, le nombre de mélanosomes produits par les mélanocytes, leur taille, leur concentration en pigments et leur répartition dans les kératinocytes sont des caractéristiques héréditaires qui modulent la pigmentation de la peau.

Chez la souris, les mélanocytes différenciés sont absents de l'épiderme inter-folliculaire, à l'exception des zones non pileuses comme les oreilles, les pattes et la queue. Ils sont par contre présent dans l'ensemble des follicules pileux, où leur homéostasie est étroitement régulée par le cycle du follicule. Nous reviendrons plus loin sur le cycle du poil et son lien avec la régulation du lignage mélanocytaire.

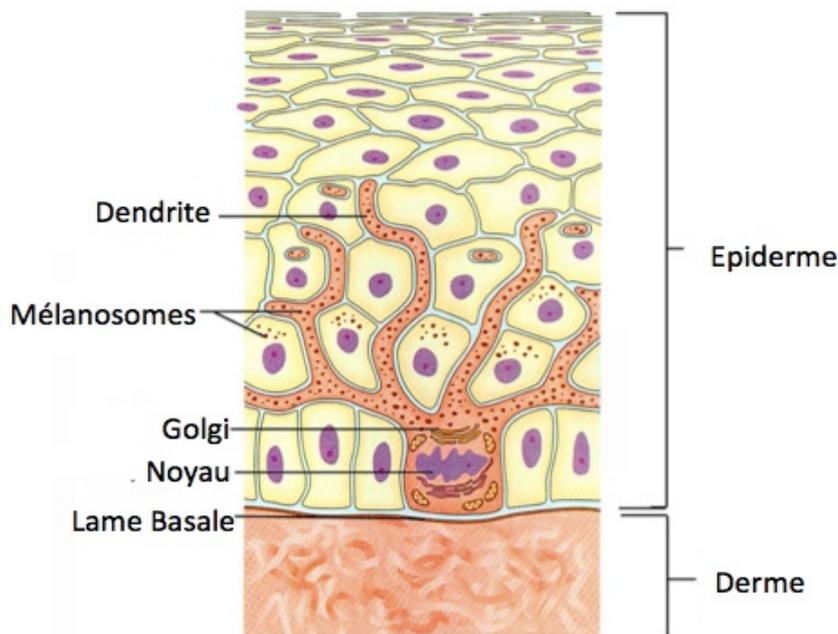


Figure 2. Schéma de l'épiderme inter-folliculaire

Le mélanocyte (orange) est au contact de la lame basale et s'intercale entre les kératinocytes (jaunes). Les mélanosomes contenant la mélanine, migrent le long des dendrites du mélanocyte et sont ensuite transférés aux kératinocytes

I.A.2.b. La mélanogénèse

La maturation des mélanosomes intervient au cours de la différenciation des mélanocytes, et se décompose schématiquement en quatre stades (I à IV) morphologiquement reconnaissables par TEM (Transmission Electron Microscopy) (Hearing, 2005). Les stades I et II correspondent à la formation de l'organite, le stade III est le moment de la production de la mélanine, tandis que le stade IV correspond aux mélanosomes prêts à être transférés aux kératinocytes (Hearing, 2005). Deux types de pigments sont synthétisés lors de la mélanogénèse: l'**eumélanine** marron/noire et la **phéomélanine** jaune/orangée, toutes deux sont empaquetées dans des granules de tailles et de formes différentes (Hunt and Thody, 1995). C'est la proportion relative en chacun de ces pigments qui permet d'obtenir des couleurs différentes de la peau, des poils et des yeux.

Les deux types de mélanines sont produits à partir de la même molécule, la **tyrosine**, qui est transformée par des enzymes spécifiques de manière séquentielle (**Figure 3**). La **tyrosinase** (TYR) est l'enzyme clé de la mélanogénèse, elle permet la transformation de la tyrosine en dopa puis dopaquinone. A partir de la dopaquinone

sont synthétisées l'eumélanine et la phéomélanine selon deux voies différentes (Hearing, 2011). La synthèse de l'eumélanine se poursuit par une conversion de la dopaquinone en dopachrome, et se termine par l'intervention de deux enzymes: DCT (DOPACHrome tautomérase) et TYRP1 (Tyrosin-related protein 1). La production de la phéomélanine est moins complexe puisque la seule enzyme intervenant est la tyrosinase (Kondo and Hearing, 2011). Des mutations perte de fonctions touchant ces différentes enzymes (TYR, DCT et TYRP-1) conduisent à un défaut de la production de la mélanine, on parle alors d'**albinisme**.

De nombreux facteurs viennent influencer la balance eumélanine/phéomélanine. Le facteur de transcription MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) a un rôle essentiel dans la régulation de la mélanogénèse en contrôlant l'expression des gènes *Trp-1*, *Dct* et *Tyrosinase* (Levy et al., 2006). On peut aussi citer le gène murin **agouti** *Asp*, responsable d'un pelage de type phéomélanine, tandis que sa mutation conduit au pelage noir (eumélanine) des souris C57Bl/6.

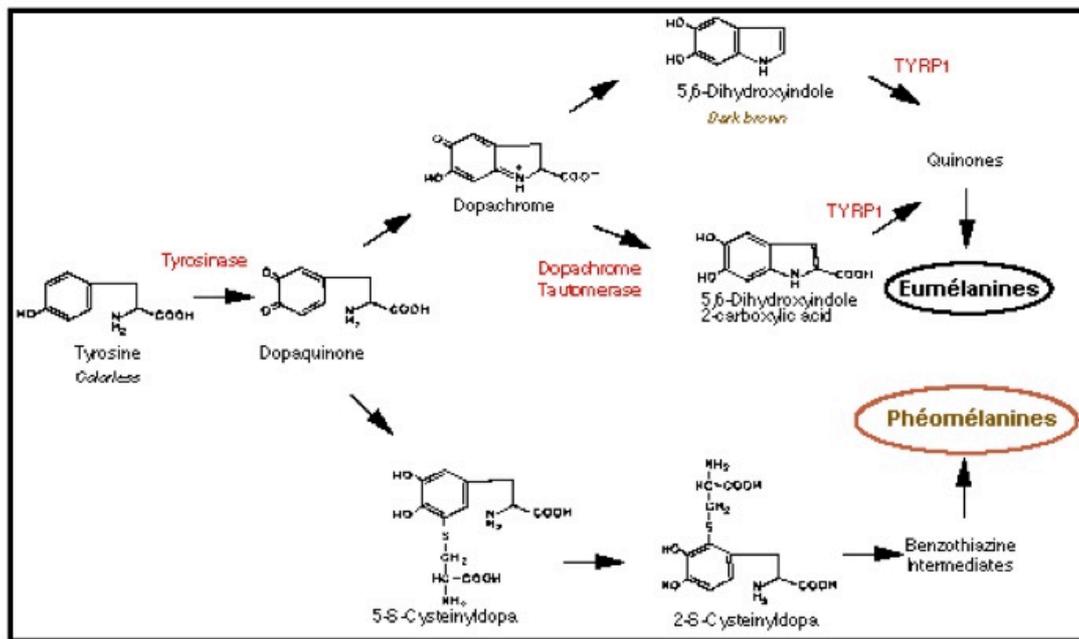


Figure 3. Schéma de la synthèse de la mélanine

L'eumélanine (brun-noir) et la phéomélanine (jaune-rouge) sont produites à partir de la même molécule, la tyrosine. La voie de synthèse de l'eumélanine fait intervenir trois enzymes différentes (Tyrosinase, Dopachrome Tautomérase et TYRP1), alors que la phéomélanine n'a besoin que de la Tyrosinase pour être synthétisée.

I.A.2.c. Mise en place du lignage au cours du développement embryonnaire

Les précurseurs des mélanocytes, les **mélanoblastes**, se différencient à partir des cellules de la **crête neurale** au jour E8.5 du développement embryonnaire chez la souris. Les cellules de la crête neurale sont une population transitoire de cellules embryonnaires multipotentes, provenant de la bordure dorsale de l'ectoderme neural (Douarin and Kalcheim, 1999)(Thomas et al., 2008). Elles subissent une **transition épithélio-mésenchymateuse** (EMT), acquièrent des propriétés migratoires, et se dispersent dans l'ensemble de l'embryon pour donner naissance à une grande diversité de types cellulaires (mélanocytes, neurones, muscles lisses, cartilages, cellules gliales) (Dupin and Le Douarin, 2003; Le Douarin et al., 2004; Weston, 1991).

Ainsi, les mélanoblastes issus de la crête neurale migrent entre le dermatome et l'ectoderme selon un axe dorso-latéral, depuis le tube neural vers leurs différentes destinations (**Figure 4**). Au jour de développement E10.5, les mélanoblastes migrent ventralement à travers le derme, franchissent la lame basale avant de coloniser l'épiderme et les follicules pileux en formation aux alentours de E12.5. Dans le follicule en formation, **les mélanoblastes sont ségrégués en deux populations**: l'une va générer les mélanocytes différenciés qui participent à la pigmentation du premier poil, tandis que l'autre va former le pool de **cellules souches mélanocytaires (MSC)**.

Chez la souris et le poulet, des mélanocytes peuvent également se différencier à partir des précurseurs des cellules de Schwann présents au niveau des nerfs de la peau (Adameyko et al., 2009; Ernfors, 2010). Ces mélanocytes, dits de la deuxième vague, migrent le long des nerfs jusque dans les membres. Cependant, l'existence de cette deuxième vague chez l'Homme n'a pas encore été démontrée à l'heure actuelle.

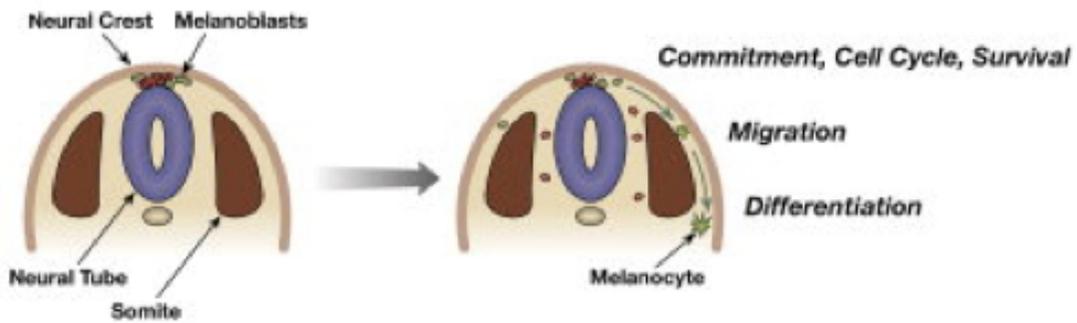


Figure 4. Mise en place du lignage mélanocytaire au cours du développement embryonnaire.

Les mélanoblastes, cellules dérivées de la crête neurale, migrent depuis le tube neural selon un axe dorso-ventral durant le développement embryonnaire. Dans la peau, ils colonisent le follicule pileux en formation ou restent à la jonction derme-épiderme. Les mélanoblastes colonisant le follicule vont se ségréger en deux populations. La première va se différencier en mélanocytes matures du premier cycle du poil, tandis que la seconde donne naissance aux cellules souches mélanocytaires (d'après Steingrímsson et al., 2006).

I.B. Le Follicule Pileux

I.B.1. Description du follicule pileux et de ses annexes

Le **follicule pileux** est une structure épidermique qui s'invagine obliquement jusque dans le derme et qui contient le poil. Avec la **glande sébacée** et le **muscle arrecteur**, le follicule pileux forme l'unité pilo-sébacée (**Figure 5**). Observée en coupe longitudinale, celle-ci se divise en trois régions: l'**infundibulum** (portion superficielle s'étendant de la glande sébacée à la surface de l'épiderme), l'**isthmus** (courte portion entre le conduit de la glande sébacée et la base du muscle arrecteur), et la région **sous-isthmique** (partie inférieure entre le muscle arrecteur et la racine du follicule). A la base du muscle arrecteur, le follicule s'élargit pour former le **bulge**, lieu de résidence des cellules souches kératinocytaires et mélanocytaires. Au-dessus du bulge se situe la **glande sébacée**, qui a pour fonction de générer les sébocytes, cellules productrices de lipides et de sébum. La désintégration de ces cellules provoque la libération d'une huile lubrifiante et protectrice dans le canal du poil.

Le follicule pileux s'organise en couches concentriques de kératinocytes avec, de la plus externe à la plus interne (**Figure 6**):

- - **La Gaine Conjonctive (GC) ou Connective Tissue Sheath (CTS).**

Elle recouvre l'extérieur du follicule en continuité avec le tissu dermique, et est composée de fibroblastes, de macrophages et de fibres de collagène.

- - **La Gaine Folliculaire Externe (GFE) ou l'Outer Root Sheath (ORS).**

Cette gaine est constituée de kératinocytes formant un épithélium stratifié. L'extérieur de la GFE est en contact avec la gaine conjonctive via la lame basale de l'épiderme inter-folliculaire.

- - **La Gaine Folliculaire Interne (GFI) ou l'IRS (Internal Root Sheath)**

Elle est composée de trois couches de kératinocytes différenciées: la couche **Henle** liée à la GFE par des desmosomes, la couche **Huxley** et la **cuticule**.

Le follicule pileux s'élargit au niveau de sa racine créant le **bulbe** (en forme d'oignon), avec en son centre la **papille dermique**, composée de fibroblastes dermiques et vascularisée par des capillaires (apportant aux cellules du follicule pileux les nutriments essentiels à sa croissance). Dans le bulbe, on trouve une couche de kératinocytes en prolifération recouvrant la papille dermique, à la façon d'une demi-sphère, appelée la **matrice**. C'est à partir de celle-ci que croissent la GFI et le poil. **Les mélanocytes différenciés produisant la mélanine transférée au poil se localisent dans la matrice.**

Le **poil** est constitué de cellules kératinisées organisées en trois couches concentriques: la **cuticule** externe, le **cortex** (contenant la mélanine) et au centre la **médula**. Il a un rôle thermo-régulateur (en lien avec le muscle arrecteur lors du phénomène de frisson) et de récepteur sensoriel. Ainsi, on trouve un enchevêtrement de terminaisons nerveuses sensibles s'enroulant autour de chaque follicule, appelé **plexus de la racine du poil**.

A l'exception de la papille dermique et de la gaine conjonctive d'origines mésenchymateuses, les différentes structures du follicule sont d'origines épithéliales

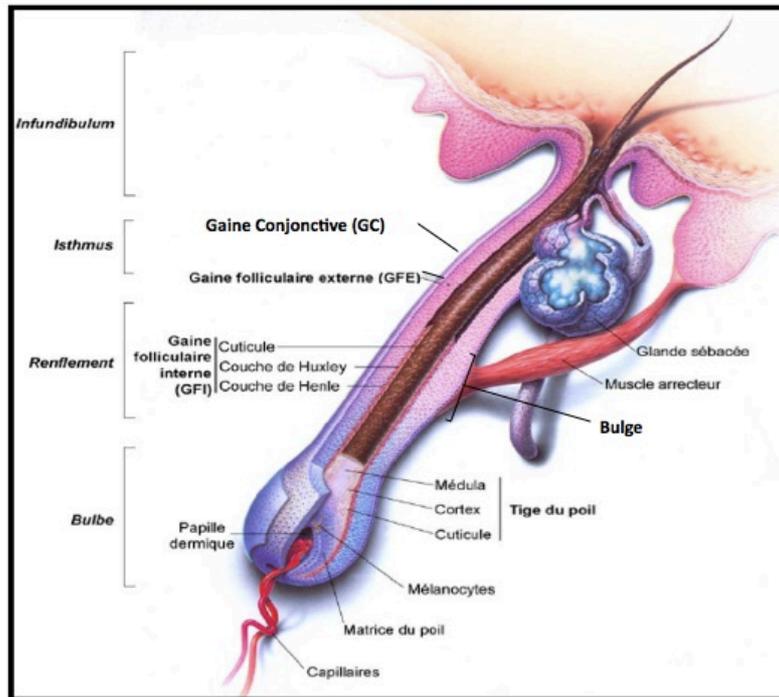


Figure 5. Structure du follicule pileux.

L'unité pilo-sébacée est constituée du follicule pileux, de la glande sébacée et du muscle arrecteur. Le follicule pileux contient le poil et est constitué de trois couches concentriques de kératinocytes: la Gaine Conjonctive, la Gaine Folliculaire Externe et la Gaine Folliculaire Interne. Le bulge, à la base du muscle arrecteur, contient les cellules souches mélanocytaires et kératinocytaires. La racine du follicule, le bulbe, est formée de la papille dermique et de la matrice. Dans cette dernière, on trouve les mélanocytes pigmentés et les kératinocytes en prolifération qui donnent naissance aux gaines folliculaires et au poil.

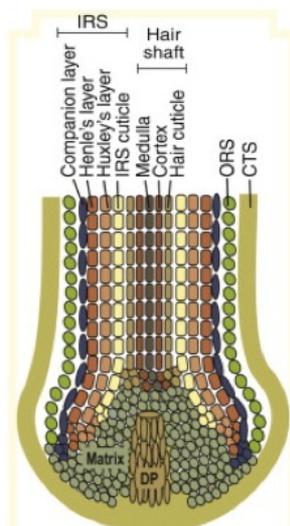


Figure 6. Les différents types cellulaires formant le follicule pileux.

Schéma représentant les différentes couches de cellules formant le follicule pileux en vue longitudinale. IRS: Internal Root Sheath (ou Gaine folliculaire Interne, GFI), ORS: Outer Root Sheath (ou Gaine Folliculaire Externe, GFE), CTS: Connective Tissue Sheath (ou Gaine Conjonctive), DP: Papille Dermique. (D'après Schneider et al., 2009).

I.B.2. Mise en place du follicule pileux au cours du développement

Le développement embryonnaire du follicule pileux met en jeu des interactions ectoderme-mésoderme, qui sont coordonnées par les protéines Wnt et BMP (Bone Morphogenetic Protein). Chez la souris, les signalisations Wnt et BMP sont essentielles pour l'apparition de l'épiderme à partir de l'ectoderme, tandis que seule la signalisation Wnt joue un rôle dans le développement du derme aux alentours de E10.5 (Atit et al., 2006; Fuchs, 2007). A partir du stade E12.5, des cellules mésenchymateuses vont coloniser le derme en formation, entrer en contact avec l'épiderme, et induire la prolifération des kératinocytes en des endroits régulièrement espacés de l'épiderme. Cette prolifération forme un épaissement localisé de l'épiderme, appelé la **placode**, qui s'invagine dans le derme (Atit et al., 2006; Schmidt-Ullrich and Paus, 2005) (**Figure 7**). La signalisation canonique Wnt/ β -caténine joue un rôle primordial dans ce processus. Ainsi l'expression ectopique dans l'épiderme de DKK1, un inhibiteur de Wnt, tout comme l'absence d'expression épidermique de la β -caténine, conduit à l'absence d'induction du développement des follicules pileux (Andl et al., 2002; Huelsken et al., 2001). A l'inverse, l'expression forcée d'une forme stabilisée de la β -caténine, résulte en un excès de follicules, puisque l'ensemble des kératinocytes de l'épiderme adopte un destin folliculaire (Närhi et al., 2008; Zhang et al., 2008). Le mécanisme avancé pour expliquer l'apparition des placodes régulièrement espacées dans l'épiderme, est une expression locale d'activateurs du développement des follicules (Wnt, Eda-A1 and et Noggin), qui annule l'action d'inhibiteurs tels que les BMPs (Maini et al., 2006; Sick et al., 2006; Stark et al., 2007).

Par la suite, les cellules épidermales de la placode sont instruites par des signaux Wnt ectodermiques afin de croître vers le bas et former ainsi un **bourgeon de poil** (Hair Bud) (Noramly et al., 1999). Les kératinocytes folliculaires de la placode envoient eux-mêmes des signaux aux cellules mésenchymateuses du derme sous-jacent, via la voie Sonic hedgehog (Shh), conduisant à l'apparition d'un agrégat de cellules dermiques qui deviendra ultérieurement la **papille dermique** (Chiang et al., 1999; St-Jacques et al., 1998). Les interactions épiderme-derme s'accroissent au cours de l'invagination du follicule en formation, notamment via la papille en devenir qui envoie des signaux

prolifératifs aux cellules situées à son contact. En conséquence, celles-ci prolifèrent et se différencient pour donner la GFE, les trois couches de la GFI et le poil (Botchkarev et al., 1999; Schmidt-Ullrich and Paus, 2005).

De plus, comme évoqué précédemment, le follicule pileux est colonisé par les mélanoblastes au cours de sa formation. **Les mélanoblastes se ségrègent en deux populations, la première colonise le bulbe et donne naissance aux mélanocytes qui vont pigmenter le premier poil. Quant à la seconde population, elle migre dans le bulge, en dessous du muscle arrecteur, et entre en quiescence pour donner le pool de cellules souches mélanocytaires (MSCs).**

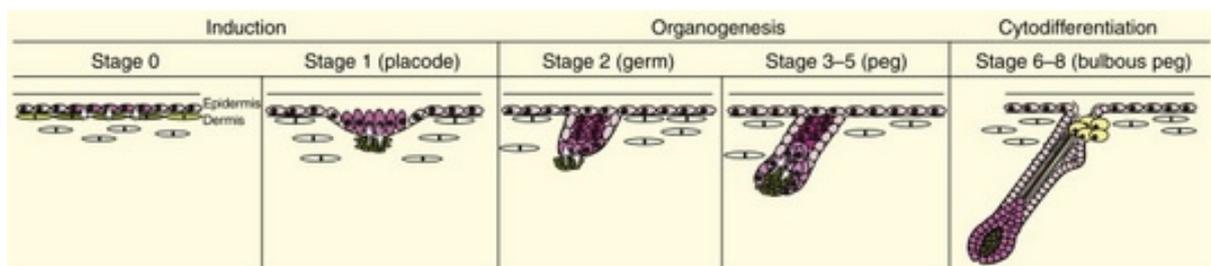


Figure 7. Développement embryonnaire du follicule pileux.

Au cours du développement embryonnaire, les interactions entre l'épiderme et le derme sous-jacent, via la voie Wnt/ β -caténine, vont permettre l'induction du follicule pileux. L'épaississement local de l'épiderme, appelé la placode (Stage 1), et son invagination dans le derme, constituent la première étape de la formation du follicule. La papille dermique se forme à partir de la condensation de cellules dermiques en dessous du follicule en croissance (Stage 2). Un échange de signaux s'établit entre la papille dermique et le follicule en formation, permettant la régulation de la croissance du follicule et l'apparition des différents lignages le composant (Stage 3 à 8).

I.B.3. Le cycle du poil

Le follicule pileux suit un cycle le faisant passer par les trois étapes suivantes: croissance/régression/quiescence (Schneider et al., 2009) (**Figure 8**). En conséquence, le follicule peut être anatomiquement divisé en une partie supérieure permanente, présente à toutes les étapes du cycle (l'infundibulum et l'isthmus), et une partie inférieure transitoire remodelée à chaque cycle (région du bulbe).

La première phase du cycle, appelée **anagène**, est **une étape de régénération** conduisant à la croissance vers le bas du follicule, créant ainsi sa partie transitoire avec à son extrémité le bulbe. Au début de l'anagène, les cellules souches kératinocytaires du bulge sortent de quiescence et commencent à se diviser. Les cellules filles migrent hors

du bulge pour rejoindre la base du follicule en croissance, où elles se regroupent pour former la matrice. Les progéniteurs kératinocytaires de la matrice prolifèrent et se différencient alors pour donner naissance aux différents lignages de l'ORS, de l'IRS et du poil (Fuchs, 2007; Legué and Nicolas, 2005; Müller-Röver et al., 2001; Stenn and Paus, 2001). C'est la papille dermique qui contrôle la prolifération des cellules de la matrice régulant ainsi la taille du bulbe, la longueur du poil et la durée de l'anagène. Au cours de l'anagène, les précurseurs des mélanocytes (issus des cellules souches mélanocytaires du bulge), colonisent la matrice, avant de se différencier, et de produire la mélanine transférée aux kératinocytes du poil en formation. La synthèse de la mélanine s'arrête dès la fin de l'anagène, suite à l'arrêt de l'expression des enzymes clés de la mélanogenèse.

Par la suite, la partie inférieure du follicule subit **une phase de destruction appelée catagène**. Celle-ci est caractérisée par la disparition du bulbe et la mort par apoptose de l'ensemble des cellules de l'ORS, de l'IRS et de la matrice, y compris les mélanocytes. Le bulge est épargné par ce phénomène et se retrouve alors au contact direct de la papille dermique (Müller-Röver et al., 2001; Stenn and Paus, 2001). A la fin de la catagène, seule la partie permanente du follicule persiste. Celui-ci entre alors dans **une phase de repos, la télogène**, qui dure quelques jours lors du premier cycle et s'allonge jusqu'à plusieurs semaines lors des suivants. Ainsi, le cycle du follicule ralentit considérablement avec l'âge. Chez la souris, le premier cycle démarre à la naissance et dure trois semaines. De plus, il est dit synchronisé, c'est-à-dire qu'il démarre et passe par chaque phase de manière simultanée dans tous les follicules pileux. En revanche, en conséquence d'une augmentation hétérogène de la durée de la télogène lors des cycles suivants, les follicules décalent progressivement leurs cycles respectifs. L'épilation permet de resynchroniser l'ensemble des follicules pileux, qui démarrent alors tous une nouvelle anagène (**Figure 9a**). Chez la souris, le poil du cycle précédent (club hair) reste au niveau du canal du follicule même quand le nouveau poil apparaît, contribuant à la densité du pelage. De plus, l'étape du cycle du follicule pileux peut être déterminée en étudiant la couleur et l'épaisseur de la peau des animaux, ce qui facilite son étude (Müller-Röver et al., 2001) (**Figure 9b**).

L'alternance d'étapes de destruction du follicule pileux puis de régénération de celui-ci, implique la présence de cellules souches capables de reformer tous les lignages

du follicule à chaque cycle. Des expériences de pulse-chase ont permis de mettre en évidence la présence de cellules au cycle cellulaire ralenti, caractéristique des cellules souches, au niveau de la région du bulge des follicules pileux (Cotsarelis, 2006; Tiede et al., 2007). Ces expériences ont conduit à l'établissement de l'**hypothèse de l'activation du bulge**. Au début de l'anagène, certaines cellules souches du follicule sont activées et commencent à se diviser. Les cellules filles migrent vers la base du follicule, prolifèrent pour donner les cellules de la matrice, qui par division et différenciation redonnent tous les lignages du follicule. Ainsi, deux types de cellules souches sont nécessaires à la génération d'un poil pigmenté à chaque nouveau cycle: les cellules souches kératinocytaires (donnant le follicule et le poil), et les cellules souches mélanocytaires (redonnant les mélanocytes). Nous allons à présent nous intéresser à ces deux populations de cellules souches: leur localisation, leur activation durant l'anagène et leur coordination en lien avec le cycle du follicule.

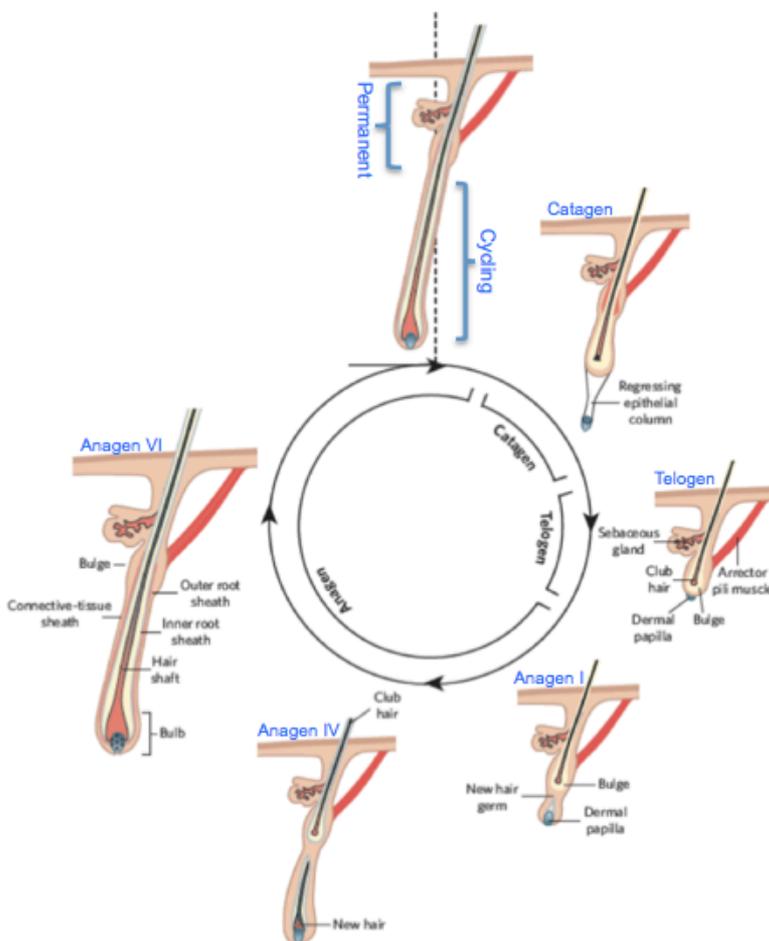


Figure 8. Le cycle du follicule pileux.

Le follicule pileux est en constant remaniement selon un cycle de 3 phases. Au cours de la phase de croissance (anagène I à VI), le poil est produit à partir de la matrice instruite par la papille dermique. Puis les deux tiers inférieurs du poil (dont le bulbe) sont détruits au cours de la catagène, et la partie permanente (correspondant au tiers supérieur) se met au repos pendant la télogène (d'après (Fuchs, 2007)).

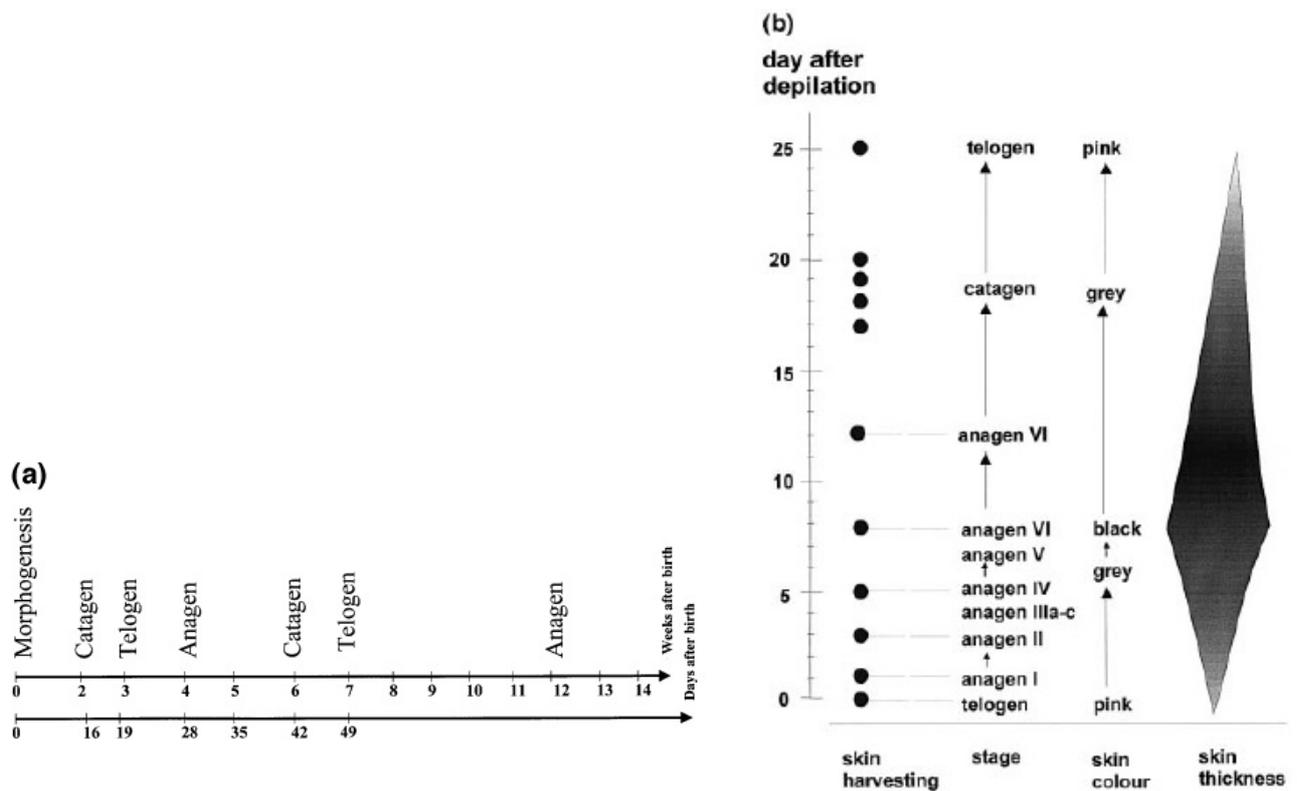


Figure 9. Les cycles du follicule pileux au cours du temps chez la souris.

a) Echelle de temps montrant l'avancement du cycle du follicule pileux chez les souris C57BL/6 de la naissance à 14 semaines de vie.

b) Echelle de temps montrant l'avancement du cycle du follicule pileux, ainsi que le changement de la pigmentation et de l'épaisseur de la peau associés, chez les souris C57BL/6 après épilation (d'après Müller-Röver et al., 2001).

I.C. La niche des cellules souches du follicule pileux

I.C.1. Brève définition des cellules souches adultes

Les cellule souches adultes sont présentes en des endroits restreints des tissus et assurent **l'homéostasie** de ces derniers. Elles sont qualifiées de "somatiques", par opposition aux cellules germinales. Leur rôle consiste à régénérer un tissu, en remplaçant les cellules mortes, que ce soit naturellement ou après une lésion, assurant ainsi la pérennité de la fonction de l'organe pendant toute la vie de l'individu. Elles remplissent cette fonction, d'une part en se multipliant à l'identique (ce qui évite le tarissement du réservoir de cellules souches), d'autre part en se différenciant, acquérant ainsi les caractéristiques du tissu à réparer. Pour maintenir un pool de cellules souches,

la division cellulaire sera soit **symétrique** (généralant deux cellules souches), soit **asymétrique** (généralant un progéniteur et une cellule souche). Les cellules souches adultes sont très hétérogènes, compte tenu de la diversité des tissus de l'organisme auxquels elles appartiennent. Ainsi, certaines sont dites **multipotentes**, c'est-à-dire qu'elles peuvent produire des cellules de morphologie et de fonctions très différentes, mais appartenant à un même organe ou tissu. C'est le cas des cellules souches hématopoïétiques qui produisent toutes les cellules sanguines : globules rouges, blancs, lymphocytes et certaines structures vasculaires. D'autres cellules souches adultes sont qualifiées d'**unipotentes**, c'est-à-dire ne produisant qu'un seul type de cellules. On peut ainsi citer les cellules souches de l'épiderme qui ne produisent que des kératinocytes.

Dans un tissu donné, le compartiment contenant les cellules souches adultes et l'ensemble des composants leur permettant d'assurer leur fonction, tels que les populations cellulaires adjacentes, les molécules de signalisation et les autres composants extracellulaires, sont communément appelés la **niche des cellules souches**.

I.C.2. Le bulge et le hair germ composent la niche des cellules souches du follicule pileux

Au niveau du follicule pileux, le premier compartiment identifié comme la niche des cellules souches fut le **bulge**, situé au niveau du point d'insertion du muscle arrecteur (Fuchs, 2009; Greco and Guo, 2010; Lander et al., 2012). Des expériences de pulse-chase, utilisant des analogues de nucléotides, ont mis en évidence une population de cellules à **cycle cellulaire lent**, résidant à la base de la partie permanente du follicule, c'est-à-dire dans le bulge (Cotsarelis et al., 1990). De plus, des expériences de transplantations ont révélé que les cellules issues de cette population étaient capables de reformer un follicule pileux (Cotsarelis et al., 1990; Oshima et al., 2001).

Pendant de nombreuses années, le bulge a été considéré comme le seul compartiment contenant le pool des cellules souches requis pour la régénération du follicule (Cotsarelis et al., 1990; Oshima et al., 2001). Cependant, des études récentes ont remis en question cette théorie. Elles ont montré que le **hair germ**, un ensemble de cellules épithéliales situé juste au-dessous du bulge en contact direct avec la papille

dermique (**Figure 10**), est le premier lieu d'expression des gènes caractéristiques de l'activation des cellules souches. De plus, des expériences d'incorporation de BrdU ont révélé que les cellules du hair germ entrent en prolifération dès la fin de la télogène, alors que les cellules du bulge sont encore quiescentes, et sont capables de redonner un follicule (Greco et al., 2009; Rompolas et al., 2012). Les auteurs montrent, de surcroît, que les cellules du hair germ prolifèrent plus que celles du bulge *in vitro*, mais ont une capacité d'auto-renouvellement moindre, conduisant à leur disparition rapide contrairement aux cellules du bulge. Ainsi, malgré leurs capacités similaires à redonner les différents types cellulaires formant le follicule, les cellules du hair germ et celles du bulge n'ont pas exactement les mêmes propriétés. Ceci est en accord avec l'observation que le hair germ est biochimiquement différent du bulge (Ito et al., 1999, 2002, 2004). On peut ainsi distinguer le hair germ grâce à son expression de la **P-cadhérine**, tandis que les cellules du bulge expriment le marqueur **CD34** (Greco et al., 2009) (**Figure 10**).

Ces observations ont amené à définir le hair germ comme étant une niche de cellules souches quelque peu différentes de celles du bulge. **La niche des cellules souches du follicule est donc composée de deux compartiments fonctionnellement et moléculairement différents: le bulge et le hair germ.** L'équipe du Dr Greco défend l'hypothèse que les cellules du hair germ dérivent des cellules souches du bulge, mais ont la capacité de répondre plus rapidement aux signaux inducteurs de la sortie de quiescence venant de la papille dermique. Selon cette hypothèse, les cellules du hair germ seraient donc des cellules progénitrices dérivées des cellules souches du bulge. Cependant, à l'heure actuelle, aucune preuve formelle n'a permis de confirmer cette hypothèse.

Cette équipe a proposé un modèle d'activation en deux temps de la niche: les cellules progénitrices du hair germ permettraient l'initiation de la régénération du follicule au début de l'anagène, tandis que le bulge assurerait le maintien de ce processus par la suite (Greco and Guo, 2010; Greco et al., 2009). L'avantage de cette organisation en deux compartiments résiderait dans la capacité à générer rapidement un nouveau follicule, grâce aux cellules activées du hair germ capables de répondre rapidement aux stimuli de l'environnement, tout en conservant un pool de cellules

souches quiescentes à long terme dans le bulge (Greco and Guo, 2010; Greco et al., 2009; Li and Clevers, 2010).

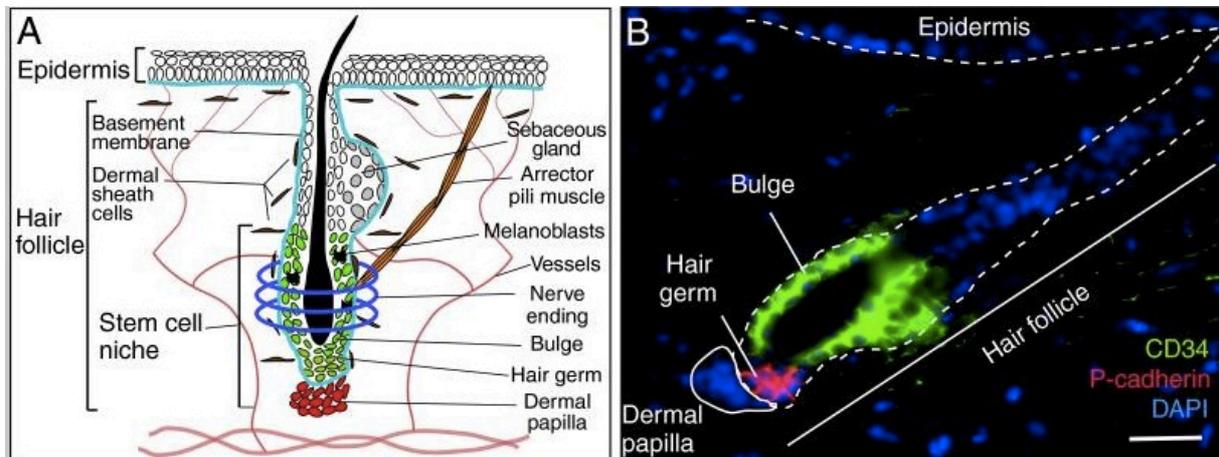


Figure 10. La niche des cellules souches du follicule pileux

La niche des cellules souches du follicule pileux est composée de deux compartiments épithéliaux: le bulge et le hair germ. Le bulge est situé à la base du muscle arrecteur, et contient les cellules souches quiescentes. Il est positif pour le marqueur épithélial CD34 (en vert). Le hair germ se trouve en dessous du bulge, au contact direct de la papille dermique mésenchymateuse (DP). Il est composé de cellules dérivées du bulge déjà "activées", qui sont les premières à proliférer lors de la régénération folliculaire. Le hair germ est facilement reconnaissable grâce à la présence de la molécule d'adhésion P-cadherin (en rouge). Les cellules épithéliales sont délimitées par une ligne en pointillés, et les cellules mésenchymateuses de la DP par une ligne continue (d'après Greco and Guo, 2010).

I.C.3. Les cellules souches kératinocytaires

Il est important de noter ici que l'essentiel des cellules souches du follicule pileux sont les cellules souches kératinocytaires (KSCs), souvent désignées sous l'appellation de cellules souches épithéliales du follicule pileux (HFSCs) dans la littérature. Les cellules souches mélanocytaires (MSCs) sont en minorité, et ont été jusqu'à présent beaucoup moins étudiées. Dans cette partie, nous nous intéresserons aux signaux régulant le maintien des KSCs dans la niche, ainsi que ceux conduisant à leur sortie de quiescence lors de l'anagène. Les voies de signalisations mises en jeu dans les cellules souches mélanocytaires lors de ces processus feront l'objet du chapitre suivant.

I.C.3.a. Les marqueurs des cellules souches kératinocytaires

Depuis le début des années 2000, de nombreux marqueurs moléculaires des KSCs ont été identifiés, ce qui a contribué à une meilleure caractérisation de ces cellules. Ainsi, des expériences de purification suivie de transplantations de cellules K15+/intégrine- α 6+ et CD34+/intégrine- α 6+ du bulge, ont révélé leur capacité à régénérer tous les lignages du follicule, démontrant leur identité de cellules souches (Blanpain et al., 2004; Morris et al., 2004). En plus des marqueurs précédents (Krt15, integrin α 6, CD34), les cellules souches kératinocytaires du bulge peuvent être identifiées grâce à leur expression des gènes *Krt19* (Youssef et al., 2010) *Lgr5* (Jaks et al., 2008), ainsi que des facteurs de transcription *Gli1* (Brownell et al., 2011), *Hopx* (Takeda et al., 2013), *Lhx2* (Mardaryev et al., 2011), *Nfatc1* (Horsley et al., 2008), *Sox9* (Nowak et al., 2008) et *Tcf3* (Merrill et al., 2001). En conclusion, les KSCs du bulge peuvent être identifiées grâce à leur localisation, leur cycle cellulaire lent et leur profil moléculaire spécifique.

I.C.3.b. Maintien de la quiescence dans les cellules souches kératinocytaires au cours de la télogène

Différentes molécules ont été montrées comme intervenant dans le complexe équilibre régulant la balance entre maintien de la quiescence et activation des KSCs (Blanpain et al., 2004; Morris et al., 2004; Ohyama et al., 2006; Tumber et al., 2004). **La signalisation BMP, en coopération avec les inhibiteurs de WNT tels que TCF3 et les protéines DKKs, est indispensable au maintien en quiescence des KSCs (Figure 11)** (Gat et al., 1998; Lo Celso et al., 2004; Van Mater et al., 2003). Durant la télogène, l'expression des BMP 2 et 4 dans la papille dermique, le bulge et le derme joue un rôle déterminant dans ce processus en prévenant la stabilisation de la β -caténine dans les KSCs (Fukumoto et al., 2001), et donc le démarrage du programme génique de l'anagène. En fin de télogène, l'expression des BMPs diminue fortement, parallèlement à une augmentation de la production des inhibiteurs de BMPs, telle que la protéine Noggin produite par la papille dermique, rendant le follicule capable de régénération (Plikus et al., 2008, 2011). De manière notable, l'expression de BMP2 et BMP4 est liée à une activité cyclique des adipocytes. Ainsi, ceux-ci produisent les BMP2/4 durant la télogène, tandis qu'en anagène cette production cesse en même temps que les adipocytes

prolifèrent, expliquant l'épaississement de la peau observé en anagène (Plikus et al., 2008). La peau extrafolliculaire agit donc en coopération avec les signaux intrafolliculaires pour réguler le cycle du follicule (Paus and Foitzik, 2004) (Plikus et al., 2008).

Néanmoins, les mécanismes conduisant à la diminution de l'expression des BMPs et à l'activation de la signalisation Wnt au démarrage de l'anagène restent mystérieux.

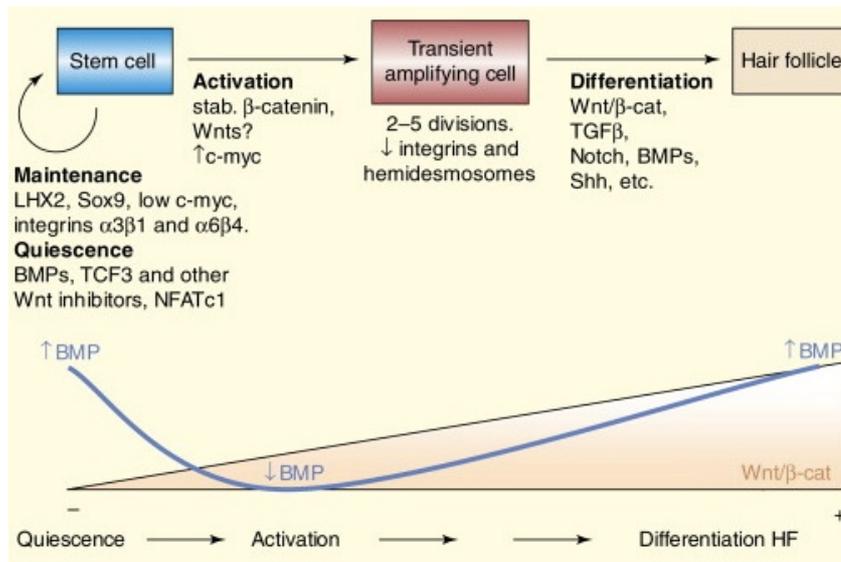


Figure 11. Régulation de la quiescence et de l'activation des KSCs dans la niche du follicule au cours du cycle du poil

Représentation schématique des interactions temporelles entre les différents acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de la quiescence et de l'activation des cellules souches kératinocytaires. Haut de la figure: Liste des molécules requises pour le maintien de la quiescence, l'activation et la différenciation des KSCs. Bas de la figure: Comparaison entre l'activité relative des BMPs (bleu) et Wnt/ β -caténine (orange) nécessaire pour la quiescence, l'activation et la différenciation des KSCs (d'après Schneider et al., 2009).

En sus des BMPs et des inhibiteurs de Wnt, le facteur de transcription NFATc1 joue un rôle essentiel dans le maintien de la quiescence des KSCs. NFATc1 appartient à la famille des facteurs de transcription NFAT, qui compte quatre membres, tous largement exprimés dans de nombreux tissus (Crabtree and Olson, 2002). Une étude a montré que NFATc1 était exprimé dans le bulge et pouvait être un marqueur des KSCs (Horsley et al., 2008). Son expression est activée par la signalisation BMP au cours de la télogène. NFATc1 réprime alors le gène *cdk4* permettant le blocage en phase G1 des KSCs. Au moment de l'anagène, l'inhibition des BMPs provoque la diminution de l'expression de

NFATc1, et conduit à la prolifération des KSCs. Ainsi, chez les souris invalidées pour le gène *nfatc1*, les cellules souches prolifèrent de manière anormale en dehors de la phase d'anagène, conduisant à des défauts dans la formation des follicules pileux (Horsley et al., 2008)

I.C.3.c. Sortie de quiescence des KSCs au début de l'anagène

La télogène peut être divisée en une **phase réfractaire** aux stimuli de croissance du follicule pileux, caractérisée par l'expression des BMP2/4, et **une phase compétente** durant laquelle les KSCs deviennent sensibles aux facteurs d'induction de l'anagène (Plikus et al., 2008). Durant cette phase compétente, la signalisation BMP s'éteint progressivement, tandis qu'à l'inverse la signalisation Wnt/ β -caténine s'active pour atteindre son activité optimale en début d'anagène (**Figure 12**) (Kobielak et al., 2003; Lowry et al., 2005; Plikus et al., 2008).

Un aspect essentiel de la régulation de l'activité du follicule pileux à toutes les étapes du cycle est lié à la papille dermique (DP). **En effet, les cellules mésenchymateuses de celles-ci émettent des signaux qui régulent la quiescence et la prolifération des cellules souches épithéliales de la niche du follicule pileux.** Les interactions mésenchyme-épithélium ainsi mises en jeu sont similaires à celles ayant lieu entre les placodes et les cellules dermiques lors du développement embryonnaire des follicules. La capacité de la papille dermique à induire la sortie de quiescence des KSCs et la croissance du follicule, a été démontrée par des études pionnières de transplantations de papilles dermiques microdisséquées (Jahoda et al., 1984; Reynolds and Jahoda, 1992). Plus récemment, l'équipe de Greco a réalisé des expériences d'ablation de la papille dermique à l'aide de lasers chez la souris. Celles-ci ont apporté la preuve que **la DP est nécessaire et suffisante à l'initiation de l'anagène et de la catagène** (Chi et al., 2013; Rompolas et al., 2012).

Les premières cellules à proliférer au début de la régénération du follicule sont celles situées dans le hair germ à l'interface de la DP (Greco et al., 2009; Ito et al., 2004; Rompolas et al., 2012). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord, la proximité géographique entre la papille dermique et le hair

germ, conduit ce dernier à recevoir en tout premier les signaux d'activation émis par la papille. Une seconde explication avancée est que les cellules souches du hair germ sont déjà dans un stade de différenciation plus avancé que les cellules souches du bulge, et sont donc plus promptes à répondre aux signaux de la DP. Cette hypothèse a été confortée par une étude montrant que les cellules du bulge et celles du hair germ possèdent des signatures moléculaires différentes. La signature du hair germ a révélé l'expression de gènes caractéristiques de l'activation des KSCs, qui sont éteints dans le bulge (Greco et al., 2009). Enfin, une dernière hypothèse propose que les cellules du bulge sont activées dès la télogène, qu'elles migrent alors dans le hair germ où elles commencent à proliférer dès le début de l'anagène (Zhang et al., 2009).

Les signaux émis par la papille dermique sont de différentes sortes. Tout d'abord, lors de la télogène, la DP participe à la production des BMP 2 et 4, du FGF18 et des inhibiteurs de Wnt qui permettent collectivement le maintien en quiescence des KSCs (Kawano et al., 2005; Kimura-Ueki et al., 2012; Plikus et al., 2008). De plus, lors de l'entrée en anagène, elle exprime les inhibiteurs de BMP et les ligands Wnt, permettant l'inhibition de la signalisation BMP et l'activation de la voie Wnt. L'activation canonique de Wnt conduit à la stabilisation de la β -caténine qui est transloquée dans le noyau et va permettre, en coopération avec le complexe LEF1/TCF, l'expression des gènes responsables de l'activation des KSCs (**Figure 12**) (Kobielak et al., 2003; Lowry et al., 2005; Myung et al., 2013; Plikus et al., 2008). Ainsi, un défaut d'entrée en anagène est observé chez les souris exprimant une forme tronquée de la β -caténine dans la DP (Lowry et al., 2005).



Figure 12. Rôle de la voie Wnt dans la régulation de la sortie de l'anagène

Lors de l'anagène, les fibroblastes de la papille dermique envoient des signaux aux cellules souches du hair germ situés au dessus. L'activation de la voie Wnt dans celles-ci va permettre l'expression de gènes impliqués dans la sortie de quiescence. IFE: Interfollicular Epidermis, SG: Sebaceous Gland, HG: Hair Germ, HGFSCs: Hair Follicle Stem Cells, DP: Dermal Papilla (d'après Lien and Fuchs, 2014).

Une autre voie activée grâce à la papille dermique, et impliquée dans l'initiation de l'anagène, est la voie TGF β . En effet, **l'expression de TGF β 2 par la DP active les récepteurs Smad2/3 des KSCs du hair germ et participe ainsi à la transition télogène-anagène** (Oshimori and Fuchs, 2012). Les souris knock-out conditionnel pour le gène *TGF β RII* dans le lignage kératinocytaire, subissent une télogène anormalement longue avec un retard dans le démarrage du nouveau cycle. A l'inverse, une stimulation exogène au TGF β 2 provoque la prolifération des KSCs *in vivo* et *in vitro*. De plus, grâce à des analyses transcriptomiques, le gène *Tmeff1* (*tomoregulin-1*) codant pour une protéine transmembranaire, a été défini comme une cible directe de la signalisation TGF β 2/Smad2/3 activée en fin de télogène dans les KSCs. En conclusion, l'expression du ligand TGF β 2 par les cellules de la papille active la signalisation TGF β 2/Smad2/3 dans les KSCs. Cette signalisation régule l'expression du gène *Tmeff1* dans les KSCs, qui joue

un rôle dans la diminution de l'activité des BMPs, participant ainsi à la transition télogène-anagène.

Après l'initiation de la prolifération des KSCs dans le hair germ, les cellules du bulge sont activées à leur tour et entrent en prolifération. Dans les phases plus avancées de l'anagène, la voie Wnt contrôle la prolifération des cellules de la matrice (DasGupta and Fuchs, 1999; Reddy et al., 2001). La différenciation terminale de ces cellules pour donner l'ORS, l'IRS et le poil nécessite l'activation de la voie BMP (Rendl et al., 2005).

I.C.4. Les cellules souches mélanocytaires

Au niveau du follicule pileux, la prolifération et la maturation des mélanocytes sont étroitement liées au cycle de régénération du poil. Lors de la catagène, les mélanocytes du bulbe meurent par apoptose. En conséquence, **les seules cellules du lignage mélanocytaire présentes au stade télogène sont les cellules souches mélanocytaires** (MSCs), localisées au niveau du bulge et du hair germ. Lors de l'anagène, les MSCs s'auto-renouvellent, génèrent des mélanoblastes qui prolifèrent et migrent vers la base du follicule en formation jusqu'au bulbe, où ils permettront la pigmentation du nouveau poil après différenciation terminale.

L'équipe de Nishimura a été la première à démontrer l'existence d'une population de cellules souches mélanocytaires au niveau du bulge (Nishimura et al., 2002) en montrant que la transplantation de fragments de follicules pileux chez des souris albinos conduisait à l'apparition de poils pigmentés, et ce uniquement si le fragment contenait la région du bulge/hair germ. A l'aide d'expériences d'injections de BrdU au début de l'anagène suivies d'une chasse, cette équipe a identifié dans cette région une population de cellules cyclant lentement, capables d'auto-renouvellement et de se différencier en cellules pigmentées. En outre, en utilisant **la souris transgénique Dct-LacZ, dans laquelle l'expression du rapporteur LacZ est sous le contrôle du promoteur du gène Dct spécifique du lignage mélanocytaire**, les auteurs ont montré que les cellules LacZ⁺ étaient uniquement présentes au niveau du bulge en télogène. Ces cellules LacZ⁺ sont donc les MSCs, qui phénotypiquement sont petites et ovales, ne contiennent pas de granules de mélanine, et ont peu de dendrites, ce qui démontre leur **caractère indifférencié**. Lors de la transition télogène-anagène, la taille de ces cellules augmente,

tout comme le niveau d'expression du rapporteur LacZ. La cellule souche se divise alors, une cellule LacZ⁺ au moins restant dans la niche pour maintenir le pool de MSCs.

En 2005, le même laboratoire a publié une étude cherchant à caractériser au niveau moléculaire les MSCs (Osawa et al., 2005). Les auteurs ont ainsi montré, par immunohistochimie, que les MSCs exprimaient les gènes *Dct* et *Pax3* mais pas ou peu les gènes *c-Kit*, *Sox10* et *Tyrosinase*. A l'aide d'une lignée murine transgénique exprimant la protéine GFP dans le lignage mélanocytaire, **ils ont été les premiers à isoler les MSCs**. Pour cela, les souris sont traitées avec **l'anticorps monoclonal ACK2** qui neutralise le récepteur tyrosine kinase c-Kit (Nishikawa et al., 1991)(Peters et al., 2002). La survie des mélanoblastes et des mélanocytes étant dépendante de la signalisation SCF/c-Kit, ces cellules meurent par apoptose. **Les seules cellules du lignage mélanocytaire présentent chez les souris traitées à l'ACK2 sont donc les MSCs** (Nishikawa et al., 1991). Ces souris présentent alors un poil blanc en raison de la disparition des mélanocytes. Ce phénotype est en partie réversible, les poils redevenant pigmentés lors des cycles suivants grâce au pool de MSCs conservé au niveau du bulge. Cependant, le retour à une pigmentation noire n'est pas total, indiquant que les MSCs ne sont pas complètement insensibles au traitement à l'ACK2, et expriment donc probablement le récepteur c-KIT bien que faiblement et à des niveaux variables . Les MSCs exprimant la GFP ont été purifiées chez des souris traitées à l'ACK2. Les auteurs ont ainsi pu prouver que les MSCs présentent un profil d'expression génique différent des mélanoblastes et des mélanocytes différenciés. En effet, les gènes *Tyrosinase*, *c-Kit*, *Mitf* et *Sox10* sont beaucoup plus faiblement exprimés dans les cellules souches mélanocytaires que dans les mélanoblastes et les mélanocytes. **Cependant, à l'heure actuelle, aucun marqueur spécifique des MSCs n'a été découvert**. Ces cellules sont donc identifiées grâce à leur localisation et à leur faible expression des gènes marqueurs du lignage mélanocytaire tels que *c-Kit*, *Mitf* et *Tyrosinase*.

I.D. Voies de Signalisation impliquées dans l'auto-renouvellement des cellules souches mélanocytaires

I.D.1. Le défaut de maintien des MSCs dans la niche provoque le phénotype de « Hair Graying »

Le défaut de maintien des MSCs dans la niche du follicule pileux entraîne un **phénotype de blanchiment du poil, appelé Hair Graying (HG)**. Ce phénotype résulte d'un **épuisement prématuré du stock de cellules souches**, empêchant de reconstituer le pool de mélanocytes différenciés du bulbe. Les kératinocytes formant le nouveau poil ne reçoivent alors pas de mélanine, conduisant à la formation d'un poil non pigmenté (Steingrímsson et al., 2006). Le HG est l'un des signes les plus évidents du **vieillessement physiologique** chez la souris et l'Homme. En effet, l'accumulation de dommages à l'ADN conduit à la sénescence et/ou l'apoptose des cellules souches mélanocytaires, et donc à l'apparition du HG.

Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux voies de signalisation régulant la balance entre quiescence (en télogène) et activation (en anagène) des MSCs dans la niche du follicule pileux. La connaissance de ces voies est grandement due à l'étude de souris présentant un HG pathologique.

I.D.2. Protection contre l'apoptose des MSCs

I.D.2.a. Rôle de *Bcl2*

Au cours du développement embryonnaire, les mélanoblastes se ségrègent en deux populations, l'une donnant les mélanocytes du premier poil et l'autre colonisant le bulge. Les mélanoblastes arrivés dans le bulge se différencient et entrent en quiescence pour donner le pool de cellules souches mélanocytaires (Nishimura et al., 2002, 2005). Cette population est activée au début de l'anagène de chaque cycle, et se divise pour redonner des mélanocytes différenciés. Après s'être auto-renouvelées, elles rentrent à nouveau en quiescence au milieu de l'anagène, permettant la préservation du pool de MSCs.

Le gène anti-apoptique *Bcl2* est connu pour jouer un rôle dans la régulation de la taille du pool de cellules souches hématopoïétiques (Domen et al., 2000). L'équipe de Nishimura a voulu déterminer s'il était impliqué également dans le maintien des MSCs (Nishimura et al., 2005). Les souris knock-out pour ***Bcl2*** dans le lignage mélanocytaire ne se distinguent pas des contrôles au cours des premiers jours de vie: leur poil est pigmenté avec présence de mélanocytes dans le bulbe et de MSCs dans le bulge. La mise en place du lignage mélanocytaire est donc normale au cours du développement. Cependant, le poil généré au cours du deuxième cycle du poil (à partir du 21ème jour post natal) est blanc chez les souris knock-out. Ce phénotype s'explique par une disparition du lignage mélanocytaire: il n'y a pas de mélanocytes au niveau du bulbe ni de MSCs dans la niche du follicule pileux du deuxième cycle.

Les auteurs ont cherché à déterminer quand et comment la disparition du lignage mélanocytaire avait lieu. Au stade P8.5, les mélanoblastes ayant colonisé les bulges au cours du développement embryonnaire entrent en quiescence pour donner les MSCs. Chez les animaux knock-out, l'absence de *Bcl2* empêche cette entrée en dormance. Ainsi, des expériences de marquage TUNNEL à P8.5 ont révélé une disparition massive des mélanoblastes du bulge par apoptose. Les mélanocytes du bulbe ne sont pas impactés, on les observe toujours chez les souris *Bcl2*^{-/-} à P8.5, et ce jusqu'au début de la catagène (P18), où ils disparaissent par apoptose avec le reste du follicule. Lors de l'anagène du second cycle, en conséquence de l'absence de MSCs dans la niche des souris *Bcl2*^{-/-}, il n'y a pas de mise en place de mélanocytes au niveau du nouveau bulbe, le poil généré est donc blanc. L'absence de phénotype au niveau du premier poil s'explique par le fait que **les mélanocytes du premier poil viennent directement des mélanoblastes embryonnaires, qui ne sont pas passés par le stade MSC, mais ont migré directement dans le bulbe.** Le gène *Bcl2* protège donc les mélanoblastes contre l'apoptose au moment de leur entrée en quiescence à la fin de la première anagène.

L'implication de *Bcl2* dans la protection contre l'apoptose des MSCs a également été montrée en 2008 dans une étude sur le rôle de ***Pten*** dans le lignage mélanocytaire (Inoue-Narita et al., 2008). Les souris portant une mutation conditionnelle de *Pten* dans les cellules du lignage mélanocytaire présentent **une résistance au HG** induit par des épilations répétées. Ainsi, les souris WT perdent graduellement leur pigmentation suite à des épilations répétées et ont tendance à devenir grises (vieillesse physiologique),

tandis que les souris KO restent noires. Les auteurs ont montré une nette augmentation de l'expression de *Bcl2* dans les MSCs déficientes pour PTEN. La surexpression de *Bcl2* observée dans les MSCs *Pten*^{-/-} serait causée par l'augmentation de l'activation des voies Akt et Erk, qui est la conséquence de la disparition de PTEN. Cette surexpression de BCL2 protégerait les MSCs de l'apoptose induite par les dommages à l'ADN. L'épuisement de ces cellules serait alors retardé, expliquant la résistance au HG des souris mutées.

I.D.2.b. Rôle de la voie Notch

L'implication de la voie Notch dans les MSCs *in vivo* a été démontrée pour la première fois en 2006 par l'équipe de Nishikawa (Moriyama et al., 2006). Les auteurs ont réalisé une ablation conditionnelle du gène *RBP-J* (codant pour un facteur de transcription activé par la voie Notch et nécessaire à l'expression des gènes cibles de la voie) dans le lignage mélanocytaire de souris. Celles-ci présentent une dilution importante de la couleur du pelage à la naissance, suivie d'une perte de la pigmentation après la première mue de poils. L'analyse histologique montre une diminution importante du nombre de mélanoblastes chez l'embryon, ainsi que du nombre de mélanocytes dans le bulbe du poil à P4. **Les auteurs montrent que la voie Notch promeut la survie des mélanoblastes embryonnaires via le répresseur transcriptionnel *Hes1*, qui inhibe l'expression des gènes responsables de l'initiation de l'apoptose.** Une analyse histologique plus fine montre que les MSCs sont absentes du bulge des souris mutantes à P12, ce qui conduit à une absence de pigmentation du 2^{ème} poil. Comme pour les souris *Bcl2*^{-/-}, les mélanoblastes des souris mutantes ne sont pas capables de se maintenir dans le bulge au moment de la colonisation de la niche car elles ne répondent pas aux signaux antiapoptotiques.

Par la suite, l'équipe du Dr Friedrich Beermann a apporté une contribution significative à la compréhension du rôle de la voie Notch dans les MSCs *in vivo* (Schouwey et al., 2007). Les auteurs ont utilisé des souris knock-out conditionnel pour les gènes *Notch1* et *Notch2*, et montré que leur ablation dans les cellules du lignage mélanocytaire conduisait à **un phénotype de HG, proportionnel au nombre d'allèles *Notch* floxés.** Ainsi, le phénotype est dose dépendant, l'effet le plus important étant obtenu avec une ablation des 2 allèles de chacun des gènes *Notch1* et *Notch2*. De plus, le

gène *Notch2* semble avoir un rôle prépondérant dans la pigmentation, étant donné que les souris *Notch2*^{-/-} ont un HG plus important que les souris *Notch1*^{-/-}. Ce phénotype s'aggrave avec le temps, conduisant à une perte totale de la pigmentation, et ce quel que soit le nombre d'allèles perdus. Cette étude est la première à décrire un réel problème de maintien des MSCs n'impliquant pas le développement du lignage. En effet, il est montré que le nombre de mélanoblastes chez les souris portant 3 ou 4 allèles mutés est normal au cours du développement embryonnaire. Cependant, par la suite, le nombre de MSCs dans le bulge des souris knock-out diminue à chaque cycle jusqu'à disparition totale, conduisant au HG progressif observé. Ces résultats soulignent donc **le rôle important de la signalisation induite par Notch1 et Notch2 dans le maintien des MSCs après la naissance**. Les auteurs supposent que le rôle de la signalisation Notch, est de protéger les MSCs de l'apoptose au moment de la réentrée en quiescence de celles-ci à la fin de l'anagène.

En accord avec les résultats présentés ci-dessus, une étude intéressante de 2008 a confirmé le rôle de la voie Notch dans le maintien des MSCs (Kumano et al., 2008). **L'administration par voie orale d'un inhibiteur de la voie Notch**, le GSI (γ -secretase inhibitor), à des souris C57Bl/6 de 8 semaines conduit à l'apparition de taches grises. Celles-ci apparaissent dès 14 jours de traitement, grossissent pendant les 4 semaines du traitement et demeurent inchangées 6 mois après la fin. L'utilisation des souris *Dct::LacZ* a permis de montrer une disparition des MSCs du bulge des follicules pileux situés au niveau des taches.

I.D.3. Maintien en quiescence des MSCs

I.D.3.a. Rôle du gène *Mitf* et de la protéine ATM

L'étude présentant le rôle de *Bcl2* dans la protection contre l'apoptose décrit un second modèle de HG lié au gène *Mitf* (Nishimura et al., 2005). Les souris *Mitf*^{vit/vit} portant une mutation hypomorphe du facteur de transcription MITF, montrent un phénotype de HG progressif. En effet, les MSCs disparaissent progressivement de la niche au cours des cycles successifs. Les auteurs ont ainsi observé l'apparition de **cellules dendritiques pigmentées** dans le bulge à partir du 3^{ème} cycle du poil. Cette pigmentation ectopique pourrait être le signe d'une **différenciation prématurée des**

MSCs ou d'une entrée en sénescence de celles-ci. En effet, il a été démontré *in vitro* que l'activation du programme de sénescence dans les mélanocytes conduisait à leur pigmentation (Medrano et al., 1994). Des travaux ont permis de trancher entre ces deux hypothèses: c'est la différenciation précoce des MSCs qui explique leur disparition (Inomata et al., 2009). En effet, des souris exposées à des radiations ionisantes présentent un phénotype de HG avec présence de cellules pigmentées dans le bulge, mais ne présentant pas de marqueurs d'apoptose ou de sénescence. En outre, Inomata et ses collègues montrent que la délétion de la protéine serine/threonine kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), protéine clé des réponses aux dommages à l'ADN, conduit à la différenciation précoce des MSCs en mélanocytes matures. L'ATM protège donc les MSCs d'une différenciation précoce en activant la réparation de l'ADN, et agit comme un point de contrôle de la stemness protégeant le pool de MSCs en quantité et en qualité. L'expression du gène *Mitf* est aussi nécessaire au maintien des MSCs dans la niche au cours des cycles successifs.

I.D.3.b. Rôle de la voie Wnt

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation de la voie Wnt dans les KSCs au moment de l'anagène, joue un rôle primordial dans leur sortie de quiescence (voir paragraphe I-3.3.2 (Lowry et al., 2005)). Une étude a cherché à déterminer si la voie Wnt pouvait jouer un rôle identique dans les cellules souches mélanocytaires (Rabbani et al., 2011). Pour cela, les auteurs ont commencé par étudier la localisation de la β -caténine dans les KSCs et les MSCs au cours du cycle. Ils ont démontré qu'en télogène la β -caténine est confinée dans le cytoplasme des MSCs dans la zone du bulge/Hair germ, révélant une inactivation de la voie Wnt. Au début de l'anagène, les MSCs et les KSCs du hair germ expriment une β -caténine nucléaire, et donc une activation canonique de la voie Wnt. Cette activation persiste tout au long de l'anagène, la localisation nucléaire de la β -caténine ne disparaissant qu'au moment de la transition anagène-catagène. Dans la suite de l'étude, les auteurs utilisent la souris transgénique *Tyr-CreER^{T2}; β -catenin^{fl(ex3)/+}*, dans laquelle une forme dominante de la β -caténine peut être produite suite à un traitement au Tamoxifène et ce, spécifiquement dans les mélanocytes puisque la Cre est sous le contrôle du promoteur du gène *Tyrosinase*. Cette forme mutante ne peut être phosphorylée par GSK3 β , et conduit donc à une activation constitutive de la voie

canonique Wnt. Suite à l'injection de Tamoxifène dans ce modèle murin, les MSCs se différencient de manière prématurée dans la niche, perdent leur capacité d'auto-renouvellement et disparaissent donc progressivement, induisant un phénotype de hair graying. En outre, les auteurs s'intéressent à une lignée murine knock-out conditionnel pour la β -caténine, spécifiquement dans les mélanocytes après un traitement à la doxycycline (*Tyr-rtTA;tetO-Cre; β -catenin^{f/f}*). Les MSCs de cette souris présentent un défaut de prolifération, conduisant à un nombre réduit de mélanocytes dans le bulbe, et en conséquence à un défaut de pigmentation. Par contre, il n'y a pas présence de cellules pigmentées au niveau du bulge, donc pas de différenciation précoce des cellules souches mélanocytaires.

L'activation de la voie Wnt contrôle donc la sortie de quiescence des MSCs au moment de l'anagène. Son activation constitutive conduit à une perte de ces cellules par différenciation précoce. A l'inverse, son inactivation dans les MSCs provoque un défaut de prolifération de celles-ci. Les cellules souches sont conservées, mais ne génèrent pas suffisamment de mélanocytes à chaque cycle pour régénérer un poil complètement pigmenté.

I.D.3.c. Rôle de la signalisation TGF β

Des études ont suggéré un rôle de la voie TGF β dans le maintien de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques (Karlsson et al., 2007; Larsson et al., 2003) et neurales (Falk et al., 2008). De plus, une étude transcriptomique a montré une activation de la voie TGF β dans les cellules souches du bulge (Tumbar et al., 2004). A partir de ces éléments, Nishimura et ses collègues ont émis l'hypothèse de l'implication de la voie TGF β dans la régulation de la quiescence des MSCs (Nishimura et al., 2010).

Tout d'abord, les auteurs montrent que le TGF β induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 chez les mélanocytes cultivés *in vitro*. Les mélanocytes sont maintenus dans un état indifférencié par une régulation négative du facteur de transcription MITF et de ses gènes cibles, tel que le gène de la *tryrosinase*. Par la suite, Nishimura et ses collègues révèlent que la signalisation TGF β est activée dans les MSCs *in vivo* lors de leur entrée en quiescence au milieu de l'anagène. De plus, ils montrent **qu'une délétion du récepteur TGF β II dans le lignage mélanocytaire induit un défaut de maintien des MSCs**. Chez

les souris *TGFβ1IR^{-/-}*, les MSCs activées en début d'anagène ne retournent pas en quiescence après s'être divisées, mais se différencient en cellules pigmentées. La perte progressive des MSCs conduit à l'apparition d'un phénotype de hair graying chez ces souris. Cette étude prouve donc clairement que **la voie du TGFβ est un facteur clé du maintien des MSCs en inhibant leur différenciation et en induisant leur quiescence**. En outre, les auteurs montrent que **le retour en quiescence des MSCs par l'action du TGFβ est dépendant du gène anti-apoptotique *Bcl2***. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les souris knock-out dans leur lignage mélanocytaire pour *Bcl2* blanchissent brutalement à P8.5 en conséquence de la mort par apoptose des mélanoblastes (voir paragraphe I-4.2.1 (Nishimura et al., 2005)). Nishimura et ses collègues ont pu empêcher l'apparition de ce phénotype en traitant les souris knock-out pour *Bcl2* avec un anticorps bloquant du TGFβ. La voie TGFβ induit donc l'apoptose des MSCs en l'absence de *Bcl2* au moment de l'entrée en quiescence de ces cellules à la fin de l'anagène.

Nous venons de voir que de nombreuses voies de signalisation sont mises en jeu pour permettre le maintien d'un pool de MSCs tout au long de la vie, tout en garantissant la production de nouveaux mélanocytes à chaque cycle. Un niveau supérieur de régulation des MSCs existe, du fait de la cohabitation des MSCs avec les KSCs dans une niche commune. En effet, ces deux populations doivent avoir une activité harmonieuse à chaque étape du cycle folliculaire, afin de permettre la régénération d'un poil pigmenté.

I.D.4. Les KSCs ont un rôle primordial dans le maintien des MSCs au sein de la niche du follicule

Le bulge et le hair germ contiennent deux populations de cellules souches d'origines différentes: les KSCs et les MSCs. Elles sont toutes deux indispensables à la génération d'un poil pigmenté à chaque cycle du follicule. Il apparaît donc nécessaire qu'elles interagissent et communiquent afin de coordonner leur comportement pour la bonne régénération du follicule au cours de l'anagène. A l'heure actuelle, encore peu de choses sont connues sur les mécanismes régulant la coordination de ces deux populations, mais quelques études ont d'ores et déjà apporté quelques éléments de réponse, que nous

allons détailler ci-dessous.

I.D.4.a. L'activation de la voie Wnt dans les MSCs en anagène est contrôlée par les KSCs, via la signalisation Edn1/EdnrB

La voie Wnt est nécessaire à la prolifération et à la différenciation des MSCs et des KSCs au moment de l'anagène (voir paragraphe I-3.3.2 et I-4.3.1 (Lowry et al., 2005; Rabbani et al., 2011)).

L'étude publiée par Rabbani et ses collègues en 2011, montre que malgré l'activation de la voie Wnt dans les MSCs au moment de l'anagène, celles-ci ne produisent pas de ligands Wnt. Ce sont les KSCs du hair germ qui expriment plusieurs ligands, dont Wnt10b et Wntless, ce dernier étant connu pour permettre la sécrétion des ligands Wnt. De plus, lorsque les souris *K14-CreER;β-catenin^{fl/fl}*, délétées pour la protéine β-caténine dans les KSCs, sont injectées avec des billes recouvertes du ligand Wnt7a, on observe une localisation nucléaire de la β-caténine dans les MSCs. La présence d'un ligand Wnt exogène est donc suffisante à l'activation de la voie Wnt dans les MSCs. En outre, l'activation constitutive cette voie dans les KSCs, via la souris *K14-CreER;β-catenin^{fl(ex3)/+}*, conduit non seulement à une hyper prolifération des KSCs mais aussi des MSCs. **Ainsi, l'activation de la voie Wnt dans les MSCs au moment de l'anagène est contrôlée par les KSCs.**

Dans la suite de l'étude, les auteurs révèlent que la stabilisation de la β-caténine dans les KSCs du hair germ est corrélée à l'augmentation de l'expression du gène *Edn1*. Celui-ci est une cible directe de Wnt (Kim et al., 2005), et est connu pour être un puissant mitogène des mélanocytes (Saldana-Caboverde and Kos, 2010). Les MSCs n'expriment pas le gène *Edn1*, mais expriment son récepteur EdnrB. Finalement, les auteurs montrent que **l'activation de la signalisation Wnt dans les KSCs du hair germ en anagène conduit à l'induction de l'expression de l'Edn1. Celle-ci est sécrétée par les KSCs, et active la prolifération des MSCs via leurs récepteurs EdnrB.** Ainsi, les KSCs régulent l'activation des MSCs au moment de l'anagène, permettant une prolifération simultanée des deux populations de cellules souches.

Une étude très récente a cherché à déterminer le rôle précis de la signalisation Edn/EdnrB dans les MSCs (Takeo et al., 2016). Les auteurs ont généré des souris

délétées pour le gène *EdnrB* spécifiquement dans le lignage mélanocytaire. Celles-ci présentent un phénotype de HG progressif, dû à un défaut de prolifération et de maintenance des MSCs. De plus, le nombre de mélanocytes du bulbe est significativement moindre que chez les contrôles et ils subissent une apoptose. Les auteurs montrent que l'*Edn1* ne promeut la prolifération et la différenciation des MSCs qu'en présence d'une voie Wnt activée via les KSCs. Ainsi, des souris knock-in pour l'*Edn1* et knock-out pour la β -caténine présentent un hair graying, à l'inverse des souris seulement knock-in pour le gène *Edn1* qui montrent une hyper prolifération des MSCs.

I.D.4.b. Le facteur nucléaire I/B produit par les KSCs régule la prolifération des MSCs

En 2013, l'équipe de Fuchs a identifié un gène impliqué dans la coordination du comportement des deux populations de cellules souches du follicule (Chang et al., 2013). Elle a ainsi montré que le **facteur nucléaire I/B (NFIB) produit par les KSCs régule la division et la différenciation des MSCs.**

Le NFIB est présent dans le bulge et le hair germ en télogène. Lors de l'anagène, on le retrouve dans la matrice et dans la partie haute de l'ORS. Les auteurs ont montré que le NFIB ne colocalise pas avec les cellules souches mélanocytaires dans le bulge, ni avec les mélanocytes du bulbe, mais qu'**il est exprimé par les cellules kératinocytaires.** Afin de déterminer le rôle du NFIB au niveau du follicule, la lignée murine *Nfib*^{fl/fl} a été croisée avec la lignée *Sox9-CreER* ou *K15-CrePGR*. Étonnamment, les souris issues de ces croisements ne présentent pas d'altération de la peau ni du cycle du follicule pileux, malgré une complète disparition du NFIB dans les kératinocytes. Cependant, de manière très intéressante, une altération de la régulation du lignage mélanocytaire a été détectée. En effet, des **mélanocytes pigmentés sont présents dans le bulge en télogène.** De plus, chez les souris mutantes, la population de MSCs prolifère beaucoup plus, conduisant à **un nombre de MSCs plus important dans le bulge à toutes les étapes du cycle, sauf au moment de la fin de la catagène.** En effet, lors de la catagène, certaines des MSCs en surnombre du bulge se retrouvent au contact direct de la papille dermique, et en conséquence des signaux émis par celle-ci, se différencient en mélanocyte. On observe alors des mélanocytes pigmentés dans le bulge au moment de la télogène, qui disparaissent en anagène par un mécanisme non élucidé. Il semble que

l'hyper prolifération des MSCs observée chez les souris *Nfib*^{-/-} compense la différenciation précoce de certaines d'entre elles en catagène. Ainsi, **le pool de MSC reste suffisant** au cours de la vie des souris mutantes pour régénérer un poil pigmenté à chaque cycle. **Aucun phénotype de HG n'est donc observé chez les souris *Nfib*^{-/-}.**

Afin de comprendre par quel mécanisme le **NFIB produit par les KSCs** régule la division et la différenciation des MSCs, les auteurs ont cherché ses cibles directes par des expériences de CHIP-Seq menées sur les KSCs de souris contrôles et mutantes. Ils ont ainsi montré que **le gène cible *Edn2* était deux fois plus exprimé chez les KSCs des souris *Nfib*^{-/-}** par rapport aux KSCs issues d'animaux WT. De plus, lorsque des embryons WT sont transfectés avec des lentivirus permettant l'induction de l'expression de l'*Edn2* dans l'épiderme, la population de MSCs augmente et des mélanocytes pigmentés apparaissent dans le bulge. A l'inverse, chez les souris *Nfib*^{fl/fl} traitées avec un inhibiteur du récepteur de l'EDN2, aucun mélanocyte différencié n'est observé dans le bulge.

Ces données montrent que l'expression de *Nfib* dans les cellules souches kératinocytaires participe au contrôle de la division et de la différenciation des cellules souches mélanocytaires. Les auteurs avancent l'hypothèse suivante: **L'EDN2 produite et sécrétée par les KSCs sous le contrôle du NFIB, agirait sur la prolifération des MSCs via leurs récepteurs EDNRA et EDNRB.**

I.D.4.d. L'activation de la voie TGFβ dans les KSCs permet le maintien des MSCs dans la niche

Les adhésions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire sont essentielles pour l'architecture des niches et le maintien des cellules souches (Raymond et al., 2009). Concernant les cellules souches de la peau plus particulièrement, il a été suggéré que l'adhésion à la matrice extracellulaire était un facteur important du maintien des cellules souches épidermales (Green, 1977; Watt, 2002).

En rapport avec ces données, une étude a révélé que le **collagène XVII** (COL17A1/BP180/BPAG2) est très exprimé dans les KSCs, et requis non seulement pour le maintien des KSCs, mais aussi pour celui des MSCs (Tanimura et al., 2011). Ces dernières n'expriment pas le gène *Col17a1* mais adhèrent directement aux KSCs qui eux

l'expriment (Tanimura et al., 2011). Le collagène XVII est une protéine transmembranaire qui appartient aux **hémidesmosomes** assurant l'ancrage des kératinocytes à la lame basale de l'épiderme. Les souris *Col17a1*^{-/-} présentent un **phénotype de perte des poils** précédé par un **hair graying progressif**. Les MSCs subissent une différenciation précoce: des cellules pigmentées présentant une forme dendritique sont ainsi retrouvées aux alentours de 12 semaines dans le bulge des souris mutantes. A 5 mois, les MSCs ont totalement disparu du bulge, et le bulbe des souris *Col17a1*^{-/-} ne contient pas de mélanocytes. De plus, les KSCs se différencient aussi de manière précoce, conduisant à des cycles du poil plus courts, puis progressivement à une atrophie des follicules pileux. Chez les souris âgées de 6 mois, la perte totale des KSCs conduit à la perte des poils. **L'expression du gène *Col17a1* par les KSCs est donc critique pour l'auto-renouvellement des KSCs et des MSCs en maintenant leur quiescence au cours de la télogène.**

Le laboratoire ayant entrepris cette étude, est le même que celui ayant montré que la délétion du récepteur TGFbRII dans le lignage mélanocytaire était responsable d'une différenciation précoce des MSCs (Nishimura et al., 2010). Cependant, cette étude n'avait pas permis de déterminer si le signal TGFβ assurant le maintien des MSCs venait de celles-ci ou des KSCs les entourant. La disparition des MSCs chez les souris *Col17a1*^{-/-} rappelant celle observée chez les souris *TGFbRII*^{-/-}, les auteurs ont émis **l'hypothèse que le défaut d'auto-renouvellement des MSCs chez les souris *Col17a1*^{-/-} était dû à un défaut de signal TGFβ en provenance des KSCs.** Les auteurs ont pu confirmer cette hypothèse en montrant que les KSCs des souris sauvages pour *Col17a1* produisent du TGFβ1/2 en télogène, à l'inverse des souris mutantes. De plus, les souris knock-out conditionnel pour *TGFβ1/2* dans le lignage kératinocytaire montrent un phénotype de HG consécutif à la disparition des MSCs.

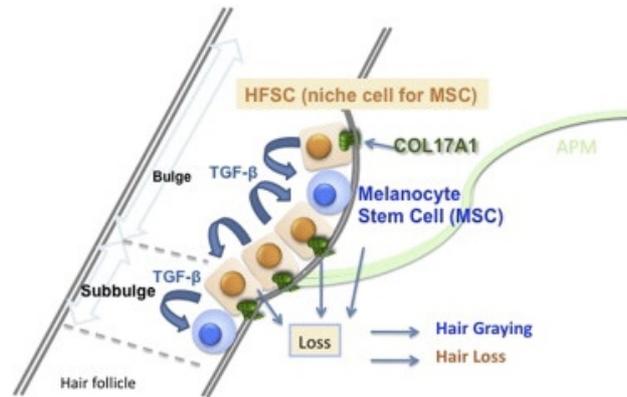


Figure 13. Les KSCs forment un environnement nécessaire au maintien des MSCs dans la niche.

Le collagène XVII (COL17A1) assure l'adhésion des KSCs (HFSC sur le schéma) à la lame basale, et donc la cohésion de la niche. L'absence de cette protéine conduit à la disparition des KSCs et à une perte des poils. Les MSCs disparaissent alors suite à la perte de cohésion de la niche et d'une absence de signal TGFβ1/2 produit par les KSCs. APM: Arrector Pili Muscle, HFS: Hair Follicle Stem Cell (correspondent aux cellules souches kératinocytaires ou KSCs) (Tanimura et al., 2011)

En conclusion, **la production du TGFβ1/2 par les KSCs est requise pour le maintien de la quiescence des MSCs.** En l'absence de la protéine transmembranaire COLLAGEN XVII, une différenciation précoce des KSCs a lieu dans la niche des cellules souches du follicule pileux. La disparition des KSCs conduit à une absence de signal TGFβ1/2, et donc à un défaut d'auto-renouvellement des MSCs. La perte de ces deux populations de cellules souches est donc liée, et résulte en un HG suivi d'une disparition des poils (Figure 13).

I.E. La signalisation RAS/RAF/MEK/ERK dans le lignage mélanocytaire

La voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK est mutée dans la majorité des cas de mélanome cutané, tumeur dérivée des mélanocytes. Cependant, son rôle dans l'homéostasie du lignage mélanocytaire est mal connu. Durant mon doctorat, je me suis intéressée aux rôles des protéines B-RAF et C-RAF, membre de la voie RAS/RAF/MEK/ERK, dans le lignage mélanocytaire. Ce travail a permis de montrer leur implication dans l'auto-renouvellement des MSCs (Chapitre Résultats). Dans cette partie,

nous allons nous intéresser au fonctionnement général de cette voie, puis plus précisément à la structure et aux fonctions des protéines RAF, enfin nous verrons le rôle de cette voie dans le mélanome cutané.

I.E.1. Présentation de la voie

La voie RAS/RAF/MEK/ERK est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires aussi diverses, et parfois contradictoires, que la prolifération, l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation terminale, la migration, l'angiogénèse et l'apoptose. Sa dérégulation peut conduire à un large spectre de pathologies chez l'Homme, notamment des maladies du développement et de nombreux types de cancers (Duesbery and Vande Woude, 2006; Wellbrock et al., 2004a).

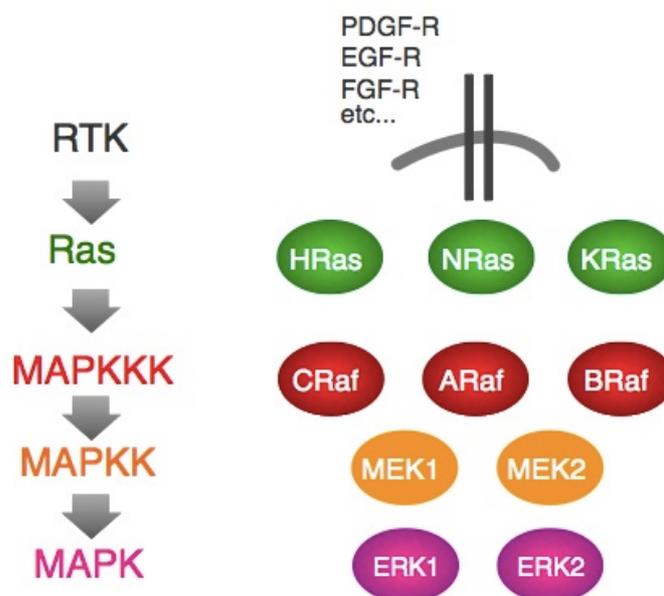


Figure 14. Signalisation RAS/RAF/MEK/ERK

Schéma représentant les différents acteurs moléculaires appartenant à la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK. RTK: Récepteur Tyrosine Kinase, MAPK: Mitogen Activated Protein Kinases, PDGF-R: Platelet Derived Growth Factor Receptor, EGR-R: Epidermal Growth Factor Receptor, FGF-R: Fibroblast Growth Factor Receptor.

Cette voie de signalisation fait partie des cascades **MAPK** (Mitogen Activated Protein Kinases), très conservées de la levure aux vertébrés, et impliquées dans de nombreux processus physiologiques. Elles font intervenir un ensemble de trois kinases, s'activant séquentiellement et spécifiquement par phosphorylation : une MAPK kinase kinase (**MAPKKK**) active une MAPK kinase (**MAPKK**) qui elle-même active une **MAPK**

(Johnson and Lapadat, 2002). Dans le cas de la voie RAS/RAF/MEK/ERK, on trouve trois MAPKKs: **A-RAF**, **B-RAF** et **C-RAF**, deux MAPKKs: **MEK1** et **MEK2**, et deux MAPKs: **ERK1** et **ERK2** (**Figure 14**) (Peyssonnaud and Eychène, 2001).

L'activation de la voie est consécutive à la fixation d'un ligand extracellulaire, tel qu'un facteur de croissance ou une cytokine, sur un **récepteur tyrosine kinase** membranaire (RTK). Les principaux récepteurs de facteurs de croissance capables d'activer la voie RAS/RAF/MEK/ERK sont: l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), le FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor), l'IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor) et le PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor). Ces RTKs sont constitués d'un domaine extracellulaire N-terminal de liaison au ligand, qui est connecté par une hélice transmembranaire à un domaine C-terminal intracellulaire responsable de l'activité tyrosine kinase (McKay and Morrison, 2007; Schlessinger, 2000). A l'état inactif le RTK se trouve sous forme d'un monomère à la surface cellulaire (**Figure 15**). La liaison du ligand induit sa dimérisation avec un autre récepteur, conduisant à l'autophosphorylation en trans des résidus tyrosine du domaine cytoplasmique de ce dernier. Ces résidus phosphorylés servent de site d'ancrage pour des **protéines intracellulaires adaptatrices** contenant un domaine SH2 (Src homology-2), capable de reconnaître ces tyrosines phosphorylées (Downward, 2003). Ces protéines à domaine SH2 jouent un rôle central dans la transmission des signaux intracellulaires, raison pour laquelle on les retrouve dans la plupart des voies de signalisations. Dans le cas de la voie RAS/RAF/MEK/ERK, on peut citer par exemple la protéine Grb2 qui, en formant un complexe avec le facteur d'échange hSos, va permettre l'activation des protéines RAS.

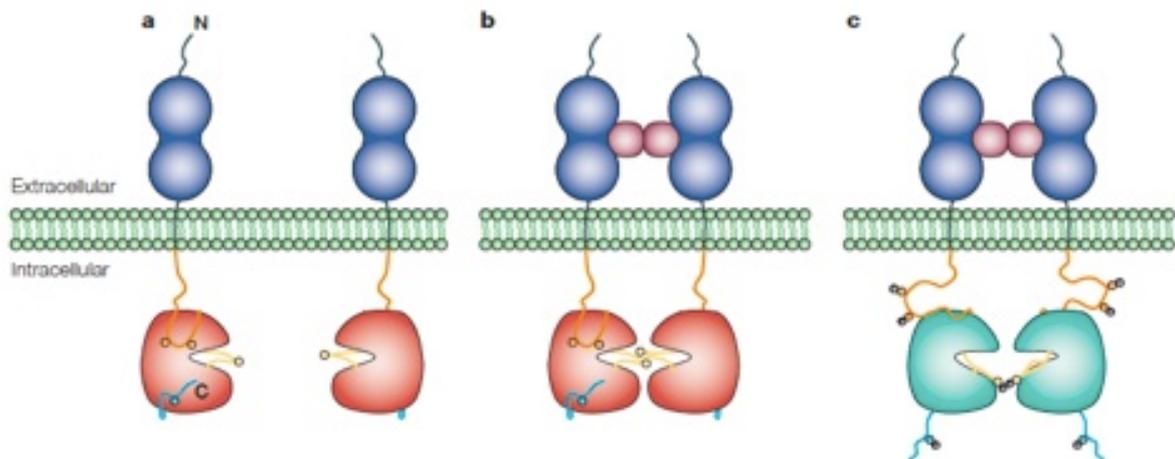


Figure 15. Structure et activation du récepteur à activité tyrosine kinase.

(a) en absence de ligand, le récepteur est sous forme monomérique. Le domaine tyrosine kinase (en rouge) est maintenu dans un état basal inactif par le domaine juxtamembranaire (en orange) et la queue C-terminale (en bleu). (b) la liaison du ligand (en rose) permet la dimérisation du domaine extracellulaire, conduisant à la transphosphorylation des résidus tyrosine. (c) les domaines kinase sont alors dans un état actif (en vert) et les protéines cibles peuvent s'accrocher aux phosphotyrosines spécifiques (d'après Hubbard, 2004).

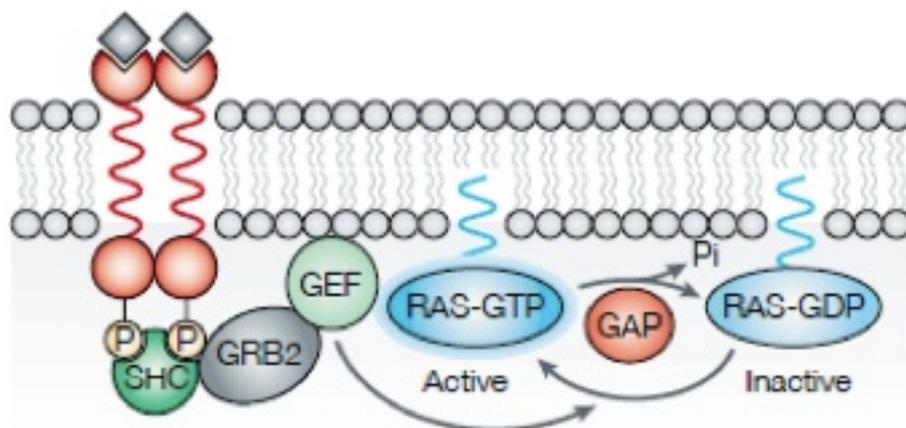


Figure 16. Activation des protéines Ras par les RTK.

Les protéines Ras sont petites protéines à activité GTPase qui oscillent entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. Le passage d'une forme à une autre est catalysé par les protéines GEF et GAP. L'activation du RTK par liaison de son ligand permet la liaison de la protéine adaptatrice Grb2, via Shc, ce qui conduit au recrutement du facteur GEF/SOS à la membrane (d'après Downward, 2003).

La famille des oncoprotéines RAS comprend trois gènes bien caractérisés: **KRas**, **HRas** et **NRas**, qui codent pour des protéines ancrées par leur extrémité C-terminale à la

face interne de la membrane cellulaire. Les protéines RAS font partie de la famille des **petites protéines à activité GTPase** (Kolch, 2000; Peyssonnaud and Eychène, 2001). Elles jouent un rôle d'" interrupteur " au sein des voies de signalisation, en oscillant entre deux états: un état dit actif lorsqu'elles sont liées au GTP (Guanosine Tri-Phosphate), ce qui permet transitoirement l'interaction avec d'autres molécules intracellulaires effectrices (telles que les protéines RAF), et un état dit inactif où elles sont liées au GDP (**Figure 16**). L'activation des protéines RAS se fait par remplacement du GDP par le GTP grâce aux facteurs d'échanges (GEF) tel que hSos, mentionné plus haut. A l'inverse, leur inactivation est provoquée par l'hydrolyse du GTP en GDP grâce à l'activité GTPase intrinsèque des protéines RAS et catalysée par les protéines de la famille GAP (GTPase-Activating Proteins).

Les protéines sérine/thréonine kinases de de la famille RAF (A-RAF, B-RAF et C-RAF) sont activées par les protéines RAS liées au GTP, et vont alors activer par phosphorylation les MAPKKs (MAPK-ERK-Kinase): MEK1 et MEK2 (Catling et al., 1994; Papin et al., 1995). Ces dernières se lient aux protéines RAF grâce à une **séquence riche en prolines** présente dans leur région C-terminale (Papin et al., 1996). MEK1 et 2 vont alors se lier, avec une haute affinité et spécificité, aux protéines ERK1 et ERK2 (Extracellular signal-Regulated Kinase), puis les phosphoryler (Bardwell and Thorner, 1996).

Les sérine/thréonine kinases ERK1 et 2 sont activées par phosphorylation de leurs résidus thréonine 202/183 et tyrosine 204/185 situés dans la boucle d'activation (Anderson et al., 1990; Payne et al., 1991). Ces phosphorylations entraînent un **changement de conformation** qui permet aux ERK1 et 2 de se détacher des MEK1 et 2, et de se lier à leurs substrats (Canagarajah et al., 1997; Wolf et al., 2001). Les protéines ERK1 et 2 activées sont transloquées dans le noyau, où elles agissent sur l'expression génique **soit directement**, en phosphorylant des facteurs de transcription comme ETS, ELK ou MYC, **soit indirectement** en ciblant d'autres substrats, comme les kinases p90-RSK qui modifient les facteurs de transcription et les histones.

Les protéines RAF et MEK possèdent des sites de phosphorylation par ERK, permettant ainsi un **retrocontrôle de la voie** (Yoon and Seger, 2006). L'activation de ERK1 et 2 suite à une stimulation par des facteurs mitogènes, a initialement été décrite

comme se faisant **en deux temps** : tout d'abord une activation forte et rapide, dans les 5 à 10 min suivant la stimulation, puis une deuxième vague d'activation plus longue mais d'intensité plus faible (Meloche, 1995; Meloche et al., 1992). Cette deuxième phase est nécessaire pour l'entrée en phase S des cellules. La durée et l'intensité de l'activation de ERK conduisent à des destins aussi opposés que la prolifération, la différenciation, l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Marshall, 1995). **La voie ERK doit donc être finement contrôlée afin d'induire la réponse biologique appropriée.**

I.E.2. Protéines RAF

Les protéines de la famille RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) sont des sérine/thréonine kinases, activées par les protéines Ras suite à la stimulation des récepteurs tyrosine kinases membranaires. Elles agissent comme des MAPKKK au sein de la voie de signalisation ERK/MAPK, leur activation permettant la phosphorylation de leurs cibles directes: les protéines MEK1 et 2 (Dent et al., 1992; Kyriakis et al., 1992; Papin et al., 1995). Chez les vertébrés, on trouve trois protéines RAF: **A-RAF**, **B-RAF** et **C-RAF**, qui diffèrent par leur capacité à activer MEK, leur régulation et leur profil d'expression (Peyssonnaud and Eychène, 2001). L'expression de A-RAF est notablement **moins élevée** que les deux autres membres de la famille RAF, et son activité kinase beaucoup **plus faible** (Marais et al., 1997; Pritchard et al., 1995). Les gènes codant ces protéines ont été identifiés, à l'origine, comme des oncogènes transduits par des rétrovirus isolés à partir de tumeurs survenues chez la souris et la poule (Huleihel et al., 1986; Ikawa et al., 1988; Rapp et al., 1983). Notre laboratoire a identifié *B-raf* grâce à sa transduction par un rétrovirus dans des cellules de neurorétine d'embryon de poulet (Marx et al., 1988).

I.E.2.a. Structure des protéines RAF

Les protéines RAF partagent une architecture commune formée de trois régions conservées: CR1/2/3 (Conserved Region 1/2/3) (**Figure 17**). Celles-ci sont séparées par des séquences variables spécifiques à chaque protéine, qui comprennent des sites de phosphorylation déterminants pour leur régulation.

La région **CR1** est localisée dans le domaine amino-terminal de la protéine. On distingue deux sous-domaines spécifiques : le **RBD** (Ras-Binding Domain), permettant l'interaction avec les RAS et le recrutement à la membrane, et le **CRD** (pour Cystein Rich Domain), second site de liaison aux protéines RAS. La région **CR2**, située également dans la partie N-Terminale, contient les sites majeurs de phosphorylations inhibitrices qui participent à la régulation négative des RAF. Enfin, la région **CR3**, située en carboxy-terminal, correspond au domaine kinase contenant la **boucle d'activation** dont la phosphorylation est cruciale pour l'activité kinase. Comme chez toutes les protéines kinases, le domaine kinase est composé d'un petit lobe (N-lobe), contenant une boucle riche en glycine qui permet la liaison de l'ATP, et d'un gros lobe C-terminal (C-lobe) où a lieu la liaison avec les protéines MEK1 et 2.

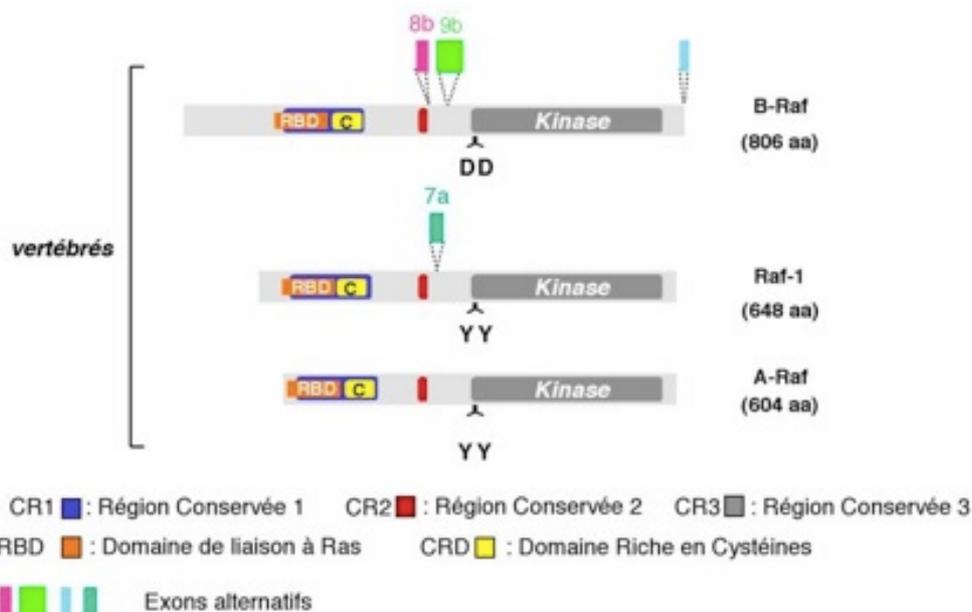


Figure 17. Structure primaire des protéines RAF.

Le domaine CR1 permet la liaison aux protéines RAS et le recrutement membranaire. Le domaine CR2 est une région charnière contenant des sites d'autophosphorylation. Enfin, le domaine CR3 correspond au domaine catalytique.

Les protéines RAF sont capables d'homodimérisation (Farrar et al., 1996; Luo et al., 1996) et d'hétérodimérisation. Cette dernière a été confirmée en 2006 entre B-RAF et C-RAF dans plusieurs lignées cellulaires en réponse à une stimulation (Rushworth et al., 2006). De plus, les auteurs ont montré que les hétérodimères ont une activité kinase supérieure aux homodimères et aux monomères.

I.E.2.b. Expression et rôles physiologiques des protéines RAF

Les trois protéines RAF sont exprimées de façon relativement ubiquitaire chez la souris. Cependant, il est possible de distinguer des niveaux d'expression différents pour chacune des RAF selon les tissus. Ainsi, la protéine C-RAF est préférentiellement produite dans les muscles striés, le cervelet, les testicules et le cerveau (Storm et al., 1990; Wadewitz et al., 1993). L'expression de A-RAF est aussi plus élevée dans les testicules, les ovaires, la vessie, le rein, la rate et le cœur (Storm et al., 1990; Wadewitz et al., 1993). Le profil d'expression de *B-raf* se distingue de celui des deux autres kinases par des niveaux plus variables selon les tissus et types cellulaires. Ainsi, un fort niveau d'expression est détecté dans le cerveau fœtal et adulte, ainsi que dans le système hématopoïétique. De plus, certains isoformes de B-RAF sont également présents dans les testicules, le placenta et la membrane fœtale (Barnier et al., 1995; Eychène et al., 1995; Storm et al., 1990).

La génération de lignées murines knock-out pour l'un de ces trois gènes a largement contribué à la meilleure compréhension du rôle précis de chacune des protéines RAF, notamment au cours du développement embryonnaire. Les différentes lignées générées et les phénotypes associées à chacune sont récapitulés dans le **Tableau 1**.

Les souris knock-out pour *A-raf* ne présentent pas d'altération du développement embryonnaire (Pritchard et al., 1996). Cependant, après la naissance, les animaux présentent des problèmes neurologiques et intestinaux conduisant à leur mort. De manière intéressante, le phénotype varie selon le fond génétique. En effet, la létalité évoquée précédemment survient sur fond génétique C57BL/6, tandis que sur fond 129/OLA 50% des animaux *A-raf*^{-/-} survivent. Les souris délétées pour *C-raf* présentent des anomalies du développement au niveau de la peau, des poumons et du placenta. Le retard de développement du placenta entraîne la mort *in utero* entre E11.5 et E16.5 (Wojnowski et al., 1998)(Mikula et al., 2001). Enfin, l'ablation du gène *B-raf* chez la souris induit là-aussi une létalité embryonnaire intervenant entre E10.5 et E12.5. Elle résulte de défauts dans le développement des annexes extra-embryonnaires (Galabova-Kovacs et al., 2006; Wojnowski et al., 1998). Les embryons issus d'une lignée murine où le knock-out de *B-raf* est restreint à l'épiblaste sont viables. Cependant, après la naissance, les animaux présentent progressivement des retards de croissance et

meurent à P21 d'une maladie neurodégénérative agressive due à un défaut de myélinisation.

Le phénotype des mutants *C-raf*^{-/-}; *B-raf*^{-/-} est plus dramatique que ceux des knock-out simples. En effet, les structures embryonnaires observées se résument à un amas cellulaire de 5mm de diamètre, composé de cellules de la masse cellulaire interne et de cellules du trophoblaste. L'arrêt total du développement est dû à une absence de gastrulation, mais les embryons restent implantés jusqu'à E8.5 (Wojnowski et al., 2000). Le phénotype dramatique observé dans les souris *C-raf*^{-/-}; *B-raf*^{-/-} montre que **la signalisation RAF est indispensable au delà du stade blastocyste**, et que les gènes *B-raf* et *C-raf* exercent des fonctions redondantes avant ce stade.

Knock-Out	Phénotype	Profil d'expression chez la souris
<i>A-raf</i> ^{-/-}	Létalité post-natale entre P7 et P21: défauts neurologiques et méga côlon. Forte dépendance du fond génétique.	- Ubiquitaire chez l'embryon, mais prédominante dans l'intestin et le placenta - Ubiquitaire chez l'adulte, mais prédominante dans l'épididyme, les testicules et les ovaires. - Expression plus faible que B-RAF et C-RAF
<i>B-raf</i> ^{-/-}	Létalité embryonnaire entre E10.5 et E12.5: défaut dans le développement des annexes embryonnaires.	- Faible expression ubiquitaire chez l'embryon, mais prédominance dans le cerveau
<i>C-raf</i> ^{-/-}	Létalité embryonnaire entre E10.5 et P0: anomalies du placenta et forte apoptose des cellules hépatiques. Forte dépendance du fond génétique.	- Ubiquitaire chez l'embryon, mais prédominante dans le cerveau - Ubiquitaire chez l'adulte, mais prédominance dans le cervelet, les muscles striés squelettiques et cardiaques, les ovaires, les testicules et les lignées germinales et somatiques.
<i>B-raf</i> ^{+/-}	Absence de phénotype	
<i>C-raf</i> ^{+/-}	Absence de phénotype	
<i>B-raf</i> ^{+/-} ; <i>C-raf</i> ^{+/-}	Absence de phénotype	
<i>B-raf</i> ^{+/-} ; <i>C-raf</i> ^{-/-}	Létalité embryonnaire avant E10.5: retards de développement	
<i>B-raf</i> ^{-/-} ; <i>C-raf</i> ^{+/-}	Létalité embryonnaire avant E10.5: retards de développement	
<i>B-raf</i> ^{-/-} ; <i>C-raf</i> ^{-/-}	Létalité embryonnaire E8.5: arrêt complet du développement, (absence de gastrulation)	

Tableau 1. Profil d'expression des protéines RAF et phénotype des KO constitutifs. Les protéines RAF présentent des profils d'expression spécifiques. Les gènes *B-raf* et *C-raf* sont indispensables au cours du développement, la perte de leur expression entraîne une létalité embryonnaire très précoce.

I.E.3. Voie MAPK et mélanome

La voie RAS/RAF/MEK/ERK est anormalement activée dans de nombreux cancers. Ainsi, des mutations activatrices des gènes *RAS* sont trouvées dans environ 30% des cancers chez l'Homme. Cette activation pathologique est particulièrement observée dans les mélanomes cutanés, tumeurs dérivées des mélanocytes. En effet, environ 50% des mélanomes cutanés sont mutés sur le gène *B-RAF* et environ 15% ont une mutation sur le gène *N-RAS* (Davies et al., 2002; van Elsas et al., 1996). Ces deux mutations sont cependant mutuellement exclusives (Davies et al., 2002; Edlundh-Rose et al., 2006; Goel et al., 2006).

I.E.3.a. Le mélanome

Le mélanome est le cancer de la peau le plus mortel. Selon l'OMS, plus de 130 000 nouveaux cas sont recensés dans le monde chaque année, ce qui représente une augmentation annuelle estimée entre 3 et 7%. De plus le taux de survie est particulièrement faible, il est ainsi inférieur à 20% après l'apparition de métastases. A ce jour, l'exérèse par chirurgie reste la meilleure thérapie, mais nécessite une détection précoce de la tumeur. Malgré tout, l'émergence de thérapies ciblées soulève de nouveaux espoirs pour les patients ayant un mélanome à un stade avancé.

la première étape de la **mélanomagenèse** est une prolifération anormale des mélanocytes qui présentent des altérations oncogénétiques (**Figure 18**). Cette hyperprolifération conduit à la formation d'une **tumeur bénigne: le naevus**. L'exposition aux rayons ultraviolets favorise l'apparition des nevi, et donc éventuellement le développement ultérieur de mélanomes (Newton-Bishop et al., 2010). La plupart du temps, la croissance du naevus est limitée par une **sénescence** induite chez les mélanocytes. Dans de rares cas, des événements génétiques secondaires induisent la levée de la sénescence, ce qui entraîne la progression vers le mélanome. La première étape de cette progression est **une étape de dysplasie**: les lésions présentent des asymétries, des bords irréguliers, et de multiples couleurs. L'étape consécutive à la dysplasie des nevi est une **phase de croissance radiale**: les cellules en prolifération sont capables de coloniser l'épiderme environnant. Les lésions progressent par la suite verticalement, c'est **la phase de croissance verticale**. Les cellules acquièrent alors des

capacités de migration et d'invasion du derme en traversant la membrane basale. Lors de la dernière phase de croissance du mélanome, les cellules cancéreuses vont coloniser d'autres organes et **former des tumeurs secondaires**, principalement au niveau du foie, des poumons et du cerveau chez l'Homme (Miller and Mihm, 2006).

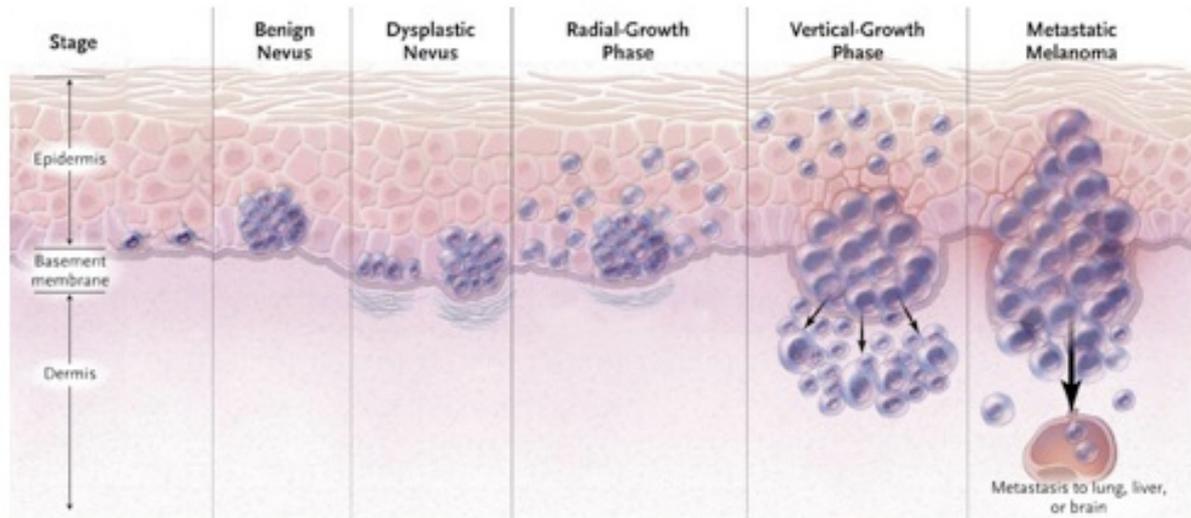


Figure 18. Les différentes étapes de progression du mélanome cutané.

Une hyperprolifération des mélanocytes induit la formation de tumeurs bénignes où les cellules sont sénescents, les nevi. La levée de la sénescence entraîne une dysplasie des nevi, suivie d'une phase de croissance radiale puis verticale. Le dernier stade de croissance est le plus avancé puisque les cellules sont capables de métastaser, principalement au niveau des poumons, du foie et du cerveau (modifié d'après Miller and Mihm, 2006).

I.E.3.b. Mutation BRAF^{V600E}

Des mutations du gène *B-RAF* ont pour la première fois été mises en évidence en 2002, grâce au séquençage systématique de l'ensemble des gènes de la voie RAS/RAF/MEK/ERK dans 545 lignées cellulaires cancéreuses et dans des tumeurs primaires (Davies et al., 2002). Dans le cas du mélanome, la fréquence de mutation de *BRAF* est très élevée (66%). La mutation la plus fréquente est la substitution d'une valine en acide glutamique en position 600 : **B-RAF^{V600E}**. Cette mutation a été retrouvée dans 60% des lignées de mélanome humains, 63% des métastases sous-cutanées et 64% des métastases aux organes distants, ce qui démontre son potentiel invasif (Pollock et al., 2003).

La protéine B-RAF^{V600E} possède une activité kinase 500 fois plus importante que la protéine sauvage, ce qui induit une activation constitutive de la voie MAPK via la phosphorylation de MEK (Wan et al., 2004). Dans les mélanocytes, l'expression de B-RAF^{V600E} induit une tumorigénicité des cellules chez la souris nude (Wellbrock et al., 2004b). De plus, un modèle murin exprimant B-RAF^{V600E} de manière inductible dans les mélanocytes induit la formation de mélanomes dans plus de 70% des cas, qui est accélérée lorsque P16 est perdu (Dhomen and Marais, 2009).

La mutation B-RAF^{V600E} est un événement précoce de la carcinogenèse du mélanome, puisque plusieurs études ont montré qu'elle apparaissait dans les nevi bénins et les nevi dysplasiques, avec une fréquence de plus de 80% (Kumar et al., 2004; Pollock et al., 2003; Poynter et al., 2006). L'expression de cette mutation dans les nevi est accompagnée par l'induction de marqueurs de la sénescence tels que SA-βGal (Senescence associated-β-Galactosidase) et p16^{INK4A}. La sénescence peut être abrogée lorsque des gènes suppresseurs de tumeurs tels que p16^{INK4A}, p19^{ARF}, p53 ou PTEN sont perdus, conduisant à une progression vers le mélanome (Maurer et al., 2011).

Des molécules thérapeutiques ciblant la protéine B-RAF mutée ont été développées, tels que le vemurafenib ou le dabrafenib. Cependant, après une bonne réponse initiale aux traitements, la majorité des patients récidivent en développant des **mécanismes de résistance**. Ces derniers résultent de l'émergence de nouvelles mutations dans la voie RAS/RAF/MEK/ERK, ou d'altérations dans d'autres voies de signalisation oncogéniques telle que la voie PI3K/AKT.

I.E.3.c. Mutation N-RAS^{Q61K}

Des mutations RAS ont été identifiées pour la première fois dans le mélanome il y a 30 ans : 24% des lignées de mélanome présentaient une activation des gènes RAS (Albino et al., 1984, 1989). **NRAS est le gène RAS le plus muté dans le mélanome primaire et métastatique**, entre 15 et 30% selon les études, comparé à K-RAS, qui est muté dans seulement 2% des mélanomes, et à H-RAS (1%) (Curtin et al., 2005; van Elsas et al., 1996; Jafari et al., 1995; Milagre et al., 2010). Les différents gènes RAS activés sont mutés le plus souvent sur le **codon 61**. Ces mutations sont associées à un défaut

d'activité GTPase, ce qui bloque les protéines RAS dans leur conformation active, liée au GTP.

Comme les mutations B-RAF, les protéines RAS mutées coopèrent fréquemment avec des gènes suppresseurs de tumeur afin de lever la sénescence, ou encore d'accélérer le processus oncogénique. Les protéines RAS activées coopèrent ainsi avec les gènes suppresseurs de tumeurs *P16^{INKA4}* et *p53*, pour accélérer le développement du mélanome. L'étude du rôle de la mutation N-RAS^{Q61K} dans des lignées cellulaires de mélanomes humains a permis de confirmer son rôle dans la prolifération, l'invasion et la migration des cellules (Eskandarpour et al., 2009). De plus, un modèle murin, déficient pour INKA4/ARF et exprimant N-RAS^{Q61K} dans les mélanocytes développe fréquemment des mélanomes (Ackermann et al., 2005).

Alors que les traitements au vemurafenib ou au dabrafenib génèrent de fortes réponses chez les patients ayant un mélanome avec une mutation B-RAF, leur utilisation chez des patients atteints de mélanomes N-RAS a des conséquences dramatiques sur leur survie. Dans les cellules de mélanomes mutées N-RAS, il a été suggéré que C-RAF ne formait pas d'hétérodimères avec B-RAF, car cette protéine n'est pas active et non requise pour l'activation de MEK (Dumaz et al., 2006). En revanche, lorsque les cellules mutées N-RAS sont traitées au vemurafenib, celui-ci provoque le recrutement de la protéine B-RAF non mutée à la membrane par RAS, où elle forme un complexe stable avec C-RAF. Ceci aboutit à l'activation allostérique de C-RAF et à **l'effet paradoxal d'activation de ERK dans les mélanomes mutés N-RAS (Figure 19)** (Heidorn et al., 2010; Poulidakos et al., 2010). Cette suractivation de la voie favorise la résistance à l'apoptose, et est donc dramatique pour les patients. Les mélanomes N-RAS restent donc, à ce jour, très compliqués à soigner. Les traitements sont peu efficaces et doivent être très ciblés puisque, comme nous venons de le voir, les inhibiteurs de B-RAF^{V600E} ont des effets dramatiques sur les patients mutés N-RAS.

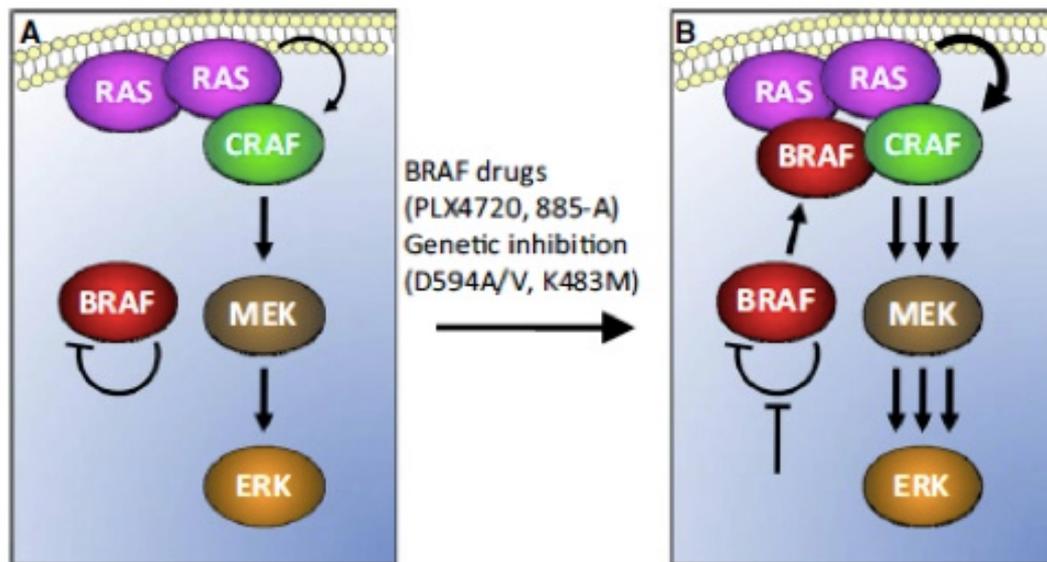


Figure 19. Effet paradoxal du traitement vemurafenib sur les mélanomes mutés NRas.

(A) En présence de RAS oncogénique, B-RAF est cytosolique et reste dans une conformation inactive. (B) En réponse aux inhibiteurs de B-RAF, la protéine est recrutée à la membrane par RAS et forme un complexe stable avec C-RAF, ce qui induit la suractivation de la voie MAPK (Heidorn et al., 2010).

I.E.3.d. Rôle des protéines RAF dans le développement du mélanome induit par *N-ras*^{Q61K}

Comme nous l'avons évoqué plus haut, la signalisation en aval de la mutation N-RAS, passe préférentiellement par C-RAF et non par B-RAF. Cependant, les rôles spécifiques de B-RAF et C-RAF au cours du développement tumoral n'avaient jamais été étudiés *in vivo*. Dans une étude réalisée par notre laboratoire, et à laquelle j'ai participé (**manuscrit en annexe**), nous avons développé un modèle murin de mélanome induit par l'expression de la forme humaine mutée N-RAS^{Q61K} dans le lignage mélanocytaire. Dans ce modèle, la perte de B-RAF et/ou de C-RAF est induite de manière constitutive ou conditionnelle, spécifiquement dans le lignage mélanocytaire. Les résultats obtenus montrent que la perte concomitante de B-RAF et de C-RAF empêche l'apparition de tumeurs, et que les deux protéines sont nécessaires pour le maintien tumoral, confirmant le rôle crucial des protéines RAF en aval de N-RAS muté dans la mélanomagenèse. D'autre part, nous montrons pour la première fois que B-RAF est nécessaire à la formation des nevi, mais n'est pas indispensable pour le développement

des mélanomes. En revanche, C-RAF joue un rôle mineur dans les étapes précoces de la carcinogenèse, alors qu'il est important pour le maintien tumoral. Toutefois, la perte de C-RAF peut être compensée par B-RAF pour la croissance des tumeurs, démontrant pour la première fois l'existence de fonctions redondantes de ces deux kinases dans le mélanome. Enfin, nous montrons que les cellules de mélanome murin sont capables de développer un mécanisme de résistance en l'absence de B-RAF et C-RAF, dépendant de la voie MAPK et impliquant A-RAF, la troisième kinase de la famille RAF.

Chapitre II

La voie de signalisation HGF/SF-MET

II.A. Rôle physiologique de MET et voies de signalisation associées

II.A.1. Le récepteur tyrosine kinase MET

En 1984, une étude a identifié la protéine MET, sous la forme d'un oncogène activé (TRP-MET), dans une lignée de cellules dérivées d'ostéosarcome humain et traitée à l'aide d'un carcinogène (Cooper et al., 1984). TRP-MET est en fait une protéine de fusion résultant d'un réarrangement chromosomique entre un fragment du chromosome 1 portant le gène *TRP* (codant pour une protéine du nucléopore), et un fragment du chromosome 7 contenant un gène encore inconnu. Celui-ci est baptisé *C-MET* en référence au carcinogène utilisé, le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (Cooper et al., 1984). Par la suite, la protéine MET a été identifiée comme un membre de la grande famille des récepteurs membranaires aux facteurs de croissance à tyrosine kinase.

Le gène humain *C-MET* est localisé sur le chromosome 7, étendu sur 120 kb, et se compose de 21 exons. Son orthologue murin se situe sur le chromosome 6 et est constitué de 23 exons. *c-MET* code pour un polypeptide de 150 kDa dont la glycosylation donne une protéine de 190 kDa. Celle-ci est clivée par une protéase donnant naissance à deux sous-unités liées par des ponts disulfures: une chaîne extracellulaire α de 50kDa et une chaîne β de 145 kDa. La partie extracellulaire de MET est composée de (**Figure 20**):

- un domaine N-terminal SEMA englobant la sous-unité α et les premiers acides aminés de la sous-unité β
- un domaine PSI
- quatre domaines immunoglobuline-like (IPTs).

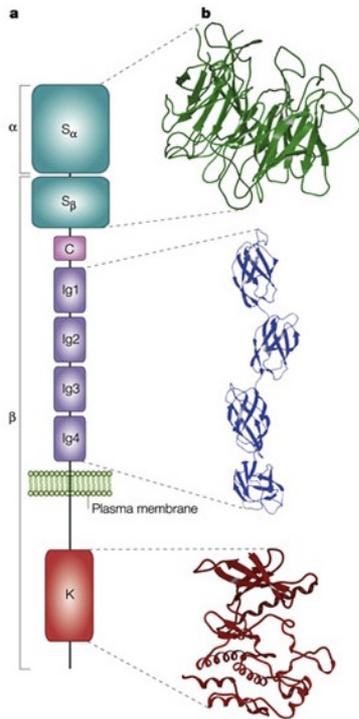


Figure 20. Structure et modèle tri-dimensionnel de la protéine MET

Dessin représentant les différents domaines formant la protéine MET, ainsi que les structures cristallographiques des domaines SEMA, Immunoglobulin-like et Kinase. S: domaine SEMA, C: domaine riche en cysteine, Ig: domaine Immunoglobulin-like, K: domaine Kinase. (Birchmeier et al., 2003; Gherardi et al., 2003).

La région intracellulaire contient une section juxta-membranaire, un domaine tyrosine kinase, ainsi que la région C-terminale. Cette dernière assure le recrutement des protéines de signalisation suite à l'activation de MET par son ligand (Gherardi et al., 2003; Schiering et al., 2003). Le segment juxta-membranaire joue un rôle primordial dans la régulation de l'activité du récepteur. En effet, ce segment contient une tyrosine (Tyr 1003) apte à se lier au proto-oncogène CBL, conduisant à la dégradation de MET. Le site catalytique, quant à lui, contient un grand nombre de tyrosines qui sont phosphorylées suite à l'interaction du ligand avec son récepteur. En terme d'homologie de séquence, la protéine MET se trouve étroitement liée aux récepteurs Mer, Alk, Ron, Axl, RYK et Tyro3.

II.A.2. L'Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor est l'unique ligand du récepteur MET

C'est également en 1984 que le facteur de croissance HGF (Hepatocyte Growth Factor) a été découvert dans du sérum de rats ayant subi une hépatectomie partielle

(Nakamura et al., 1984). Son nom lui vient de sa capacité à induire la prolifération d'hépatocytes en culture. Trois ans plus tard, un facteur de croissance induisant la dissociation et la migration de cellules épithéliales est identifié dans le surnageant de fibroblastes d'embryon humain en culture. Ce facteur de croissance est baptisé Scatter Factor (SF) (Stoker et al., 1987). En 1991, une équipe montre que le HGF et le SF ont des séquences codantes identiques, ainsi que les mêmes capacités d'induction de la prolifération et de la dispersion cellulaire (Naldini et al., 1991). Le HGF et le SF sont donc un seul et même facteur de croissance qui est rebaptisé Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF).

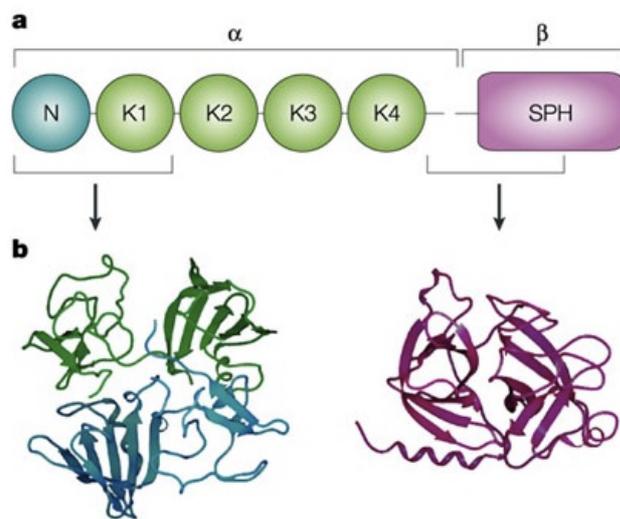


Figure 21: Structure et modèle tri-dimensionnel de l'HGF/SF

a) Schéma représentant les différents domaines formant la protéine HGF/SF. N: domaine amino-terminal, K1-K4: domaines Kringles, SPH: domaine Serine Proteinase Homology b) Structures cristallographiques des domaines amino-terminal, Kringles et SPH (D'après Birchmeier et al., 2003}

D'une taille de 70 kb, le gène humain codant l'HGF/SF se situe sur le chromosome 7 et est constitué de 18 exons. Son orthologue murin est localisé sur le chromosome 5 et possède 19 exons. Ce facteur de croissance est synthétisé sous la forme d'un précurseur inactif à une chaîne. Pour devenir biologiquement actif, l'HGF/SF subit un clivage protéolytique générant une protéine active de 90 kDa. Celle-ci est un hétérodimère constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β liées par des ponts disulfure (**Figure 21**). La sous-unité α comprend une partie N-terminale et quatre domaines kringles (K1-K4). Quant à la sous-unité β , elle se compose d'un domaine SPH (Serine Proteinase Homology) (Birchmeier et al., 2003).

II.A.3. Activation de MET et signalisation en aval

MET possède deux sites de fixation d'affinités différentes pour l'HGF/SF: les domaines IPT3 et IPT4 fixent avec une haute affinité les domaines K1 et N-terminal de la chaîne α de l'HGF, tandis que le domaine SEMA de MET se lie au domaine SPH de l'HGF/SF avec une faible affinité. Les formes active et inactive de l'HGF/SF peuvent se fixer au récepteur MET avec la même affinité, mais seule la forme mature peut l'activer (Hartmann et al., 1992; Lokker et al., 1992). L'interaction entre MET et son ligand provoque la dimérisation du récepteur, ainsi que son autophosphorylation sur deux résidus tyrosines situés dans son domaine catalytique, nécessaires à l'activation de son activité kinase (Y1234 et Y1235). Les résidus tyrosines situés à l'extérieur du domaine kinase (Y1349 et Y1356) sont ensuite phosphorylés permettant le recrutement de protéines effectrices, telles que Gab1, Grb2, Shc, PI3K. Celles-ci vont à leur tour enclencher l'activation de différentes voies de signalisation (**Figure 22**).

L'activation de la voie RAS/RAF/MEK/ERK via le récepteur MET impacte la prolifération, la motilité, la dispersion et la morphogénèse cellulaire (Hartmann et al., 1992; Maroun et al., 2000; Potempa and Ridley, 1998; Ridley et al., 1995). La réponse biologique effective dépend de la cinétique d'activation: une activation soutenue de ERK est requise pour la morphogénèse tissulaire, alors qu'une activation transitoire suffit pour favoriser la motilité cellulaire (Maroun et al., 2000; Tulasne et al., 2002). La voie PI3K/Akt est aussi activée en aval de MET. Cette voie de signalisation joue un rôle central dans les réponses apoptotiques, en réponse à divers inducteurs d'apoptose, dans un grand nombre de types cellulaires, (Bowers et al., 2000; Fan et al., 2000; Schulze-Bergkamen et al., 2004; Xiao et al., 2001). L'activation de MET peut conduire à son interaction directe avec la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase), conduisant à la formation d'adhésions focales, étape préliminaire à l'invasion tissulaire et à la motilité des cellules.

Afin d'induire la réponse biologique appropriée, l'activation des voies de signalisation en aval de MET doit être finement régulée. Un des modes de régulation de la signalisation est une atténuation ou un arrêt du signal permis par la dégradation rapide du récepteur. Lors de l'activation de MET, la tyrosine Y1003 du segment juxtamembranaire est phosphorylée et recrute en conséquence l'E3 ubiquitine ligase

CBL. Celle-ci va ubiquitinyler le récepteur, provoquant son internalisation dans des vésicules recouvertes de clathrine (Petrelli et al., 2002). Ces vésicules contenant MET sont transportées jusqu'aux lysosomes qui vont dégrader le récepteur (Oved and Yarden, 2002) (Abella et al., 2005; Urbé et al., 2000). Cette régulation négative de MET, dépendante de la fixation du HGF/SF, est très importante pour contrôler les réponses biologiques. Pour preuve, des mutations de MET sur la tyrosine Y1003 résultant en une stabilité accrue de MET, sont responsables d'une activation constitutive des voies de signalisation en aval. Cette activation constitutive conduit à la transformation cellulaire et à la tumorigenèse (Abella et al., 2005; Peschard et al., 2001).

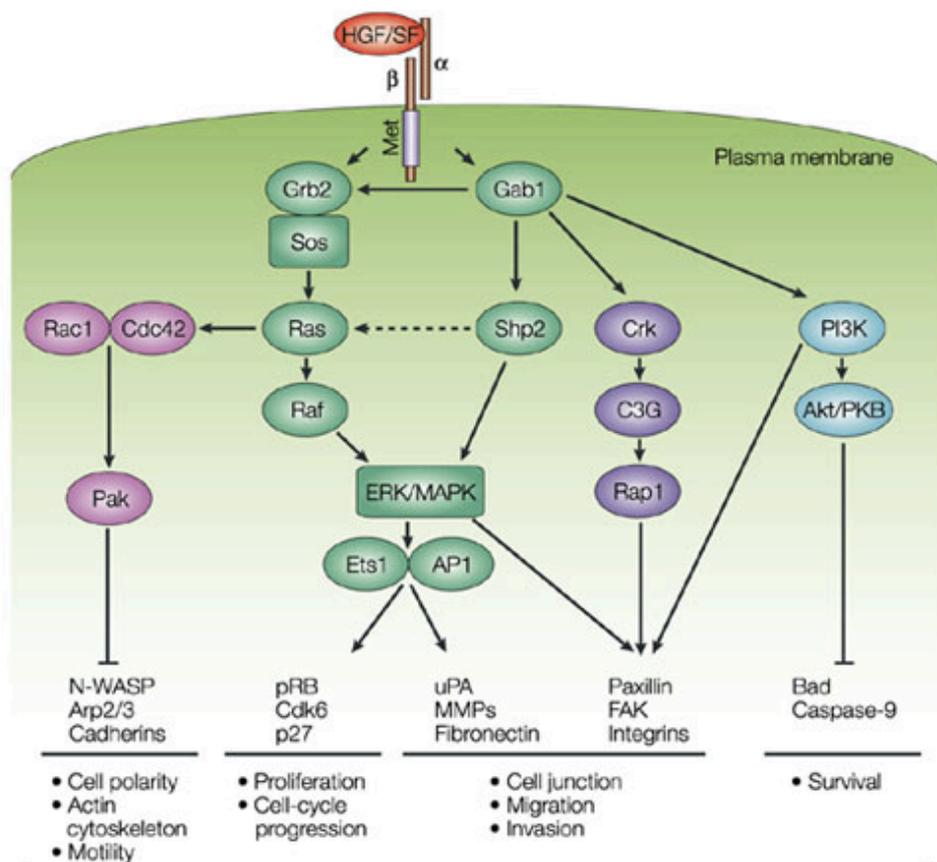


Figure 22: Voies de signalisation en aval du récepteur MET

Schéma représentant les différentes voies de signalisation activées en aval du récepteur MET, ainsi que les réponses biologiques associées à chacune. (D'après Birchmeier et al, 2003}

II.B. Rôle de la signalisation HGF/SF-MET dans la mise en place et l'homéostasie des tissus épithéliaux

L'HGF/SF, via son récepteur MET, agit sur la survie, la prolifération, la motilité et la morphogénèse cellulaire. Cette voie de signalisation intervient à la fois durant le développement embryonnaire et au cours de la vie adulte, et ce dans de nombreux tissus (Birchmeier et al., 1993; Sonnenberg et al., 1993).

II.B.1. Rôles au cours du développement embryonnaire

Les souris knock-out pour *c-Met* ou *Hgf* meurent *in utero* entre les jours de développement embryonnaire E13.5 et E15.5, démontrant le caractère indispensable de ces deux gènes lors du développement (Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995). Les embryons mutants pour MET ou l'HGF/SF présentent des malformations du placenta, une réduction de la taille du foie, et une absence de muscles squelettiques (Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Sonnenberg et al., 1993; Uehara et al., 1995). L'étude du patron d'expression de ces deux gènes a montré qu'ils s'expriment dès le stade blastula. Lors de la gastrulation, c'est-à-dire du stade E6,5 à E7, leur expression est restreinte au mésoderme. Pendant l'organogenèse (E8-E10) et jusqu'à la fin du développement embryonnaire, leurs profils d'expression diffèrent. Ainsi, **l'HGF/SF s'exprime dans le mésenchyme** tandis que l'on retrouve la **protéine MET dans les cellules épithéliales**, endothéliales et myogéniques (Bladt et al., 1995; Sonnenberg et al., 1993). Ces profils d'expression différents suggèrent un rôle essentiel de la signalisation HGF/SF-MET dans les interactions épithélium-mésenchyme.

II.B.1.a. Développement du placenta

La mort *in utero* des souris mutantes pour HGF/SF et MET est due au défaut d'approvisionnement des embryons en nutriments et en oxygène, causé par une altération du développement placentaire (Stewart, 1996; Uehara et al., 1995). Les placentas mutants présentent une taille réduite, qui est la conséquence d'un nombre anormalement faible de cellules trophoblastiques dans la région du labyrinthe. Le labyrinthe est une structure très intriquée, composée d'une multitude de lacunes

sanguines maternelles dans lesquelles plongent les vaisseaux fœtaux entourés de cellules trophoblastiques. A partir de E11.5, la région du labyrinthe prend le relais du sac vitellin dans le transport des nutriments de la mère à l'embryon. Le labyrinthe est donc vital pour la survie embryonnaire. Son altération chez les embryons délétés pour MET ou HGF/SF explique la mort *in utero*. Chez les animaux contrôles, les cellules trophoblastiques, originaires de l'ectoderme embryonnaire, expriment le récepteur MET. Aux environs du stade E8.5, elles entrent en contact physique avec le mésenchyme allantoïde connu pour sécréter l'HGF/SF. Celui-ci stimule de manière paracrine la prolifération des cellules trophoblastiques originaires de l'ectoderme. Ainsi, l'absence de MET ou du HGF/SF empêche la prolifération de ces cellules altérant le développement du labyrinthe.

II.B.1.b. Migration des progéniteurs myogéniques

La voie de signalisation HGF/SF-MET joue un rôle primordial dans la régulation de la motilité cellulaire. Au cours du développement embryonnaire, les cellules migrent fréquemment sur de grandes distances pour atteindre leurs cibles, où elles forment les différents tissus et organes. C'est notamment le cas des progéniteurs des muscles squelettiques des vertébrés, qui proviennent du dermomyotome (structure épithéliale dérivée des somites) et migrent dans les membres, la langue et le diaphragme (Neyt et al., 2000). Ces progéniteurs subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui va leur permettre de quitter le dermomyotome. L'ablation de l'HGF/SF ou de MET entraîne une absence de délamination des progéniteurs musculaires, qui ne peuvent alors pas quitter le dermomyotome. La conséquence est une absence totale de muscles squelettiques (Dietrich et al., 1999)(Birchmeier et al., 2003; Bladt et al., 1995). La signalisation HGF/SF-MET est importante non seulement pour la délamination mais aussi pour la migration des progéniteurs musculaires. Ainsi, le HGF/SF agit comme une molécule chimio-attractrice qui guide les progéniteurs musculaires dans leur migration jusqu'à leurs organes cibles (Dietrich et al., 1999).

Le mécanisme responsable de la libération des progéniteurs musculaires du dermomyotome ressemble fortement à celui observé durant les processus de carcinogénèse. En effet, les cellules cancéreuses invasives s'échappent de la tumeur primaire par EMT, puis migrent dans différents organes pour former des tumeurs

secondaires. Nous reviendrons sur l'implication de la voie HGF/SF-MET dans ces processus métastatiques dans un paragraphe ultérieur.

II.B.1.c. Développement du système nerveux

L'application ectopique d'HGF/SF sur un embryon de poulet induit la formation d'une plaque neurale, démontrant un rôle essentiel de la signalisation HGF/SF-MET dans le développement du système nerveux (Stern et al., 1990). Le HGF/SF promeut la croissance et la survie des neurones sensoriels durant le développement (Maina and Klein, 1999; Maina et al., 1997). De plus, l'HGF/SF exprimé au niveau de l'ébauche des membres, en collaboration avec des neurotrophines tel que le NGF, permet la survie et l'adressage des motoneurones vers les membres par chimio-attraction du HGF/SF (Maina et al., 1997; Yamamoto et al., 1997). Ainsi, l'innervation des membres par les motoneurones et les neurones sensoriels issus du tube neural est perturbée chez les souris exprimant une protéine MET inactivée.

II.B.1.d. Survie des hépatocytes

Chez les embryons murins knock-out pour *Hgf*, on observe une taille anormalement réduite du foie, qui est la conséquence d'une mort massive par apoptose des hépatocytes (Schmidt et al., 1995). Cette observation confirme le rôle de la signalisation HGF/SF-MET dans la survie des hépatocytes, et est en accord avec le puissant effet mitogène du HGF/SF sur les hépatocytes *in vitro* (Nakamura et al., 1984, 1989).

II.B.2. Rôles chez l'adulte

Les protéines HGF/SF et MET sont largement exprimées dans les tissus adultes, où elles participent à la régulation de l'homéostasie des tissus épithéliaux. La voie HGF/SF-MET a été montrée comme particulièrement importante dans les processus de régénération consécutifs à une lésion du foie, du rein ou de la peau (Chmielowiec et al., 2007; Huh et al., 2004; Kawaida et al., 1994). Concernant le foie adulte, l'inactivation de *c-Met* dans les hépatocytes n'affecte pas leur fonction physiologique, mais perturbe la régénération du foie en cas d'atteinte de celui-ci. En effet, en cas de blessure au foie, les hépatocytes subissent une apoptose massive chez les souris *c-Met*^{-/-}, alors qu'ils

prolifèrent pour régénérer le foie chez les souris contrôles (Borowiak et al., 2004; Huh et al., 2004). A l'inverse, l'application ectopique ou l'expression d'HGF/SF par transgénèse stimule la prolifération des hépatocytes, augmente la taille globale du foie et améliore sa régénération en cas d'hépatectomie partielle (Huh et al., 2004; Kawaida et al., 1994) (Michalopoulos and DeFrances, 1997). Dans le cas d'une blessure touchant la peau, l'absence de MET entraîne une incapacité des kératinocytes à proliférer, compromettant la régénération du derme et de l'épiderme (Chmielowiec et al., 2007).

II.C. Signalisation HGF/SF-MET et cancer

II.C.1. Activation constitutive de la voie dans les tumeurs

Etant donné l'implication de la voie HGF/SF-MET dans la survie, la prolifération, la motilité, et la protection contre l'apoptose, l'observation de sa dérégulation lors de la tumorigénèse n'est pas surprenante.

Dès sa découverte, le récepteur MET (découvert comme l'oncogène TRP-MET) a été associé à la transformation cellulaire, mais ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard que son activation aberrante a été formellement liée au développement du carcinome papillaire du rein chez l'homme (Schmidt et al., 1997). Plusieurs observations indépendantes ont permis de confirmer le rôle de la voie HGF/SF-MET dans la tumorigénèse. Premièrement, des lignées humaines ou murines surexprimant l'HGF/SF ou MET, deviennent tumorigéniques et métastatiques quand elles sont greffées chez des souris NUDE (Rong et al., 1994). A l'opposé, la diminution de l'expression d'HGF/SF ou de MET dans des lignées cancéreuses humaines limite leur potentiel tumorigénique (Takayama et al., 1997). Enfin, des souris transgéniques possédant des mutations du domaine kinase de MET développent des carcinomes, sarcomes et lymphomes (Graveel et al., 2004).

Chez l'Homme, l'activation aberrante du récepteur MET est retrouvée dans de nombreux types de cancers. Plus particulièrement, on trouve une surexpression de MET corrélée à un mauvais pronostic dans plus de 60% des cas de cancer du poumon et 80% des cancers du rein ou de l'estomac (Natali et al., 1996; Olivero et al., 1996). L'activation constitutive de la voie HGF/SF-MET conduit à de nombreuses réponses biologiques

associées à la transformation cellulaire: augmentation de la motilité, de l'invasion, de l'angiogenèse et protection contre l'apoptose des cellules. **Toutes ces réponses favorisent la survie des cellules tumorales et la formation de métastases.**

Cette activation aberrante de la voie peut être due à des mutations dans la séquence du gène *c-MET*. A l'heure actuelle, plus de 150 mutations somatiques ont été identifiées, et ce dans différents types de cancers (Source: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer). Certaines de ces mutations activent le domaine kinase, d'autres favorisent l'activation induite par le ligand ou entraînent le recyclage de MET à la membrane (Joffre et al., 2011). L'amplification génique de *c-MET* a également été observée dans des tumeurs primaires ou comme évènement secondaire altérant la réponse des cellules cancéreuses aux traitements. L'augmentation du nombre de copies du gène *c-MET* est notamment associée à la présence de métastases au niveau du foie (Zeng et al., 2008). Cependant, le mécanisme le plus fréquent expliquant la suractivation de la voie dans les tumeurs est l'augmentation de l'expression de MET due à **une régulation positive de la transcription, en l'absence de mutations génétiques du récepteur**. Cette augmentation anormale de la transcription de *c-MET* peut être induite par différents oncogènes tels que RAS, ETS-1 ou PAX5 (Ivan et al., 1997; Kanteti et al., 2009). L'expression physiologique de MET est réprimée par des miRNAs tel que miR34b, qui est contrôlé par p53. L'inactivation fréquemment observée de p53 dans les cancers conduit donc à la disparition du miR34b, favorisant la surexpression de MET. L'activation aberrante de ce récepteur peut être aussi liée à la surexpression de son ligand par les cellules mésenchymateuses, résultant en l'activation paracrine pathologique de la voie HGF/SF-MET. Ce phénomène est notamment observé dans les cancers du sein, de l'estomac, du colon et des poumons, et est associé à un mauvais pronostic (Ujii et al., 2012).

Des études récentes ont mis en lumière un rôle clé d'HGF/SF, sécrété dans le microenvironnement tumoral, dans le développement de résistances aux drogues, particulièrement les inhibiteurs des protéines RAF (Straussman et al., 2012). De même, la surexpression de MET peut être impliquée dans les mécanismes de résistance, en réponse aux drogues ciblant l'EGFR. C'est notamment le cas avec le Gefitinib utilisé dans le cancer du poumon (Engelman et al., 2007) ou du Cetuximab dans le cancer colorectal (Bardelli et al., 2013). L'activation des voies en aval de MET permet aux cellules

tumorales de compenser l'inhibition de l'EGFR par les drogues anti-cancéreuses, d'autant plus que les voies de signalisation contrôlées par ces deux récepteurs sont très similaires.

En conclusion, la dérégulation de la voie HGF/SF-MET joue un rôle clé non seulement dans le développement de nombreux cancers, mais aussi dans les mécanismes de résistances aux drogues développées par les cellules tumorales.

II.C.2. La voie HGF/SF-MET en tant que cible thérapeutique

Etant donné l'importance de la suractivation du récepteur tyrosine kinase MET dans de nombreux cancers, cette protéine est apparue comme une cible thérapeutique de premier choix. Deux approches différentes pour cibler cette voie dans les tumeurs ont été envisagées. La première vise à empêcher l'interaction physique entre le récepteur MET et son ligand grâce à des anticorps bloquants, tandis que la seconde a pour but d'inhiber l'activité kinase du récepteur en utilisant des petites molécules inhibitrices des tyrosine kinases. L'industrie pharmaceutique a investi massivement dans ces stratégies, comme le démontre le nombre d'essais cliniques lancés ces dernières années: 95 en 2011 et plus de 240 en 2014. La majorité de ces essais sont en phase I/II, mais déjà cinq composés ont atteint la phase III.

A l'heure actuelle, des inhibiteurs de MET sont déjà utilisés en tant que drogues anti-cancéreuses chez des patients, mais ils ne sont pas spécifiques de MET. Nous pouvons ainsi citer le crizotinib (PF702341066) du laboratoire Pfizer, qui est un inhibiteur des récepteurs tyrosine kinases MET, ALK et ROS1. Cet inhibiteur fait partie des petites molécules inhibitrices capables d'entrer en compétition avec l'ATP dans le site actif du domaine kinase de MET. Efficace à des doses bien tolérées, il possède une activité anti-angiogénique, cytoréductrice et anti-tumorale (Zou et al., 2007). Le crizotinib est administré aux patients souffrants de cancers du poumon à petites cellules. Sa capacité à inhiber plusieurs kinases est probablement un avantage majeur pour prévenir l'apparition de résistances aux drogues, particulièrement celles causées par une amplification du gène *c-MET* (Gridelli et al., 2014). De plus, l'utilisation du crizotinib a donné des résultats encourageants dans le traitement de patients souffrant de carcinome gastro-oesophagien (Lennerz et al., 2011), ce qui suggère une possible

utilisation plus large de cet inhibiteur.

II.D. Signalisation HGF/SF-MET et lignage mélanocytaire

Dans cette partie, nous allons nous pencher sur le rôle physiologique de la voie HGF/SF-MET dans le lignage mélanocytaire, puis sur sa dérégulation et ses conséquences dans l'apparition et la propagation du mélanome.

II.D.1. Rôle physiologique dans le lignage mélanocytaire

L'HGF/SF est capable, *in vitro*, d'augmenter la prolifération et la motilité des mélanocytes, ainsi que d'accroître la synthèse de mélanine (Halaban et al., 1992; Imokawa et al., 1998; Matsumoto et al., 1991). Chez les souris surexprimant l'HGF/SF de manière ubiquitaire, une hyperpigmentation est observée dès la naissance et se maintient durant toute la vie. Elle est due à un nombre anormalement élevé de mélanocytes dans la peau, ainsi qu'à la présence ectopique de mélanocytes autour du système nerveux (Takayama et al., 1996). Ces données suggèrent donc un rôle de la signalisation HGF/SF-MET dans la mise en place du lignage mélanocytaire. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que l'HGF/SF favorisait la survie, la prolifération et la différenciation des mélanoblastes *in vitro* dans des cultures primaires de cellules de la crête neurale (Kos et al., 1999).

Afin d'étudier plus précisément le rôle de la signalisation HGF/SF-MET dans la peau, des souris surexprimant l'HGF/SF uniquement dans les kératinocytes de l'épiderme ont été générées. Pour cela, un transgène permettant l'expression de l'HGF/SF sous contrôle du promoteur du gène *K14*, spécifique des kératinocytes, a été introduit dans une lignée murine (Kunisada et al., 2000). Chez ces animaux, la surexpression de l'HGF/SF dans les kératinocytes n'altère pas la morphologie générale de la peau. De manière surprenante, **le lignage kératinocytaire n'est pas affecté par la surexpression de l'HGF/SF, contrairement au lignage mélanocytaire.** En effet, une importante augmentation du nombre de mélanoblastes est observée dès E16.5. De plus, chez les adultes, les auteurs ont observé une hyperpigmentation causée par la présence massive de mélanocytes

dans le derme. Ils en déduisent que l'HGF/SF agit de manière paracrine pour promouvoir la survie, la prolifération et la différenciation des précurseurs des mélanocytes *in vivo*. De plus, les auteurs montrent que la localisation anormale des mélanocytes dans le derme est due à la diminution des molécules d'E-cadhérine consécutive à la surexpression de l'HGF/SF. En effet, en condition physiologique, la migration des mélanoblastes du derme vers l'épiderme à travers la lame basale, nécessite l'expression de la E-cadhérine à la surface des mélanoblastes (Nishimura et al., 1999). Or, chez les souris surexprimant l'HGF/SF, les mélanoblastes n'expriment pas la E-cadhérine, empêchant ainsi leur migration dans l'épiderme au cours du développement.

Une autre étude a réalisé un knock-out conditionnel de *c-met* dans les kératinocytes, grâce à l'expression de la Cre sous le contrôle du promoteur du gène *K14* (Chmielowiec et al., 2007). Ces souris ne présentent aucune altération morphologique de la peau ni de la mise en place du lignage mélanocytaire. En revanche, l'absence de MET limite la prolifération des kératinocytes en cas de blessure, empêchant la régénération de l'épiderme (Chmielowiec et al., 2007)

La signalisation HGF/SF-MET est donc importante pour la mise en place du lignage mélanocytaire par action paracrine, mais ne semble pas nécessaire à l'établissement du lignage kératinocytaire au cours du développement. En revanche, en cas de blessure, cette signalisation est primordiale pour la régénération de la peau par prolifération des kératinocytes.

II.D.2. Rôle dans le cycle du follicule pileux

La morphogénèse du follicule pileux et son cycle de croissance/régression dépendent d'interactions précises entre l'épithélium (les kératinocytes épidermiques) et le mésenchyme (les fibroblastes de la papille dermique). L'HGF/SF étant connu pour être sécrété par les cellules mésenchymateuses et agir de manière paracrine sur les cellules épithéliales, la signalisation HGF/SF-MET est apparue comme un acteur probable de la régulation du cycle du follicule.

En accord avec cette hypothèse, les localisations de l'HGF/SF et de son récepteur montrent une claire séparation anatomique au niveau du follicule: l'HGF/SF est exprimé

par les cellules mésenchymateuses de la papille dermique, tandis que MET se trouve à la surface des kératinocytes épithéliaux du bulbe (Lindner et al., 2000).

De plus, l'équipe de Paus a montré que l'expression de l'HGF/SF et de MET sont augmentées au moment de l'initiation de l'anagène (Lindner et al., 2000). Les cellules exprimant le récepteur MET à ce stade sont celles du hair germ, c'est-à-dire les premières à proliférer. De plus, l'observation d'une lignée murine transgénique surexprimant l'HGF/SF dans la peau a montré à P3 la présence de deux fois plus de follicules, possédant un développement plus rapide que chez les souris contrôles. De plus, ces souris montrent un retard dans l'apparition de la catagène à P17. Ce délai dans l'initiation de la catagène a été montré chez des souris contrôles injectées dans le derme avec de l'HGF/SF recombinant.

La signalisation HGF/SF-MET joue donc un rôle dans la régulation du cycle du follicule pileux via des interactions épiderme-mésenchyme.

II.D.3. Rôle dans le mélanome

Le récepteur MET est surexprimé dans de nombreux mélanomes métastatiques, où il participe à **l'acquisition du phénotype invasif des cellules tumorales** (Natali et al., 1993). La suractivation de MET dans le mélanome peut être causée par une amplification génique de *c-MET*. En effet, ce gène est localisé sur le chromosome 7 qui est fréquemment amplifié dans les stades tardifs du mélanome, ce qui induit une surexpression du récepteur (Ghosh and Chin, 2009). D'autre part, ce récepteur a été identifié comme une cible de MITF, qui est lui-même parfois amplifié dans le mélanome (Garraway et al., 2005; McGill et al., 2006). En effet, des amplifications de *MITF* ont été détectées par une analyse SNP (single nucleotide polymorphism) dans une collection de lignées cellulaires de différents cancers (Garraway et al., 2005). 10% des mélanomes primaires cutanés et 15-20% des mélanomes métastatiques présentent des amplifications de *MITF*. Chez la souris, une étude a montré que la suractivation de l'HGF/SF conduisait à la prolifération anormale des mélanocytes dans la peau, et à l'apparition ultérieure de mélanome (Otsuka et al., 1998). Ces mélanomes vont se développer rapidement, devenir métastatiques et former des métastases majoritairement au niveau du foie des animaux.

Une étude de 2012 (Peinado et al., 2012) a montré que les exosomes (vésicules de 40 à 100 nm circulant dans le sang) issus de mélanomes hautement métastatiques portent le récepteur MET à leur surface. Les auteurs montrent que c'est grâce au récepteur MET que ces exosomes augmentent le comportement métastatique des tumeurs primaires, en éduquant les progéniteurs de la moelle osseuse. Ainsi, les exosomes induisent la fragilité vasculaire au site pré-métastatique et reprogramment les progéniteurs de la moelle osseuse vers un phénotype pro-vasculaire. De plus, de manière intéressante, les auteurs montrent que la réduction de l'expression de MET dans les exosomes diminue le comportement pro-métastatique des cellules de la moelle osseuse.

Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, la voie RAS/RAF/MEK/ERK est fortement impliquée dans la carcinogenèse du mélanome. Les mutations *BRAF* sont un événement précoce dans le processus, puisqu'elles sont présentes dès le stade bénin du naevus et leur expression est nécessaire tout au long du processus pour le maintien du phénotype tumoral. De plus, notre laboratoire a montré que dans les mélanomes mutés NRAS, la protéine BRAF était également nécessaire pour cette étape d'initiation tumorale (manuscrit en annexe). Ces données plaident en faveur d'un rôle majeur de cette voie dans la régulation du lignage mélanocytaire. Cependant, malgré la connaissance de plus en plus précise du rôle de la voie RAS/RAF/MEK/ERK dans le mélanome, son rôle physiologique dans le développement du lignage mélanocytaire et dans l'homéostasie des MSCs est toujours mal connu.

Notre laboratoire s'est donc intéressé aux rôles physiologique des kinases B-RAF et C-RAF dans le développement et l'homéostasie du lignage mélanocytaire. L'utilisation de souris invalidées pour les gènes *B-raf* et *C-raf*, spécifiquement dans le lignage mélanocytaire, a permis de montrer leur rôle primordial dans le maintien des MSCs. Pour la toute première fois, notre laboratoire a montré l'implication de la voie RAF/MEK/ERK dans un processus d'auto-renouvellement d'une population de cellules souches adultes. Les résultats de cette étude, à laquelle j'ai participé, ont fait l'objet d'une publication et sont présentés dans la première partie du chapitre "Résultats". Dans la continuité de cette étude, nous avons entrepris de mettre en lumière les mécanismes par lesquels les protéines RAF contrôlent l'auto-renouvellement des MSCs. Nous avons réalisé une analyse transcriptomique comparative des cellules souches normales et knock-out pour *B-raf* et *C-Raf*, afin de d'identifier des cibles de la voie MAPK impliquées dans l'auto-renouvellement des MSCs. De plus, nous avons mis au point un système de culture *in vitro* des MSCs, permettant d'étudier l'effet de différents facteurs de croissance sur leur prolifération. Nous avons ainsi identifié le récepteur tyrosine kinase MET comme un acteur potentiellement clé dans l'auto-renouvellement des MSCs. Ces résultats sont décrits dans la seconde partie du chapitre "Résultats" et font l'objet d'un article en cours de préparation.

RÉSULTATS

Article 1

Les protéines B-RAF et C-RAF sont nécessaires au maintien des cellules souches mélanocytaires

“ B-Raf and C-Raf are required for

Melanocyte Stem Cell self-Maintenance”

Agathe Valluet, Sabine Druillennec, Céline Barbotin, Coralie Dorard, Anne H. Monsoro-Burq, Magalie Larcher, Celio Pouponnot, Manuela Baccarini, Lionel Larue, and Alain Eychène

L'inactivation des kinases B-RAF et C-RAF conduit à l'apparition d'un phénotype de hair graying:

Afin d'étudier le rôle physiologique de B-RAF et C-RAF dans le lignage mélanocytaire, nous avons utilisé des lignées de souris générées à partir du double knockout conditionnel *B-raf^{f/f};c-raf^{f/f}* (Galabova-Kovacs et al., 2006; Jesenberger et al., 2001). L'inactivation des gènes *Raf* spécifiquement dans le lignage mélanocytaire est réalisée grâce au croisement avec la lignée transgénique *Tyr::Cre/o* (Delmas et al., 2003; Yajima and Larue, 2008). Cette lignée exprime la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur du gène *Tyrosinase*, un acteur essentiel de la synthèse de la mélanine. Afin de pouvoir suivre les cellules du lignage mélanocytaire, les souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o* ainsi obtenues, ont été croisées avec la lignée rapportrice *Dct::LacZ*, ou la lignée double rapportrice *Z/EG* (*LacZ/EGFP*) (Novak et al., 2000; Colombo et al., 2010). Cette dernière lignée exprime constitutivement le gène *LacZ*. Après action de la recombinaise Cre, le

gène *LacZ* est délété, permettant l'expression du second gène rapporteur *Egfp*. Ainsi, toutes les cellules du lignage mélanocytaire expriment la GFP dans la lignée murine *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o;Z/EG*.

Les animaux homozygotes *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o* développent un premier cycle normal de pigmentation du poil. Ainsi, avant la première mue (21 jours après la naissance), ils ne se distinguent pas des contrôles. En revanche, par la suite, les animaux knockout développent un phénotype caractérisé par un éclaircissement du pelage appelé "hair graying". Les poils noirs du premier cycle sont successivement remplacés, au cours des cycles suivants, par des poils blancs dépourvus de mélanine. Ce phénotype devient de plus en plus visible au cours du vieillissement et peut être accéléré par des épilations successives. Les animaux simples knockout pour *B-raf* ou *C-raf* ne développent pas ce phénotype, indiquant une redondance fonctionnelle des protéines B-RAF et C-RAF. A mon arrivée au laboratoire, ce phénotype avait été observé chez les souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o; Dct::LacZ* (Figure 2, (Valluet et al., 2012)., et je l'ai par la suite montré chez les souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o;Z/EG* (**Figure 1A**).

La voie RAS/RAF/MEK/ERK n'est pas impliquée dans la mise en place du lignage mélanocytaire au cours du développement embryonnaire:

Au cours du développement embryonnaire, les mélanoblastes provenant de la crête neurale, migrent selon un axe dorso-ventral et sont ségrégués en deux populations au niveau du follicule pileux. Une population va donner les mélanocytes différenciés du premier cycle au niveau du bulbe, et l'autre les MSCs au niveau du bulge (Nishimura et al., 2002; Tanimura et al., 2011). L'absence de phénotype à la naissance et durant les trois premières semaines de vie des animaux double knock-out, semble donc indiquer que la signalisation RAS/RAF/MEK/ERK n'est pas indispensable à la mise en place du lignage mélanocytaire au cours du développement. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré que chez les souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o;Dct::LacZ* âgées de 4 jours et de 10 jours (stade P4 et P10), des cellules LacZ⁺ appartenant au lignage mélanocytaire, sont présentes au niveau du bulge et du bulbe. De plus, au stade P21 (première télogène) des cellules LacZ⁺ sont présentes dans le bulge (Figure 1, (Valluet et al., 2012).

J'ai contribué à cette étude en quantifiant le nombre de MSCs dans le bulge à la fin de la première télogène chez les souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o;Z/EG* et leurs contrôles (Figure 3, (Valluet et al., 2012)). Le nombre de MSCs GFP positives dans les bulges des souris knock-out n'est pas significativement différent du nombre de MSCs chez les souris contrôles. Ces données suggèrent que la voie RAS/RAF/MEK/ERK n'est pas nécessaire à la prolifération, la migration et le homing des mélanoblastes dans le bulge au cours du développement.

Afin de démontrer que l'absence de phénotype lors de la mise en place du lignage n'est pas liée à une compensation assurée par la kinase A-RAF, troisième membre de la famille des protéines RAF, je me suis intéressée à l'activation de la voie RAS/RAF/MEK/ERK dans la peau des embryons (E15.5) mutants et contrôles. A ce stade, les mélanoblastes en migration vers les futurs follicules se trouvent encore au niveau de la lame basale de l'épiderme inter-folliculaire. Des expériences d'immunohistochimie ont permis de montrer la phosphorylation de la protéine ERK dans plus de 30% des kératinocytes épidermiques, essentiellement ceux de la couche la plus superficielle de l'épiderme (Figure 1, (Valluet et al., 2012)). En revanche, ni les mélanoblastes sauvages ni ceux issus d'animaux délétés pour B-RAF et C-RAF ne montrent la présence de la protéine ERK phosphorylée. Nous avons ainsi démontré que l'absence de phénotype consécutif aux délétions de *B-raf* et *C-raf* n'était pas due à une compensation par l'isoforme A-RAF, mais bien par l'absence d'activation de la voie RAS/RAF/MEK/ERK. Celle-ci n'est donc pas requise pour la mise en place du lignage mélanocytaire au cours du développement embryonnaire.

Disparition des MSCs dans la niche des follicules pileux des souris mutantes:

Comme nous l'avons vu précédemment, la déplétion des MSCs dans la niche des cellules souches du follicule, par apoptose ou différenciation précoce, conduit à un phénotype de hair graying (Nishimura et al., 2005; Steingrimsson et al., 2005). Nous avons donc privilégié cette hypothèse pour expliquer le phénotype des souris knock-out. En accord avec celle-ci, des analyses histologiques des bulges des souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o;Dct::LacZ* ont montré une disparition des MSCs consécutives à des épilations successives (Figure 2, Valluet et al., 2012). J'ai montré pour ma part que les

souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o;Z/EG* âgées d'un an et présentant un phénotype marqué de hair graying, n'ont plus de MSCs au niveau de la niche du follicule, contrairement aux souris contrôles (**Figure 1B**). La voie RAS/RAF/MEK/ERK est donc nécessaire au maintien des MSCs dans la niche des follicules pileux murins. Il s'agit de la première démonstration de l'implication de la voie RAS/RAF/MEK/ERK dans le maintien d'une population de cellules souches.

En l'absence de B-RAF et C-RAF, les MSCs montrent un défaut d'entrée dans le cycle cellulaire.

L'analyse histologique des MSCs dans le bulge des souris mutantes n'a pas montré la présence de cellules pigmentées. Nous avons donc pu écarter l'hypothèse d'une différenciation précoce des MSCs causant leur disparition progressive. De plus, nous n'avons pas observé de signes révélateurs d'une mort par apoptose de ces cellules. Nous avons donc privilégié l'hypothèse d'un défaut au niveau de la division des MSCs lors de la sortie de quiescence, qui pourrait entraîner une absence d'auto-renouvellement et donc la déplétion du pool de MSCs. Afin de tester cette hypothèse, j'ai réalisé des expériences d'injections sous-cutanées de 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) chez des animaux contrôles et mutants. Les injections ont été faites entre la fin de la première télogène et le début de la seconde anagène (jours 21 à 28 suivant la naissance), c'est-à-dire lors de la sortie de quiescence des MSCs. Au 28^{ième} jour, un fragment de peau a été prélevé, fixé et inclus, afin de quantifier les cellules BrdU/GFP positives présentes dans le bulge. Les résultats montrent que seulement 22% des cellules sont doublement positives chez les souris mutantes et 50% chez les contrôles (Figure 3, Valluet et al., 2012). Chez les animaux knock-out, les MSCs sont donc significativement moins nombreuses à entrer en phase S durant l'anagène. Cette observation indique que les protéines RAF pourraient jouer un rôle important dans l'auto-renouvellement des MSCs en contrôlant leur entrée dans le cycle cellulaire.

La prolifération des mélanocytes *in vitro* est dépendante de la voie RAS/RAF/MEK/ERK dans des conditions particulières.

Nos données indiquent que la voie RAS/RAF/MEK/ERK contrôle l'entrée dans le

cycle cellulaire des MSCs dans le contexte de la niche, mais pas la prolifération des mélanoblastes durant le développement embryonnaire. Ainsi, le rôle de cette voie semble lié au contexte cellulaire. Nous avons pu montrer que des cultures de mélanocytes primaires issues d'animaux contrôles forment des colonies en présence de 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), puissant mitogène du lignage mélanocytaire et activateur de la voie RAS/RAF/MEK/ERK (Figure 4, Valluet et al., 2012). A l'inverse, les mélanocytes issus de la peau de souris délétées pour B-raf et C-raf ne forment pas de colonies en présence de TPA et montrent un défaut d'entrée en phase S (Figure 4, Valluet et al., 2012). Ces résultats montrent que, comme observés *in vivo* pour les MSCs, la voie RAF/ERK est requise pour la progression cellulaire dans les mélanocytes *in vitro* dans des conditions spécifiques.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré que l'ablation des kinases B-RAF et C-RAF chez la souris n'avait pas de conséquences sur la mise en place du lignage mélanocytaire et donc sur la pigmentation à la naissance. En effet, la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK n'est pas activée dans les mélanoblastes wild-type et knock-out et n'est donc pas nécessaire à ce stade du développement dans le lignage mélanocytaire. Cependant, les souris knock-out pour *B-raf* et *C-raf* développent après la première mue un phénotype de hair graying, conséquence d'une disparition progressive des MSCs dans la niche des cellules souches du follicule pileux. Ainsi, les kinases B-RAF et C-RAF jouent un rôle clé dans l'auto-renouvellement des MSCs.

Des études précédentes ont montré le rôle clé de la signalisation passant par le récepteur KIT pour la migration, la survie et la différenciation des mélanoblastes, tandis que l'auto-renouvellement des MSCs est au contraire indépendant de KIT. Au vu des résultats de notre étude montrant le rôle clé de la voie RAS/RAF/MEK/ERK dans les MSCs mais pas les mélanoblastes, il semble exister un découplage entre les signalisations KIT et RAF dans le lignage mélanocytaire.

B-Raf and C-Raf Are Required for Melanocyte Stem Cell Self-Maintenance

Agathe Valluet,^{1,2,3,4,6} Sabine Druillennec,^{1,2,3,4,6} Céline Barbotin,^{1,2,3,4} Coralie Dorard,^{1,2,3,4} Anne H. Monsoro-Burq,^{1,2,3,4} Magalie Larcher,^{1,2,3,4} Celio Pouponnot,^{1,2,3,4} Manuela Baccarini,⁵ Lionel Larue,^{1,2,3,4} and Alain Eychène^{1,2,3,4,*}

¹Institut Curie

²INSERM U1021

³CNRS UMR 3347

Centre Universitaire, Orsay F-91405, France

⁴Université Paris Sud-11, F-91405 Orsay, France

⁵Center for Molecular Biology, University of Vienna, Max F. Perutz Laboratories, A-1030 Vienna, Austria

⁶These authors contributed equally to this work

*Correspondence: eychene@curie.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.020>

SUMMARY

B-Raf and C-Raf kinases have emerged as critical players in melanoma. However, little is known about their role during development and homeostasis of the melanocyte lineage. Here, we report that knockout of *B-raf* and *C-raf* genes in this lineage results in normal pigmentation at birth with no defect in migration, proliferation, or differentiation of melanoblasts in mouse hair follicles. In contrast, the double *raf* knockout mice displayed hair graying resulting from a defect in cell-cycle entry of melanocyte stem cells (MSCs) and their subsequent depletion in the hair follicle bulge. Therefore, Raf signaling is dispensable for early melanocyte lineage development, but necessary for MSC maintenance.

INTRODUCTION

B-Raf and C-Raf protein kinases are activated downstream of membrane bound receptors through their recruitment at the plasma membrane by binding to Ras proteins and play a crucial role in cancer development (Wellbrock et al., 2004; Heidorn et al., 2010). Mutation of B-Raf or its upstream activator N-Ras in cutaneous melanoma proved to be an early driving event during melanoma progression (Wellbrock et al., 2004). Wild-type B-Raf and C-Raf proteins also play specific and complementary functions in non-B-Raf mutated tumors (Heidorn et al., 2010). Little is known, however, about their physiological role during normal development and homeostasis of the neural crest-derived melanocytic lineage.

Melanoblasts exit from the neural folds and migrate to the developing hair follicles where they segregate into two populations: the melanocyte stem cells (MSCs) localizing in the bulge/subbulge area and the mature differentiated melanocytes in the bulb (Nishimura et al., 2002; Steingrímsson et al., 2006; Tanimura et al., 2011). In the adult mouse skin, melanocytes are mostly confined to the bulb of hair follicles, which periodically

regenerate by undergoing repetitive cycles of growth (anagen), regression (catagen), and relative quiescence (telogen) (Schneider et al., 2009). During each hair cycle, the lower transient portion of the follicle including the bulb is regenerated, whereas the upper permanent portion containing the bulge remains intact. During catagen, the melanocytes of the bulb die from apoptosis. De novo production of melanocytes occurs from the MSCs of the bulge, which undergo cell division to give rise both to a new MSC and to a melanoblast (Nishimura et al., 2002). However, the extracellular signals regulating MSC cell-cycle entry during early anagen remain unknown. In mouse skin, a large proportion of MSC niches are Kit independent (Nishimura et al., 2002). In contrast, stem cell factor (SCF)/Kit signaling is required for melanoblast migration, survival, and differentiation not only during early development of the melanocyte lineage but also in successive hair cycles (Mackenzie et al., 1997; Nishimura et al., 2002; Wehrle-Haller and Weston, 1995). Mitf has been proposed as a nuclear target of Kit signaling. Mice carrying mutations in this transcription factor display phenotypes that strongly overlap with those of Kit and SCF mutant mice (Steingrímsson et al., 2006). In melanocyte cultures, Mitf activity is regulated by phosphorylation mechanisms mediated by the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular regulated kinase (ERK) pathway in response to Kit stimulation (Wu et al., 2000), but the physiological relevance of this regulation has been challenged by genetic studies (Bauer et al., 2009; Bismuth et al., 2008).

Given the key role of B-Raf and C-Raf in melanoma and the presumed role of the Raf/ERK pathway as a link between Kit and Mitf, we investigated the physiological functions of these two kinases in the mouse melanocyte lineage. Surprisingly, double-knockout animals in which ablation of both *B-raf* and *C-raf* genes was restricted to this lineage displayed normal pigmentation at birth and did not show significant defect in proliferation, migration, or differentiation of melanoblasts in the developing hair follicles. Following the first hair molting, however, 100% of the double-knockout mice unveiled a coat color phenotype characterized by progressive hair graying resulting from a defect in cell-cycle entry of MSCs and their subsequent depletion in the hair follicle bulge. Taken together, these results

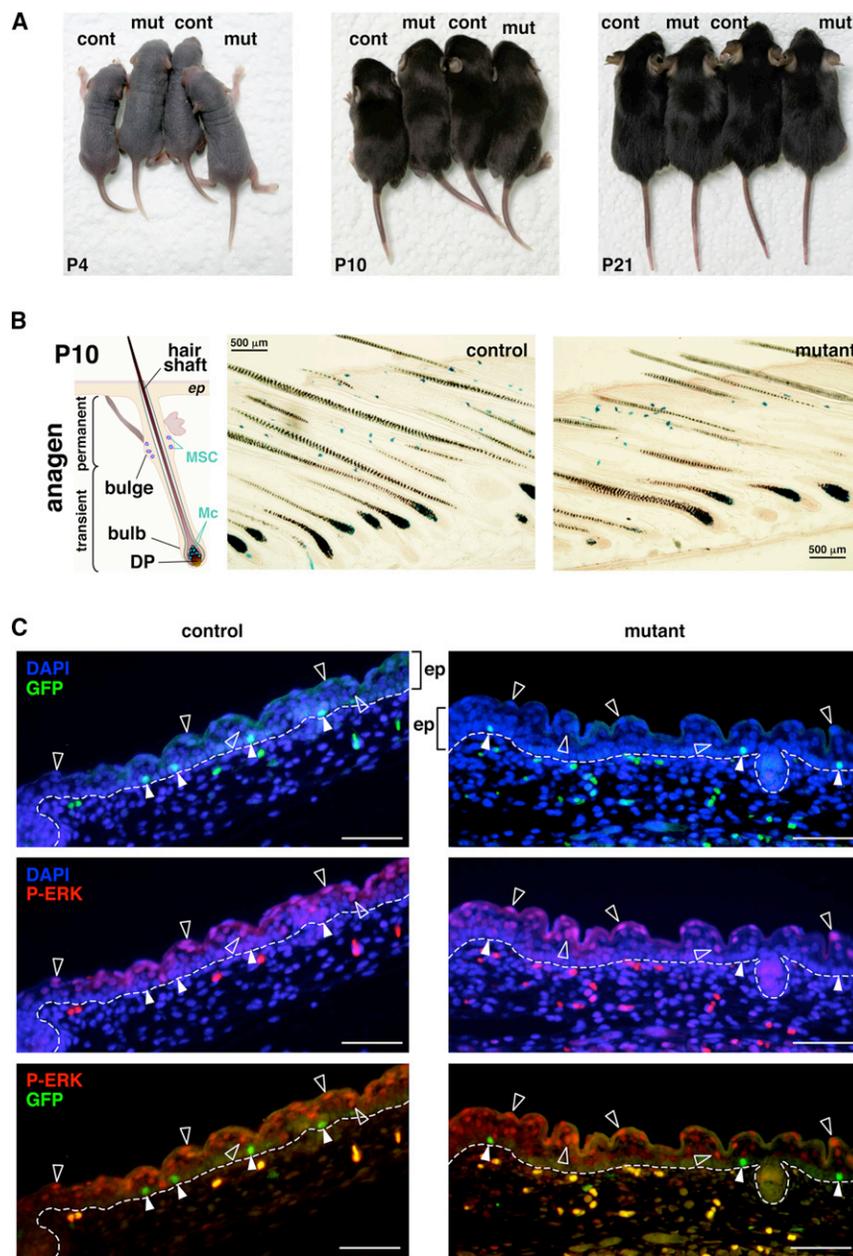


Figure 1. B-Raf and C-Raf Are Not Required for Melanocyte Lineage Early Development

(A) Mutant (*B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl};Tyr::Cre^{fl};Dct::LacZ^{fl}*) and control (*B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl};Dct::LacZ^{fl}*) littermate mice during the first hair cycle at different stages of postnatal development.

(B) X-gal staining of representative histological sections of mutant and control mice skin at P10 (DP, dermal papilla).

(C) ERK is not activated in mouse skin embryonic melanoblasts. Immunostaining of skin from mutant (*B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl};Tyr::Cre^{fl};Z/EG^{fl}*) and control (*B-raf^{+/+};C-raf^{+/+};Tyr::Cre^{fl};Z/EG^{fl}*) E15.5 embryos with anti-phospho-ERK and anti-GFP antibodies. GFP+ melanoblasts are indicated with white arrowheads. Examples of nuclear P-ERK-positive keratinocytes are indicated with open arrowheads (>30% of keratinocytes were P-ERK+; ~2 × 10³ cells counted from two control and two mutant embryos). No P-ERK signal could be detected in melanoblasts (80 cells counted from two control and two mutant embryos). Double GFP/P-ERK labeling below the epidermis (ep) corresponds to nonspecific autofluorescence signal. Scale bars 50 μm.

See also Figures S1, S2, S3, and S4.

the melanocyte lineage (Mackenzie et al., 1997). During the first 3 weeks of life, mutant animals were indistinguishable from controls and displayed a normal first cycle of hair pigmentation without coat color alterations (Figure 1A). The distribution of melanocytic cells in the follicular epidermis of knockout animals was investigated at different stages of the first hair cycle. At P4, LacZ+ cells were present both in the bulb and in the bulge of the developing hair follicles, which all contained a pigmented hair shaft (Figure S1B). During the anagen stage at P10, the presence and localization of LacZ+ cells in the pigmented hair follicle of mutant and control animals were comparable (Figure 1B). At the telogen phase (P21) when the transient portion of the follicles has regressed,

showed that Raf signaling is required for proper MSC maintenance, but dispensable for early melanocyte lineage development. In addition, they revealed an unexpected uncoupling of Kit and Raf signaling in the melanocyte lineage.

RESULTS

Raf/ERK Signaling Is Dispensable for Early Melanocyte Lineage Development

Double *B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl}* conditional knockout mice were crossed to the *Tyr::Cre* transgenic mice, in which the *Tyrosinase* promoter is active from embryonic day E10.5 to adulthood (Delmas et al., 2003) and to *Dct::LacZ* reporter mice to trace all the cells from

LacZ+ MSCs were present in the bulge of mutant animals (Figure S1C). These observations suggested that ablation of both *B-raf* and *C-raf* genes did not prevent melanoblast migration from the neural tube and their homing in the skin. Accordingly, the number and location of melanoblasts were identical in mutant and control E13.5 embryos and BrdU-labeling experiments did not show melanoblast proliferation defects (Figure S2). These results indicated that embryonic melanoblast migration and proliferation were not impaired. Therefore, co-inactivation of *B-raf* and *C-raf* does not prevent either melanoblast proliferation and migration to the developing hair follicles, nor the terminal differentiation of melanocytes and MSC homing in their niche.

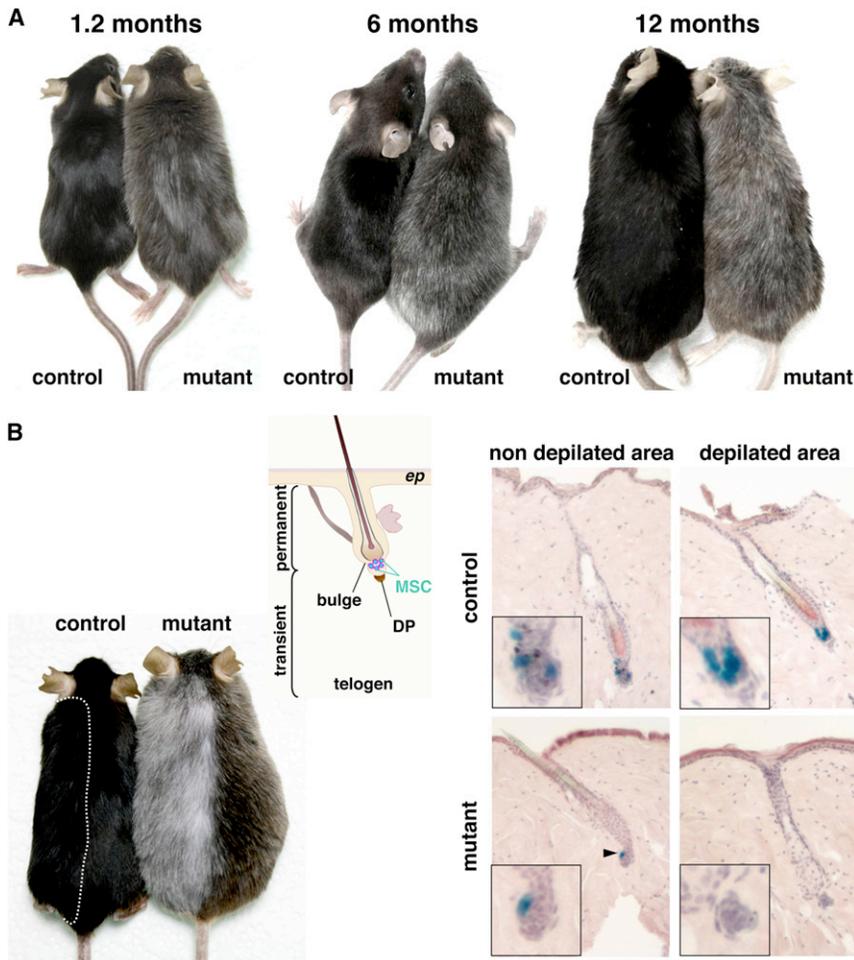


Figure 2. Impaired MSC Self-Maintenance in Raf Knockout Mice

(A) Absence of B-Raf and C-Raf leads to progressive hair graying. The coat color of mutant and control littermate mice was compared at different times of successive hair cycles.

(B) Left: depilation accelerates hair graying in mutant mice. Two-month-old mutant and control *Dct::LacZ* mice were depilated seven times within a period of 6 months on the left part of the back. Right: representative pictures of X-gal staining on histological sections of skin from depilated and nondepilated areas after 6 depilations.

See also Figure S5.

AKT pathway, a key signaling component downstream of Kit, is required for melanocyte development in vivo. In contrast, the MEK inhibitor CI-1040 did not affect melanocyte proliferation and migration in treated embryos. Taken together, these results indicate that the absence of phenotype in B-Raf/C-Raf double-knockout mice was not due to A-Raf compensation and support the notion of Raf/ERK-independent melanoblast development in vertebrates.

Raf Signaling Is Required for MSC Self-Maintenance

After the first hair molting, Raf knockout mice but not control animals exhibited hair graying, which became obvious from 4 to 5 weeks of age and increased with time (Figure 2A). This phenotype

To ensure that the absence of phenotype was not due to partial recombination of floxed *raf* alleles, *B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl};Tyr::Cre^{fl/0}* mice were crossed to the *Z/EG* transgenic reporter line that expresses green fluorescent protein (GFP) upon Cre-mediated excision (Novak et al., 2000). Genotyping of fluorescence-activated cell sorting (FACS)-sorted GFP-positive cells showed a complete loss of floxed alleles (Figure S1C). The absence of phenotype could be explained either by a compensation by A-Raf or by the nonrequirement of ERK signaling. Therefore, we evaluated the level of ERK activation during melanocyte development. While ERK activating phosphorylation was detected in a significant proportion (>30%, at E15.5) of skin keratinocytes, no ERK phosphorylation could be detected in the melanoblasts in both wild-type and knockout embryos (Figure 1C). The absence of ERK phosphorylation was also observed in differentiating melanocytes in the regenerating hair follicle bulbs (Figure S3). These results indicated that the ERK pathway was not activated at these stages, explaining the absence of phenotype upon *raf* gene ablation. We also confirmed that melanocyte development does not depend on active Raf/ERK pathway in an alternative in vivo vertebrate model (Figure S4). Melanocyte development in *Xenopus laevis* embryos was blocked by LY294002 showing that the PI3K/

occurred with 100% penetrance in both *Dct::LacZ* and *Z/EG* crosses and was due to the progressive replacement of black hair by fully depigmented white hair (Figure S5A). Accordingly, hair shaft melanin content was markedly reduced in knockout animals (Figure S5B). Single *B-raf* or *C-raf* knockout mice, or animals retaining only one out of four *raf* alleles, did not show such hair-graying phenotype (Figure S5D), indicating redundant functions for Raf proteins in this process. Hair graying was previously demonstrated to be caused by defective MSC self-maintenance in the bulge (Nishimura et al., 2005). Therefore, we analyzed the MSC content in the bulge of 1-year-old *Dct::LacZ* knockout mice. A large proportion of hair follicles in mutant animals were depleted of MSCs, whereas those of controls still contained MSCs (Figure S5C). Accelerating hair cycles and forcing melanocyte renewal by repeated depilation strongly increased hair graying in knockout animals (Figure 2B). In control skins, a large proportion of hair follicles from both the depilated and nondepilated areas contained MSCs. In contrast, MSCs were absent in almost all the hair follicles of the depilated area in mutant mice, but a few were still detectable in a small proportion of hair follicles from the nondepilated area. Therefore, depilation exacerbates the hair-graying phenotype and accelerates MSC depletion.

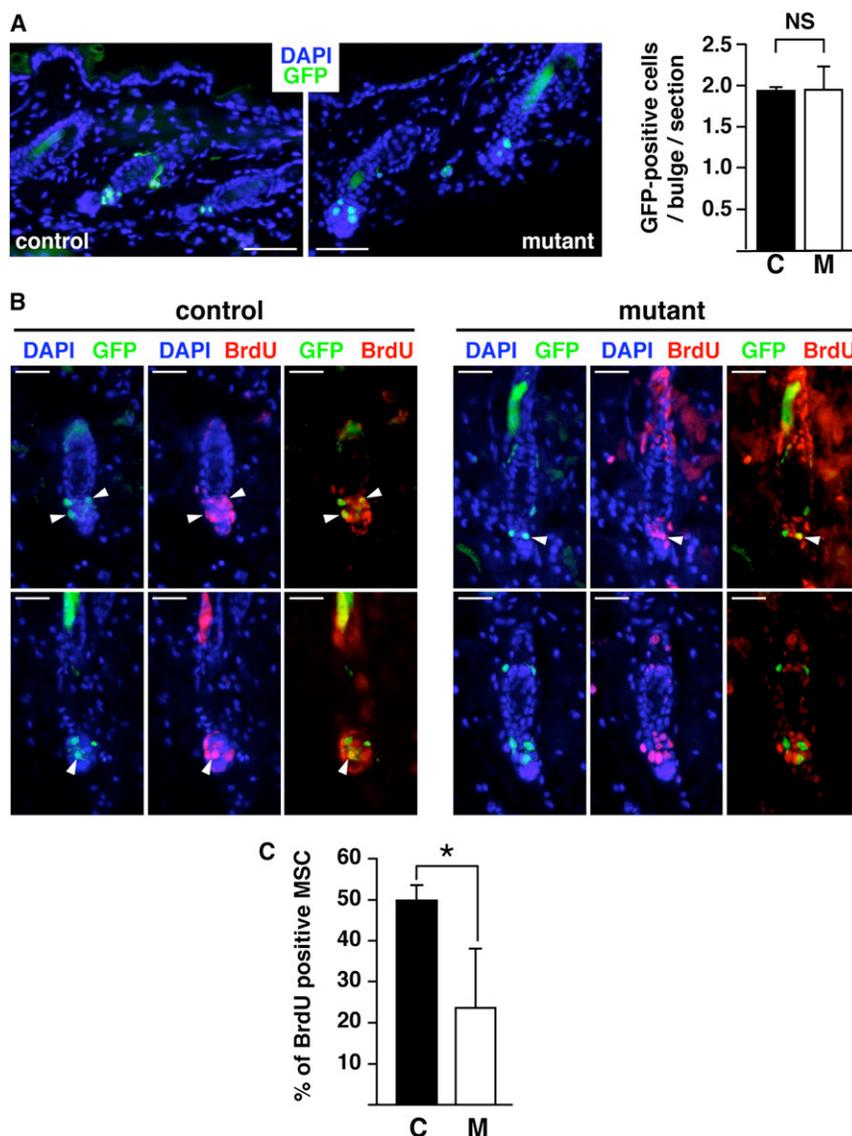


Figure 3. Absence of B-Raf and C-Raf Induces MSC Cell-Cycle Entry Defects

(A) Absence of B-Raf and C-Raf does not impair MSC homing in the bulge. Direct fluorescence of GFP-positive cells was examined in frozen skin sections from mutant and control *Z/EG* mice at P24. Scale bars, 50 μm . Quantification of the number of GFP+ cells per bulge per section is shown on the right (1,239 cells from two control [C] and 1,521 cells from two mutant [M] mice were counted). NS, not significant.

(B) Mutant and control *Z/EG* mice were injected with BrdU from P21 to P28. At P28, skin sections were labeled with anti-BrdU and anti-GFP antibodies. Double GFP/BrdU-positive MSCs are indicated with white arrowheads. Scale bars, 25 μm .

(C) Quantification of BrdU+/GFP+ MSCs. Percentages were obtained from counting 456 GFP+ MSCs from three control and 196 GFP+ MSCs from two mutant mice (*0.01 < p < 0.05, Student's test).

embryonic and postnatal development, suggesting that the differential requirement of Raf/ERK signaling for melanocytic cell-cycle progression depends on the microenvironment. We investigated the ability of either wild-type or Raf-knockout melanocytic cell cultures to proliferate under different conditions. We first assessed Raf/ERK requirement downstream of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), a well-known mitogen in the melanocytic lineage and a potent inducer of Raf/ERK signaling (Buscà et al., 2000). Colonies of melanocytic cells rapidly developed in primary cultures of skin cells from controls, but not in cultures from knockout animals (Figure 4A) because knockout cells were deficient in their ability to enter S phase

To further characterize the defect responsible for hair graying, we used the *B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl};Tyr::Cre^{lo};Z/EG* knockout mice. Quantification of GFP-positive cells in the bulge of hair follicles following first telogen at P24 indicated that MSC depletion in knockout animals was not due to an initial lower number of MSCs (Figure 3A), confirming that B-Raf and C-Raf were not required for MSC homing in the bulge. However, BrdU incorporation experiments revealed a significant decrease of MSCs entering S phase during early anagen in mutant animals (Figures 3B and 3C). Taken together, these results suggest that Raf signaling regulates MSC self-maintenance in the bulge by controlling MSC cell-cycle entry.

Differential Requirement for Raf Signaling in Proliferative Responses In Vitro

Our data indicated that Raf signaling controls cell-cycle entry of MSCs within the bulge but not melanoblast proliferation during

(Figure 4B). Accordingly, we could establish cultures from controls (Figure 4C) but not from knockout animals (data not shown) following cell culture passages in the presence of TPA. These results indicated that, as observed for MSCs in vivo, Raf signaling was also required for melanocytic cell-cycle progression in vitro, under specific conditions.

Whereas the presence of MSCs in the bulge is independent of Kit signaling, melanoblasts migration and emergence of differentiated melanocytes in the hair require Kit (Nishimura et al., 2002). Although Kit is known to activate the ERK pathway, our in vivo results suggested that Raf kinases were not essential downstream of Kit in the melanocytic lineage. To test this hypothesis in vitro, we used melanocyte cultures established from wild-type animals. SCF alone was not sufficient to induce cell proliferation, but could sustain melanocyte cell survival (Figure 4C). Under these conditions, MEK inhibition with U0126 had no effect on cell survival, whereas PI3K

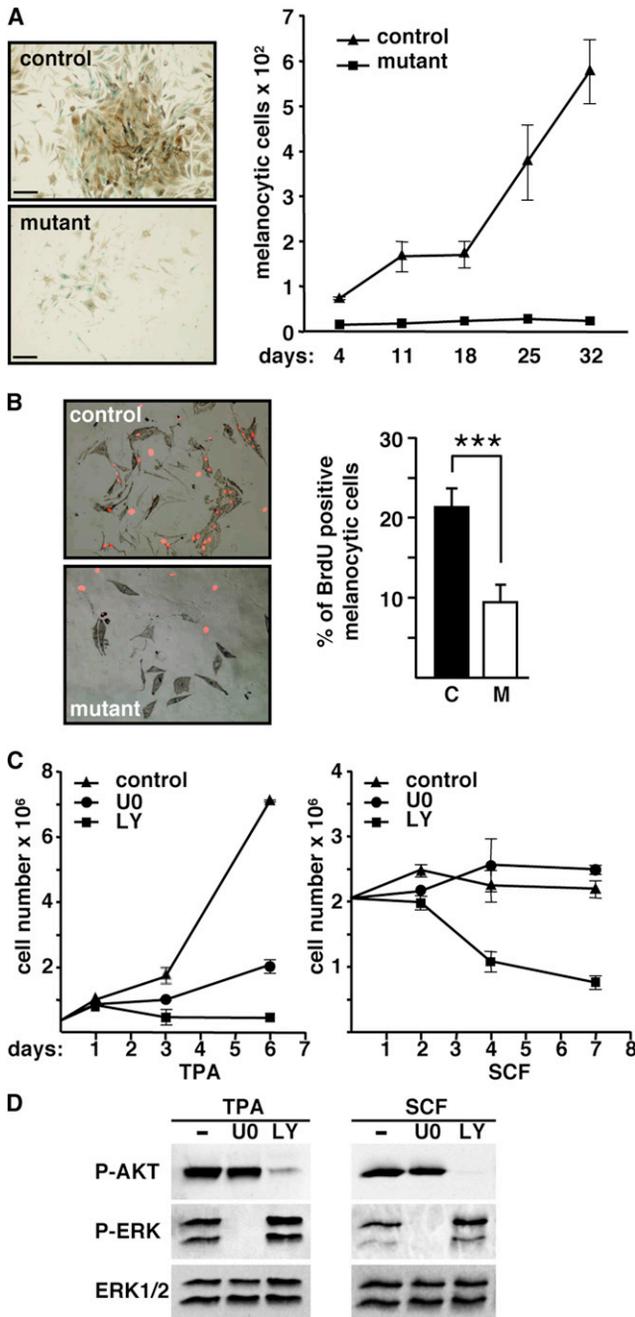


Figure 4. Raf/ERK Pathway Requirement for Melanocyte Proliferation Is Context Dependent

(A) Melanocytes from the skin of mutant and control *Dct::LacZ* animals at P4 were cultured in presence of TPA. Bright-field microscopy pictures were taken at day 27 of culture. Growth curve analysis was obtained by counting from day 4 the LacZ+ pigmented cells at different time points during 32 days. Data are representative of five independent experiments. Scale bars, 200 μ m.

(B) BrdU incorporation of mutant and control cultures at day 4. Left panels represent phase-contrast microscopy images merged with immunofluorescence images of BrdU+ cells (red nuclei). Quantification is shown on the right. C, control (n = 5); M, mutant (n = 7). (***)p < 0.001, Student's test).

(C) Growth curve analyses of melanocyte cultures established from wild-type mouse skin by spontaneous immortalization, seeded in the presence of either

inhibition induced cell death. In contrast, TPA-induced cell proliferation was markedly inhibited by the MEK inhibitor (Figure 4C), in agreement with the inability of Raf knockout cells to grow in the presence of TPA. These results indicate that Raf/ERK signaling is not involved downstream of Kit for melanocyte survival in vitro and suggest that, in vivo, the differential requirement of B-Raf and C-Raf for MSC cell-cycle entry but not for melanoblast proliferation could be directly linked to distinct microenvironmental cues.

DISCUSSION

We have shown that ablation of B-Raf and C-Raf kinases in the melanocyte lineage had no effect on the development of skin and hair follicle pigmentation during the first 3 weeks of life. In addition, ERK was not found activated in mutant or control melanoblasts, indicating that the lack of phenotype was not due to compensation by A-Raf. Accordingly, inhibition of the Raf downstream effector MEK in *Xenopus* embryos did not alter melanocyte development. In contrast, double-knockout mice developed a marked hair-graying phenotype during the successive hair cycles following the first hair molting, thereby demonstrating a key function for B-Raf and C-Raf in the self-maintenance of MSCs in their niche. While melanoblasts require Kit signaling for migration, survival, and differentiation, the self-maintenance of MSCs in the bulge is independent of it. These observations led us to propose a model implying an uncoupling between SCF/Kit and Raf/ERK signaling in the melanocyte lineage.

SCF plays a key role among the various factors that regulate embryonic and postnatal development of the melanocyte lineage (Hirobe, 2005; Mackenzie et al., 1997). *Mitf* acts as a master gene in the regulation of these processes and is considered as a critical nuclear target of the SCF/Kit-induced signaling pathways. In vitro studies have suggested functional links between both Kit and *Mitf* proteins and the Raf/ERK pathway. SCF induces ERK activation in a variety of cell types including melanocytes (Lennartsson et al., 2005) and *Mitf* activity can be regulated by ERK-mediated phosphorylation in response to Kit stimulation (Wu et al., 2000). However, no studies were conducted thus far to demonstrate the physiological relevance of a linear SCF/Kit/Raf/ERK/*Mitf* cascade in vivo. Our results show that Raf proteins are dispensable downstream of Kit and upstream of *Mitf* for melanoblast development and differentiation. Accordingly, ERK was not found activated in these cells in vivo and SCF-induced survival of melanocyte cultures was not affected by MEK inhibition. These results indicate that the Raf/ERK pathway does not represent a critical link between Kit and *Mitf* in melanoblasts and melanocytes in vivo. In support of this, genetic studies demonstrated that mutant *Mitf* proteins that could not be phosphorylated by ERK were able to rescue the coat-color phenotype of loss-of-function

TPA or SCF and treated with U0126, LY294002, or DMSO for 7 days. Data are representative of three independent experiments.

(D) Western blotting analysis of ERK1/2 and AKT phosphorylation in protein extracts from the cultures in (C) showing efficiency of U0126 and LY294002.

Mitf mutations (Bauer et al., 2009; Bismuth et al., 2008). Taken together, these results show that the Raf/ERK pathway is dispensable for Kit-induced Mitf regulation during development of the melanocyte lineage in vertebrates, raising the question of the role of other Kit-induced intracellular signaling pathways. A possible candidate is the PI3K/AKT pathway, which was demonstrated to be essential for the survival response induced by SCF (Blume-Jensen et al., 1998; Lennartsson et al., 2005). We found that in contrast to the lack of effect of MEK inhibition, PI3K inhibition strongly altered melanocyte development in *Xenopus* embryos and survival of mouse melanocytes cultured in the presence of SCF. SCF/Kit signaling is not the only pathway regulating melanocyte development. β -catenin ablation in the melanocyte lineage also resulted in a white coat-color phenotype and Mitf downregulation (Luciani et al., 2011). Therefore, besides the Raf/ERK-independent prosurvival SCF/Kit signaling, the Wnt/ β -catenin pathway provides an important mitogenic signaling to ensure melanoblast proper proliferation.

Our data reveal the essential role of B-Raf and C-Raf in self-maintenance of MSCs in their niche. Results from single *B-raf* and *C-raf* knockouts indicate that the two Raf proteins are functionally redundant in this process since they can compensate for each other. Moreover, animals retaining only one out of four *raf* alleles did not exhibit hair graying. These results show that only moderate levels of Raf protein expression from a single copy of either *B-raf* or *C-raf* are sufficient to ensure MSC self-renewal and that B-Raf/C-Raf heterodimerization is not required. This represents an in vivo demonstration of the direct involvement of Raf proteins in stemness. Several studies have reported hair-graying phenotypes in mouse bearing mutations in components of the Notch pathway (Aubin-Houzelstein et al., 2008; Kumano et al., 2008; Moriyama et al., 2006; Schouwey et al., 2007). These studies clearly demonstrated the implication of Notch signaling in the maintenance of stem cells in the bulge, and suggested a role of protection against apoptosis (Moriyama et al., 2006). Transforming growth factor- β type II receptor ablation in the melanocyte lineage also resulted in mild hair graying caused by incomplete maintenance of MSC immaturity and quiescence, characterized by the appearance of prematurely differentiated cells within the bulge (Nishimura et al., 2010; Tanimura et al., 2011). The hair-graying phenotype observed in the double Raf knockout proceeds from a different mechanism. In contrast to most of the previously reported hair-graying mutants, the Raf double knockout only affects MSCs but has no effect on melanocyte lineage development. In addition, the progressive depletion of MSCs in the bulge was not associated with the presence of prematurely differentiated cells. However, in agreement with the well-known implication of the Raf/ERK pathway in cell-cycle regulation, S phase entry of MSCs was affected in Raf knockout mice. It is therefore tempting to speculate that Raf signaling directly controls asymmetric division of MSCs during the anagen. In conclusion, the present study demonstrates that Raf signaling is required for proper MSC maintenance, but dispensable for early melanocyte lineage development, and reveals an unexpected uncoupling of Kit and Raf signaling during development of this lineage.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

Double *B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl}* conditional knockout mice, obtained by crossing *B-raf^{fl/fl}* (Chen et al., 2006) and *C-raf^{fl/fl}* (Jesenberger et al., 2001) mice, were then crossed to the *Tyr::Cre* transgenic mice (Delmas et al., 2003) and to either the *Dct::LacZ* mice (Mackenzie et al., 1997) or the *Z/EG* mice (Novak et al., 2000). The resulting *B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl};Tyr::Cre^{fl/fl};Dct::LacZ^{fl/fl}* or *B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl};Tyr::Cre^{fl/fl};Z/EG^{fl/fl}* mice were thereafter named mutant animals. As the *Tyr::Cre* transgene is located on the X chromosome, only males were analyzed. All analyses using *Dct::LacZ* reporter were conducted by comparing *B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl};Tyr::Cre^{fl/fl};Dct::LacZ^{fl/fl}* mutant animals to their *B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl};Dct::LacZ^{fl/fl}* control littermates. In analyses using the *Z/EG* reporter transgene, *B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl};Tyr::Cre^{fl/fl};Z/EG^{fl/fl}* mice were compared to *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+};Tyr::Cre^{fl/fl};Z/EG^{fl/fl}* mice.

Dct::LacZ, *Tyr::Cre* and *Z/EG* strains were initially on a C57Bl/6 background whereas the *B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl}* mice were on a 129/Sv background. During the successive generations only the animals with a black fur were used for analyses and colony maintenance. Same results were obtained with black and agouti fur mice regarding the observed phenotype.

Genotyping procedures and results are described in the [Extended Experimental Procedures](#).

For depilation experiments on anesthetized mice, the fur from the left part of the back was removed with a mix of beeswax and gum rosin (50:50 w/w) (Sigma).

BrdU labeling was performed by subcutaneous injection (10 μ g/g body weight) twice daily during 7 days, starting at P21. At P28, dorsal skin was fixed in 4% formaldehyde for 1 hr at 4°C and paraffin embedded.

Animal care and use were approved by the ethics committee of the Curie Institute in compliance with the institutional guidelines. Experimental procedures were conducted in accordance with recommendations of the European Union (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848).

Histological Analysis and Immunostaining

For X-gal staining, dorsal skin was fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in medium for frozen sections (TissuOCT, LaboNord). Slides were routinely stained with eosin and hematoxylin. X-gal staining was performed on 8 μ m cryosections as described in the [Extended Experimental Procedures](#).

Immunostaining was performed on 6 μ m paraffin-embedded sections from skin or E15.5 embryos fixed in 4% paraformaldehyde. Deparaffined and rehydrated sections were boiled in 10 mM sodium citrate, treated with blocking solution (10% goat serum in PBS/0.1% Tween-20), and incubated with primary antibody: mouse anti-BrdU (1:200; BD Biosciences), chicken anti-GFP (1:300; Abcam), and rabbit anti-phospho-ERK (1:100; Cell Signaling). Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (Invitrogen) was used as secondary antibodies.

Melanocyte Culture and BrdU Labeling

Primary melanocyte cultures were obtained as previously described with modifications ([Extended Experimental Procedures](#)). Cells were cultured in HAM F12 Medium containing 10% FCS and 200 nM TPA (Sigma). Bright-field and phase-contrast microscopy was used to identify melanocytes from culture day 4 by the presence of melanin granules and typical dendritic cell morphology. *LacZ*-expressing cells were detected by X-gal staining: the cultures were fixed in 2% (v/v) formaldehyde, 0.2% (w/v) glutaraldehyde and incubated in X-gal staining solution as described in [Extended Experimental Procedures](#). The number of melanocytes was estimated by counting four different fields for each genotype after X-gal staining.

BrdU 10 μ M (Sigma) was added to the medium at day 4 and incorporated for 10 hr. Cells were then fixed in 4% formaldehyde, incubated in blocking solution (0.1% Triton X-100, 10% FCS in PBS) and stained (1/500 anti-BrdU antibody (Sigma), 0.5 mg/ml DNase I). Donkey anti-mouse Alexa Fluor 594 (Invitrogen) was used for detection.

Immortalized cultures were obtained as described above except that contaminating fibroblasts were eliminated by repeated treatment with 25 μ g/ml of G418. Cultures were spontaneously immortalized through serial

passaging. Cells were then stimulated with either 200 nM TPA or 50 ng/ml SCF (R&D systems) and treated with 10 μ M of U0126 or LY294002 (Sigma) for 7 days. Two wells per condition were counted at different days of treatment.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Extended Experimental Procedures and five figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.020>.

LICENSING INFORMATION

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License (CC-BY-NC-ND); <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/legalcode>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Silva and C. Lobe for the *B-raf* knockout and *Z/EG* transgenic mice, G. Aubin-Houzelstein for helpful advice, C. Lasgi for her assistance in FACS analyses, and F. Bertrand, F. Ruelle, and Y. Bourgeois at the Institut Curie mouse facilities. This work was funded by grants from Institut National du Cancer, Ligue Nationale Contre le Cancer, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC; grant #3186) and Fondation de France. A.V. and C.D. were supported by fellowships from the Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, ARC (AV), and Cancéropole/Région Ile-de-France (CD).

Received: September 19, 2011

Revised: June 8, 2012

Accepted: August 22, 2012

Published online: September 27, 2012

REFERENCES

- Aubin-Houzelstein, G., Djan-Zaouche, J., Bernex, F., Gadin, S., Delmas, V., Larue, L., and Panthier, J.J. (2008). Melanoblasts' proper location and timed differentiation depend on Notch/RBP-J signaling in postnatal hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2686–2695.
- Bauer, G.L., Praetorius, C., Bergsteinsdóttir, K., Hallsson, J.H., Gisladóttir, B.K., Schepsky, A., Swing, D.A., O'Sullivan, T.N., Arnheiter, H., Bismuth, K., et al. (2009). The role of MITF phosphorylation sites during coat color and eye development in mice analyzed by bacterial artificial chromosome transgene rescue. *Genetics* **183**, 581–594.
- Bismuth, K., Skuntz, S., Hallsson, J.H., Pak, E., Dutra, A.S., Steingrímsson, E., and Arnheiter, H. (2008). An unstable targeted allele of the mouse *Mitf* gene with a high somatic and germline reversion rate. *Genetics* **178**, 259–272.
- Blume-Jensen, P., Janknecht, R., and Hunter, T. (1998). The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr. Biol.* **8**, 779–782.
- Buscà, R., Abbe, P., Mantoux, F., Aberdam, E., Peyssonnaud, C., Eychène, A., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (2000). Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *EMBO J.* **19**, 2900–2910.
- Chen, A.P., Ohno, M., Giese, K.P., Kühn, R., Chen, R.L., and Silva, A.J. (2006). Forebrain-specific knockout of B-raf kinase leads to deficits in hippocampal long-term potentiation, learning, and memory. *J. Neurosci. Res.* **83**, 28–38.
- Delmas, V., Martinozzi, S., Bourgeois, Y., Holzenberger, M., and Larue, L. (2003). Cre-mediated recombination in the skin melanocyte lineage. *Genesis* **36**, 73–80.
- Heidorn, S.J., Milagre, C., Whittaker, S., Noury, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J.S., Springer, C.J., Pritchard, C., and Marais, R. (2010). Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* **140**, 209–221.
- Hirobe, T. (2005). Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res.* **18**, 2–12.
- Jesenberger, V., Procyk, K.J., Rùth, J., Schreiber, M., Theussl, H.C., Wagner, E.F., and Baccharini, M. (2001). Protective role of Raf-1 in Salmonella-induced macrophage apoptosis. *J. Exp. Med.* **193**, 353–364.
- Kumano, K., Masuda, S., Sata, M., Saito, T., Lee, S.Y., Sakata-Yanagimoto, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Natsugari, H., Kurokawa, M., et al. (2008). Both Notch1 and Notch2 contribute to the regulation of melanocyte homeostasis. *Pigment Cell Melanoma Res* **21**, 70–78.
- Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D., and Shivakrupa, R. (2005). Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* **23**, 16–43.
- Luciani, F., Champeval, D., Herbette, A., Denat, L., Aylaj, B., Martinozzi, S., Ballotti, R., Kemler, R., Goding, C.R., De Vuyst, F., et al. (2011). Biological and mathematical modeling of melanocyte development. *Development* **138**, 3943–3954.
- Mackenzie, M.A., Jordan, S.A., Budd, P.S., and Jackson, I.J. (1997). Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev. Biol.* **192**, 99–107.
- Moriyama, M., Osawa, M., Mak, S.S., Ohtsuka, T., Yamamoto, N., Han, H., Delmas, V., Kageyama, R., Beermann, F., Larue, L., and Nishikawa, S. (2006). Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. *J. Cell Biol.* **173**, 333–339.
- Nishimura, E.K., Jordan, S.A., Oshima, H., Yoshida, H., Osawa, M., Moriyama, M., Jackson, I.J., Barrandon, Y., Miyachi, Y., and Nishikawa, S. (2002). Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* **416**, 854–860.
- Nishimura, E.K., Granter, S.R., and Fisher, D.E. (2005). Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* **307**, 720–724.
- Nishimura, E.K., Suzuki, M., Igras, V., Du, J., Lonning, S., Miyachi, Y., Roes, J., Beermann, F., and Fisher, D.E. (2010). Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance. *Cell Stem Cell* **6**, 130–140.
- Novak, A., Guo, C., Yang, W., Nagy, A., and Lobe, C.G. (2000). *Z/EG*, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* **28**, 147–155.
- Schneider, M.R., Schmidt-Ullrich, R., and Paus, R. (2009). The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr. Biol.* **19**, R132–R142.
- Schouwey, K., Delmas, V., Larue, L., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L.J., Radtke, F., and Beermann, F. (2007). Notch1 and Notch2 receptors influence progressive hair graying in a dose-dependent manner. *Dev. Dyn.* **236**, 282–289.
- Steingrímsson, E., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2006). Mouse coat color mutations: from fancy mice to functional genomics. *Dev. Dyn.* **235**, 2401–2411.
- Tanimura, S., Tadokoro, Y., Inomata, K., Binh, N.T., Nishie, W., Yamazaki, S., Nakauchi, H., Tanaka, Y., McMillan, J.R., Sawamura, D., et al. (2011). Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell* **8**, 177–187.
- Wehrle-Haller, B., and Weston, J.A. (1995). Soluble and cell-bound forms of steel factor activity play distinct roles in melanocyte precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway. *Development* **121**, 731–742.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 875–885.
- Wu, M., Hemesath, T.J., Takemoto, C.M., Horstmann, M.A., Wells, A.G., Price, E.R., Fisher, D.Z., and Fisher, D.E. (2000). c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor *Mi*. *Genes Dev.* **14**, 301–312.

EXTENDED EXPERIMENTAL PROCEDURES

Genotyping of Offsprings, Conceptus and FACS-Sorted Cells

PCR analysis was performed on DNA samples from tail, embryonic tissues and skin. For detection of the floxed (413 bp) and recombinant (282 bp) alleles of *B-raf* and the floxed (185 bp) and recombinant (320 bp) alleles of *C-raf*, PCR amplification (45 s at 94°C, 45 s at 52°C, 1 min at 72°C, 35 cycles) was done using 3 primers (for BRaf: 5'-GCA TAG CGC ATA TGC TCA CA-3', 5'-CCA TGC TCT AAC TAG TGC TG-3' and 5'-GTT GAC CTT GAA CTT TCT CC-3'; for CRaf: 5'-TGG CTG TGC CCT TGG AAC CTC AGC ACC-3', 5'-AAC ATG AAG TGG TGT TCT CCG GGC GCC-3' and 5'-ATG CAC TGA AAT GAA AAC GTG AAG ACG ACG-3').

The *Tyr::Cre* transgene (473 bp) was detected by PCR (45 s at 94°C, 30 s at 58°C, 30 s at 72°C, 30 cycles) using 2 primers (5'-GTC ACT CCA GGG GTT GCT GG-3' and 5'-CCG CCG CAT AAC CAG TGA-3'). The *Dct::LacZ* transgene (530 bp) was identified by PCR (45 s at 94°C, 30 s at 62°C, 30 s at 72°C, 30 cycles) using 2 primers (5'-CAG GAC ACG GCT TGT CAT CAT GGT GT-3' and 5'-CAT TCA TCG TCT CTC AGG AAT TCA-3'). Every PCR began with a 5min step at 94°C and a final extension at 72°C for 10 min.

FACS Analyses

Whole skin was removed from *B-raf^{fl/fl};C-raf^{fl/fl};Tyr::Cre^{lo};Z/EG^{lo}* and *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+};Tyr::Cre^{lo};Z/EG^{lo}* newborn mice at P4 and the separation of dermis from epidermis was achieved by overnight treatment at 4°C with Trypsine 0.25%-EDTA 2mM. The isolated dermis was digested in a mixture of collagenase I and IV for 30min at 37°C and then mechanically dissociated with forceps followed by multiple passages through an 18-G needle. After washing (HBSS 1X, CaCl₂ 1mM, DNase 10mg/ml, 20% fetal bovine serum) and centrifugation, samples were resuspended (HAM-12, 3% fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin, 2mM EDTA) and strained in order to obtain single-cell suspensions. Cell sorting was performed on a FACS-AriaIII (BD Biosciences, San Jose, CA). GFP-positive cells were lysed and genotyped as described above.

Whole-Mount Embryo X-gal Staining

Embryonic day (E) 0.5 was determined at noon of the day of detection of a vaginal plug. X-gal staining was essentially done as previously described (Delmas et al., 2003). Briefly, embryos at E13.5 were dissected from the extraembryonic tissues, fixed in 0.25% glutaraldehyde and permeabilized in 2mM MgCl₂, 0.01% Na-deoxycholate, 0.02% NP-40 twice for 30min at RT. They were then incubated in staining solution (0.4mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside, 4.9mM potassium ferricyanide, 4.7mM potassium ferrocyanide, 2mM MgCl₂, 0.01% Na-deoxycholate, 0.02% NP-40 in PBS) for 4h at 37°C and post-fixed O/N in 4% paraformaldehyde at 4°C. The number of LacZ-positive cells (melanoblasts) was determined on each embryo side between the anterior and posterior limbs. Variations in the number of melanoblasts were observed on both sides of the embryos. The mean number of melanoblasts per side for each mutant (n = 5) and control (n = 6) embryos was determined.

Mouse Embryos BrdU Labeling

BrdU (Sigma) solution was injected intraperitoneally into pregnant mice (50 µg/g body weight). A second injection was done 20 min later and embryos at E13.5 were harvested 2 hr after the first injection, dissected from the extraembryonic tissues, washed in PBS and fixed in 4% formaldehyde for 30min at 4°C. They were embedded in medium for frozen sections (TissueOCT, LaboNord) and immunostaining was performed on 8 µm cryosections as described in the manuscript using anti-BrdU (mouse, 1:200; BD Biosciences) and anti-β-Galactosidase (chicken, 1:500; AbCam) primary antibodies.

Xenopus Laevis Embryo Manipulations

Xenopus laevis embryos were obtained by in vitro fertilization following standard protocols, and grown in 1/3 MMR saline solution (Sive et al., 2000). In each series of experiments, siblings were grown by groups of 20-30 embryos in 1/3MMR medium complemented with DMSO (vehicle) or chemical inhibitors as needed. Concentrations of CI-1040/PD184352 (Santa Cruz) and LY294002 (Sigma) were chosen according to previously published assays, using frog or fish embryos (Bolcome et al., 2008; Carballada et al., 2001; Taylor et al., 2010). Embryos were fixed and melanoblast exit from the neural tube and melanocyte lateral cell migration were monitored using *dct* labeling by whole mount in situ hybridization as previously described (Monsoro-Burq, 2007). Pictures were taken on a Leica MZFLIII binocular scope equipped with a Scion camera, using Photoshop CS software. In each experiment series, two embryos from each condition were lysed for Western blotting.

Hair Analysis and Melanin Quantification

Hair from the back of mutant and control mice were isolated and observed under microscope. The number of white and black hairs were counted under a Leica binocular magnifier. Melanin was extracted from 1.5 mg of dorsal hair of mutant, control, albino and C57Bl/6 mice by NaOH treatment (1M NaOH, 4h at 85°C). Relative melanin content was estimated by spectrophotometric measurement at 475 nm. Each hair sample was measured in triplicate and compared to a standard curve determined with synthesis melanin (Sigma) treated as hair samples.

Primary Culture of Melanocytes

Melanocyte cultures were obtained as described (Nishimura et al., 1999) with modifications. Briefly, full-thickness dorsal trunk skin obtained from newborn mice (P4) were treated with 0.25% (w/v) of type I and type IV collagenases (Sigma) in PBS at 37°C for 45 min. The samples were washed with Wash Buffer (Hank's balanced salt solution (HBSS) with 1mM CaCl₂, 0.005% DNase I (Roche), 20% FCS) and then incubated in Cell Dissociation Buffer (GIBCO/Invitrogen) at 37°C for 10 min. The skin was dissociated by passing through 18-20 gauge needles. The cells were separated from the hair and the scraps by sedimentation in the Wash Buffer. Cells were plated onto 6 wells-plates (1x10⁶ cells/well) and cultured in HAM F12 Medium (GIBCO/Invitrogen) containing 10% FCS and 200nM 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) (Sigma).

SUPPLEMENTAL REFERENCES

- Bolcome, R.E., 3rd, Sullivan, S.E., Zeller, R., Barker, A.P., Collier, R.J., and Chan, J. (2008). Anthrax lethal toxin induces cell death-independent permeability in zebrafish vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 2439–2444.
- Carballada, R., Yasuo, H., and Lemaire, P. (2001). Phosphatidylinositol-3 kinase acts in parallel to the ERK MAP kinase in the FGF pathway during *Xenopus* mesoderm induction. *Development* 128, 35–44.
- LaBonne, C., Burke, B., and Whitman, M. (1995). Role of MAP kinase in mesoderm induction and axial patterning during *Xenopus* development. *Development* 121, 1475–1486.
- MacNicol, A.M., Muslin, A.J., and Williams, L.T. (1993). Raf-1 kinase is essential for early *Xenopus* development and mediates the induction of mesoderm by FGF. *Cell* 73, 571–583.
- Monsoro-Burq, A.H. (2007). A rapid protocol for whole-mount in situ hybridization on *Xenopus* embryos. *CSH Protoc.* <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot4809>.
- Nieuwkoop, P.D., and Faber, J. (1994). *Normal Table of Xenopus laevis*, Third Edition (New York: Garland).
- Nishimura, E.K., Yoshida, H., Kunisada, T., and Nishikawa, S.I. (1999). Regulation of E- and P-cadherin expression correlated with melanocyte migration and diversification. *Dev. Biol.* 215, 155–166.
- Sive, H.L., Grainger, R.M., and Harland, R.M. (2000). *Early Development of Xenopus laevis: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press).
- Taylor, K.L., Grant, N.J., Temperley, N.D., and Patton, E.E. (2010). Small molecule screening in zebrafish: an in vivo approach to identifying new chemical tools and drug leads. *Cell Commun. Signal.* 8, 11.

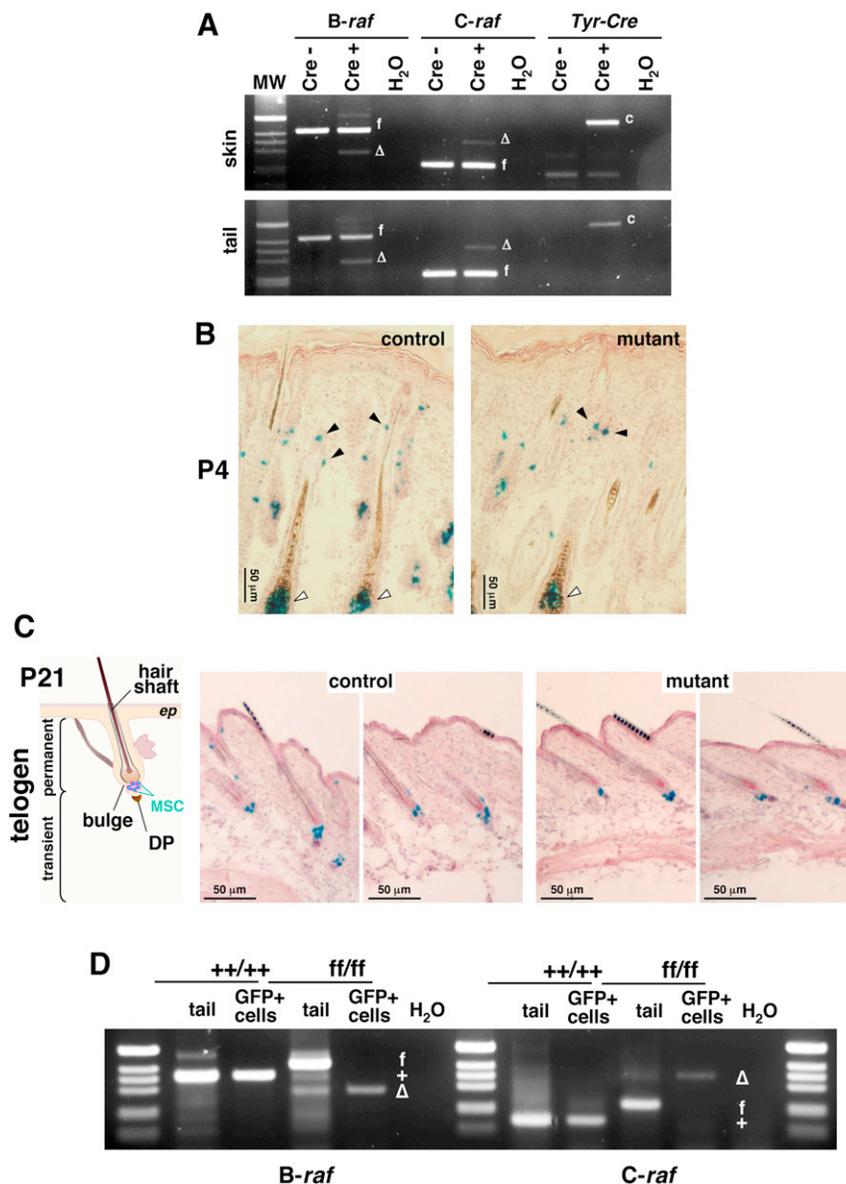


Figure S1. B-Raf and C-Raf Proteins Are Not Required for Hair Follicle Pigmentation, Related to Figure 1

(A) Genotyping of dorsal skin of P4 pups and P21 mice tail extracts from mutant ($B-raf^{fl/fl}; C-raf^{fl/fl}; Tyr::Cre^{lo}; Dct::LacZ^{lo}$) and control ($B-raf^{fl/fl}; C-raf^{fl/fl}; Dct::LacZ^{lo}$) animals. f indicates PCR products corresponding to $B-raf$ and $C-raf$ floxed alleles; Δ indicates PCR products corresponding to $B-raf$ and $C-raf$ recombinant alleles; c indicates the $Tyr::Cre$ transgene PCR product.

(B) X-gal staining of representative histological sections of the skin from mutant and control mice, showing developing hair follicles at P4. The presence of melanocytes (Mc) in the bulb and MSCs in the bulge is indicated by open and black arrowheads, respectively.

(C) X-gal staining of representative histological sections of the skin from mutant and control mice at P21. Images correspond to the first telogen, as indicated on the scheme on the left.

(D) GFP-positive cells were FACS-sorted from the skin of $B-raf^{fl/fl}; C-raf^{fl/fl}; Tyr::Cre^{lo}; Z/EG^{lo}$ and $B-raf^{+/+}; C-raf^{+/+}; Tyr::Cre^{lo}; Z/EG^{lo}$ mice at P4 and genotyped as described in Supplemental Experimental Procedures (below). Genotyping was compared to that of the tail extract from the same animal. f indicates PCR products corresponding to $B-raf$ and $C-raf$ floxed alleles; Δ indicates PCR products corresponding to $B-raf$ and $C-raf$ recombinant alleles; + indicates PCR products corresponding to $B-raf$ and $C-raf$ wild-type alleles.

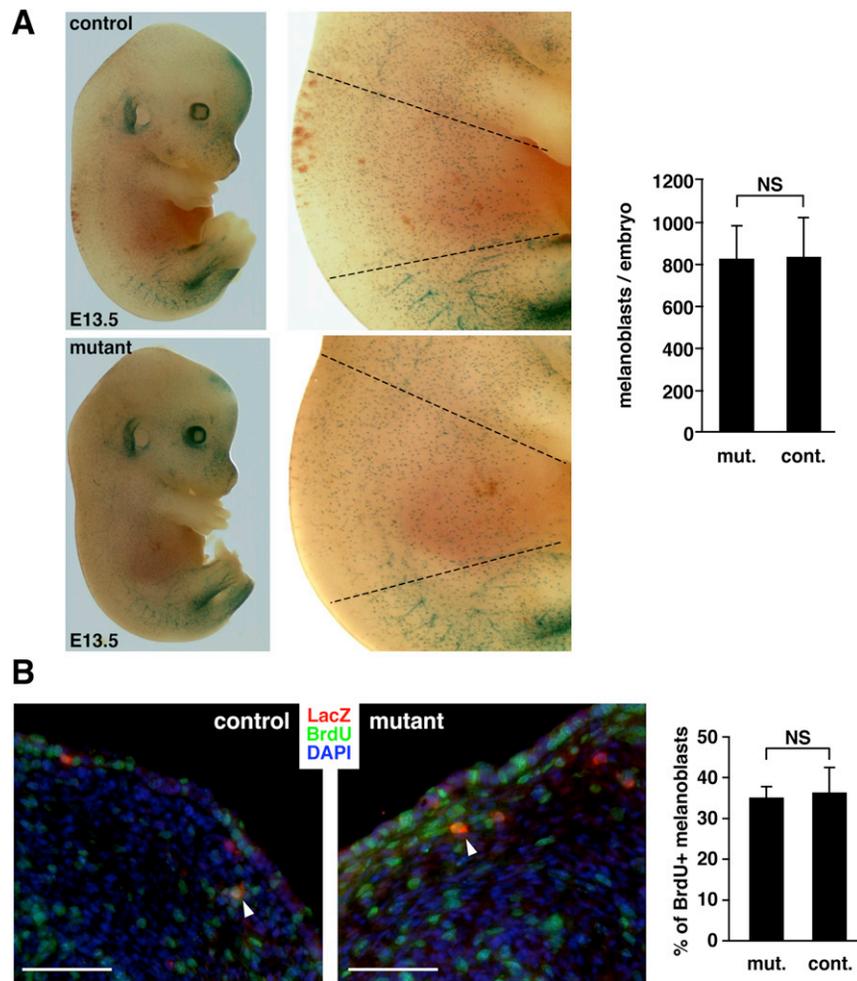


Figure S2. B-Raf and C-Raf Proteins Are Not Required for Mouse Melanoblast Development, Related to Figure 1

(A) X-gal staining of mutant ($B\text{-raf}^{fl/fl}; C\text{-raf}^{fl/fl}; \text{Tyr}::\text{Cre}^{\theta}; \text{Dct}::\text{LacZ}^{\theta}$) and control ($B\text{-raf}^{fl/fl}; C\text{-raf}^{fl/fl}; \text{Dct}::\text{LacZ}^{\theta}$) embryos at E13.5. The dashed lines delineate the area used for LacZ-positive cells counting. Quantification of the mean number of LacZ-positive cells in 5 mutant and 6 control embryos is shown on the right. NS, not significant.

(B) Melanoblast proliferation is not impaired in Raf knockout embryos. Following in vivo incorporation of BrdU in pregnant mice, immunostaining was performed on frozen sections of E13.5 mutant and control littermate embryos, using anti- β -galactosidase (LacZ) and anti-BrdU antibodies. Images are merged to reveal proliferating melanoblasts (white arrowheads). Scale bars represent 50 μm . Quantification of BrdU+/LacZ+ cells is shown on the right. Percentages were obtained from counting the number of melanoblasts per embryo in 2 control and 4 mutant embryos. NS, not significant.

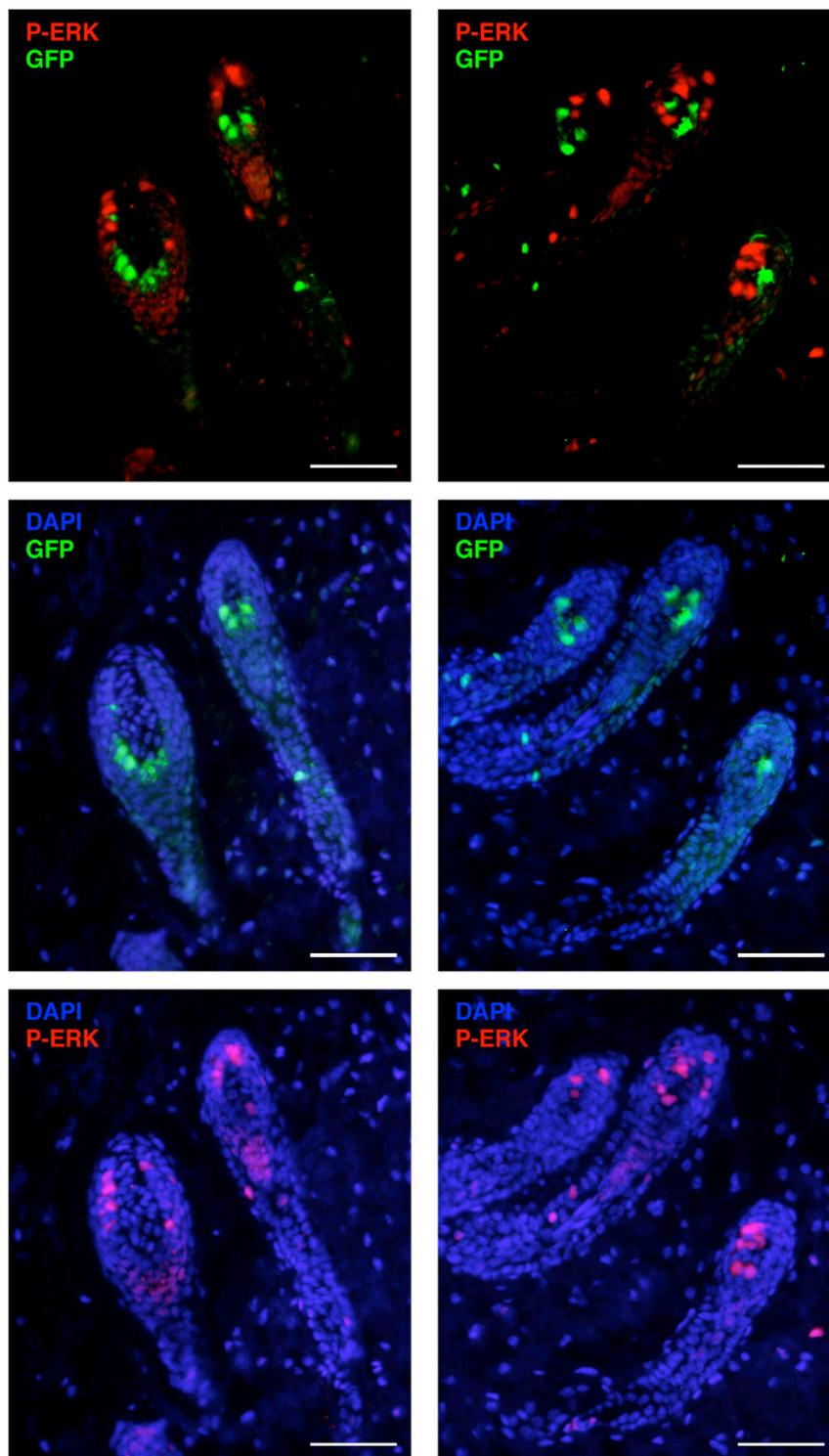


Figure S3. ERK Is Not Activated in Differentiating Melanocytes of the Hair Follicle during Second Early Anagen, Related to Figure 1

Immunostaining of hair follicles from wild-type (*B-raf*^{+/+}; *C-raf*^{+/+}; *Tyr::Cre*^{f/f}; *Z/EG*^{f/f}) skins during early anagen. Paraffin-embedded skin sections were immunolabeled with anti-phospho-ERK (P-ERK) and anti-GFP (GFP) antibodies. No double GFP/P-ERK-positive cells could be detected in the regenerating bulbs. Scale bars represent 50 μ m.

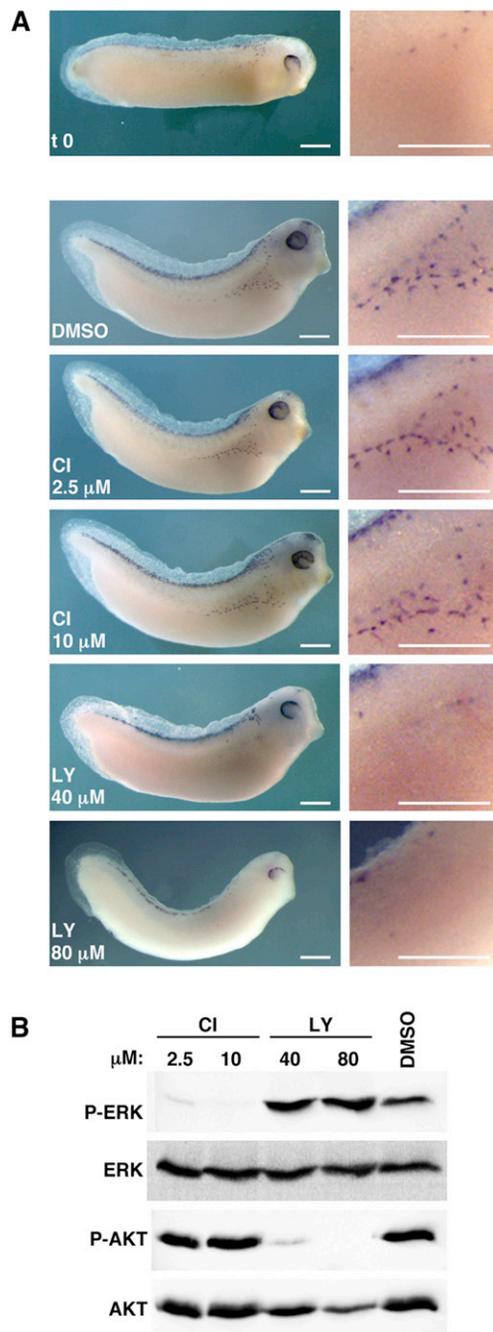


Figure S4. ERK Signaling Is Dispensable for Early *Xenopus* Melanocyte Development in Vivo, Related to Figure 1

(A) *Xenopus laevis* sibling embryos were treated with two different doses of CI-1040 (CI) or LY294002 (LY), two in vivo pharmacological inhibitors of MEK and PI3K, respectively (Bolcome et al., 2008; Carballada et al., 2001; Taylor et al., 2010), during a developmental window corresponding to melanoblast exit from the neural tube and melanocyte dorso-lateral migration (stages 28 to 33, according to Nieuwkoop and Faber developmental staging table (Nieuwkoop and Faber, 1994)). The top picture represents an embryo at the beginning of the treatment (stage 28)(t0). Other pictures were taken at the end of the treatment (stage 33). Melanoblasts were revealed by in situ hybridization with a dct probe (n = 102 for LY294002 and n = 112 for CI-1040). A higher magnification of the melanocyte migrating area is shown on the right. DMSO treated control embryos were identical to wild-type non-treated sibling embryos (n = 37). Scale bars represent 500 μm. Melanocyte development was blocked by LY294002 at both doses, although the higher dose also caused additional developmental defects (fin and head structures were underdeveloped), showing that the PI3K pathway is required for melanocyte development in vivo. In contrast, CI-1040 did not affect melanocyte proliferation and migration in treated embryos. In agreement with previous studies (MacNicol et al., 1993; LaBonne et al., 1995), treatment with CI-1040 at earlier stages resulted in developmental defects (not shown), confirming that this inhibitor was active in vivo.

(B) Western blotting analysis of ERK (P-ERK) and AKT (P-AKT) phosphorylation in protein extracts from whole *Xenopus* embryos at the end of the treatment, showing efficiency of CI-1040 (CI) and LY294002 (LY) inhibitors. The amount of total ERK and total AKT are shown as a loading control.

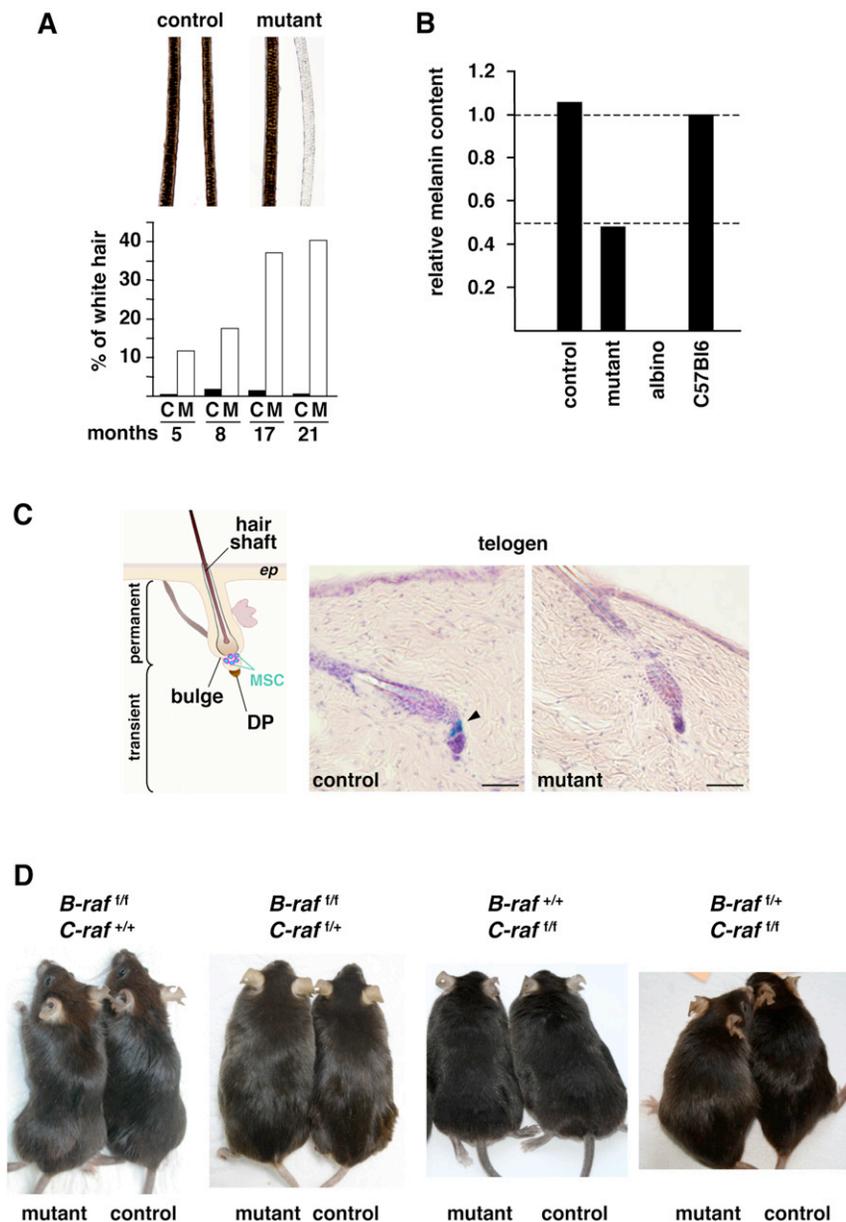


Figure S5. Impaired Melanocyte Stem Cell Self-Maintenance in Raf Knockout Mice, Related to Figure 2

(A) Pictures showing the presence of white unpigmented hair among black pigmented hair in the mutant (upper) and quantification of the ratio between black and white hair at different ages showing an increase in the percentage of white hair with time (lower) (C = control; M = mutant).

(B) Hair shaft melanin content is decreased in Raf knockout mice developing hair-graying phenotype. Spectrophotometric measurement of the melanin content at 1 year in mutant hair as compared to control and C57Bl/6 hairs. The hair from albino mice that do not contain melanin pigment and C57/Bl6 were used as controls.

(C) Representative pictures of X-gal staining on histological sections of 1 year-old skin at the telogen stage. Note the depletion of LacZ-positive MSCs in the mutant mouse but not in the control. Scale bars represent 50 μ m.

(D) B-Raf and C-Raf proteins are functionally redundant and compensate for each other in MSC self-maintenance. Single *B-raf* and *C-raf* knockouts, as well as animals retaining only one out of four *raf* alleles do not exhibit hair graying. In each panel, pictures were taken from 7-12 month-old littermate mice.

Self-renewal of melanocyte stem cells: role of RAF and MET kinases

Céline Barbotin^{1,2,3,4,5}, Sabine Druillennec^{1,2,3,4,5}, Magalie Larcher^{1,2,3,4,5}, Charlène Lasgi^{1,2,3,4}, Flavio Maina⁶, Celio Pouponnot^{1,2,3,4} and Alain Eychène^{1,2,3,4,5*}

¹ Institut Curie, Orsay F-91405, France

² INSERM U1021, Centre Universitaire, Orsay F-91405, France

³ CNRS UMR 3347, Centre Universitaire, Orsay F-91405, France

⁴ Université Paris Sud-11, Orsay F-91405, France

⁵ Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer

⁶ Developmental Biology Institute of Marseille-Luminy (IBDML), CNRS UMR 6216, Campus de Luminy, Marseille 13288, France

Running title: Self-renewal of melanocyte stem cells: role of RAF and MET kinases

Keywords: BRAF; CRAF; MET; Melanocyte; Stem Cell

*Correspondence:

Dr. Alain Eychène

E-mail : eychene@curie.fr

Institut Curie - Recherche

Bâtiment 110, Centre Universitaire

91405 - ORSAY Cedex, FRANCE

Tel. 33-1 69 86 30 74

Fax. 33-1 69 86 30 51

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Article 2

Rôle des kinases RAF et MET dans l'auto-renouvellement des cellules souches mélanocytaires

Dans cette étude, nous avons entrepris de déterminer par quel mécanisme les kinases B-RAF et C-RAF contrôlent l'auto-renouvellement des MSCs dans la niche du follicule pileux chez la souris. Afin de déterminer quelles sont les cibles de la voie RAS/RAF/MEK/ERK impliquées dans ce processus, nous avons entrepris de réaliser une analyse transcriptomique comparative des MSCs issues d'animaux wild-type et knock-out pour *B-raf* et *C-raf*.

I. Analyse Transcriptomique des MSCs wild-type et knock-out pour *B-raf* et *C-raf*

Afin d'être en mesure de comparer les profils d'expression génique des MSCs contrôles et mutantes, nous avons dû mettre en place un protocole de purification de ces cellules.

Pour cela, nous avons choisi de générer une nouvelle lignée de souris permettant de suivre et d'isoler les MSCs grâce à l'expression de la GFP.

I.A. Génération de la lignée de souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o;mT/mG*

Les souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o* et *B-raf^{f/+};C-raf^{f/+};Tyr::Cre/o* ont été croisées avec la lignée murine mT/mG (Muzumdar et al., 2007). Cette lignée exprime constitutivement la protéine tdTomato, un variant de la RFP. Après action de la recombinaison Cre, le transgène *Tomato* est délété, permettant l'expression du second gène rapporteur *Egfp* (**Figure 2A**). Ainsi, tous les types cellulaires de la peau des souris expriment la tdTomato, à l'exception

des cellules du lignage mélanocytaire qui expriment la GFP. La lignée transgénique *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o;mT/mG* permet de distinguer et d'isoler facilement les mélanocytes des autres types cellulaires grâce à l'expression de la GFP. De plus, la localisation membranaire de la tdTomato et de la GFP constitue un atout pour étudier la morphologie ainsi que les interactions des MSCs avec les autres composants de la niche, connus pour jouer un rôle primordial dans le contexte de sa régulation. Cependant, l'établissement de cette lignée a été rendu ardu par la nécessité de sélectionner un évènement rare de recombinaison homologue, étant donné la très faible distance génétique (~2600 Kb) entre le locus *Rosa26* dans lequel est inséré le transgène *mT/mG* et le locus *C-raf*, tous deux localisés sur le chromosome 6. Le transgène *Tyr::Cre* étant localisé sur le chromosome X, seuls les mâles porteurs d'une seule copie servent à l'étude. En effet, la présence de deux copies de la *Cre* peut entraîner un défloxxage non spécifique. Etant donné que les femelles possèdent une inactivation aléatoire d'un des chromosomes X, elles n'ont pas été incluses dans l'étude. Les mâles *B-raf^{f/+};C-raf^{f/+};Tyr::Cre/o;mT/mG* sont utilisés en tant que contrôles. Les analyses ont été faites sur un fond mixte C57/Bl6/129Sv et seules les souris au pelage noir ont été utilisées afin de faciliter l'étude de leur pigmentation.

I.B. Mise en place d'un protocole de purification des MSCs

A l'heure actuelle, aucun marqueur spécifique des cellules souches mélanocytaires n'a été identifié. La purification de ces cellules a donc nécessité la mise en place d'une stratégie reposant sur l'expression de la GFP dans le lignage mélanocytaire de nos souris transgéniques. Afin d'isoler spécifiquement les MSCs, seules les peaux d'animaux âgés de 21 jours sont utilisées. En effet, à ce stade, les follicules sont dans la phase de télogène et seule la partie permanente du follicule pileux est présente avec à sa base le bulge et le hair germ. Les seules cellules du lignage mélanocytaire présentes sont donc les MSCs qui sont GFP positives dans la lignée *Tyr::Cre/o;mT/mG*, tandis que les autres types cellulaires expriment la tdTomato (**Figure 2B**). La peau de souris en télogène, reconnaissable à sa couleur rose et sa faible épaisseur, est entièrement prélevée, puis subit un processus de dissociation permettant de récupérer une suspension cellulaire. Un marquage immunofluorescent du récepteur à faible affinité pour le facteur de croissance des nerfs (p75^{NGF}) est ensuite réalisé sur cette suspension cellulaire, afin de marquer les cellules de Schwann terminales de type II. Ces cellules mécanoréceptrices résident entre la

membrane basale et l'ORS au dessus du bulge, et forment une couronne tout autour du follicule pileux (Woo et al., 2012) (Djian-Zaouche et al., 2012). Il a été montré *in vitro* qu'elles pouvaient se différencier en cellules gliales, cellules de muscles lisses, neurones, kératinocytes mais pas en mélanocytes (Djian-Zaouche et al., 2012). Pour une raison non déterminée, elles expriment la GFP dans nos modèles murins, bien que n'appartenant pas au lignage mélanocytaire (**Figure 2B**). Les cellules de Schwann terminales de type II sont distinguées des MSCs grâce à leur expression de la protéine p75NGF. Les MSCs, c'est-à-dire les cellules GFP+/tdTomato-/p75NGF-, sont isolées par FACS (fluorescent activated-cell sorting). Nous avons ensuite montré que les cellules triées selon ce protocole étaient bien défloxxées pour les gènes *B-raf* et *C-raf* (**Figure 2D**). Il semble qu'entre 0,5% et 1% du total des cellules issues de la peau d'une souris correspond aux MSCs, soit entre 20 000 et 40 000 cellules souches par animal (**Figure 2C**). Ce faible nombre de MSCs rend leur étude particulièrement difficile. Il est intéressant de noter ici que les MSCs triées à partir des animaux *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+};Tyr::Cre/o;mT/mG* (notées MSCs *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}*), et les MSCs issues d'animaux *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o;mT/mG* (notées MSCs *B-raf^{-/-};C-raf^{-/-}*) possèdent le même profil lors du tri par FACS, et sont aussi nombreuses.

I.C. La population triée appartient au lignage mélanocytaire et présente un profil de cellule indifférenciée

Afin de vérifier que les cellules triées selon ce protocole sont bien les MSCs, nous avons d'une part vérifié qu'elles appartenait au lignage mélanocytaire, et d'autre part qu'elles étaient indifférenciées. Pour cela, nous nous sommes intéressés au profil d'expression des gènes *Kit*, *Dct* et *Tyrosinase*, connus pour être exprimés spécifiquement dans le lignage mélanocytaire. En effet, le gène *Kit* est impliqué dans la prolifération et la migration des précurseurs mélanoblastiques, et les gènes *Dct* et *Tyrosinase* sont responsables de la mélanogenèse. Tous sont connus pour être exprimés faiblement dans les MSCs et fortement dans leurs cellules progénitrices mélanoblastiques. Nous avons donc comparé les profils d'expression des gènes *Kit*, *Dct* et *Tyrosinase* dans les cellules GFP+/Tom-/p75NGF- isolées à partir d'animaux *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+};Tyr::Cre/o;mT/mG* âgés de 21 jours ou de 4 jours (**Figure 3**). En effet, à quatre jours, les mélanoblastes issus de la crête neurale lors du développement embryonnaire, colonisent les bulges et les bulbes et forment donc la majorité du lignage mélanocytaire. Chez les souris de trois semaines, le poil est en télogène,

donc les MSCs sont les seules cellules du lignage présentes. La comparaison par RT-qPCR des profils d'expression des gènes *Kit*, *Dct* et *Tyrosinase* dans ces deux populations, montrent qu'ils sont exprimés beaucoup plus fortement dans les cellules GFP+/Tom-/p75NGF- triées à quatre jours (mélanoblastes) que dans les cellules triées à P21. Nous pouvons donc dire que les cellules triées selon notre protocole appartiennent au lignage mélanocytaire, et que la population issue d'animaux de trois semaines est plus indifférenciée. Ce faisceau d'indices nous amène à penser que la population GFP+/Tom-/p75NGF- triée chez les animaux de 21 jours sont les MSCs.

I.D. Analyse transcriptomique des MSCs *B-raf*^{+/+}; *C-raf*^{+/+}, des MSCs *B-raf*^{-/-}; *C-raf*^{-/-} et des mélanoblastes *B-raf*^{+/+}; *C-raf*^{+/+}

L'objectif principal de cette étude transcriptomique était d'identifier des cibles transcriptionnelles de la voie RAS/RAF/MEK/ERK impliquées dans l'auto-renouvellement des MSCs, en comparant les profils d'expression des MSCs contrôles et des MSCs mutantes pour B-RAF et C-RAF. Cependant, peu de choses étant connues sur le fonctionnement des MSCs, il nous est apparu intéressant de réaliser en parallèle une étude comparative des profils d'expression entre les MSCs et les progéniteurs mélanoblastiques.

Pour réaliser ces deux objectifs, trois séries d'échantillons ont été collectées:

-des **MSCs *B-raf*^{+/+}; *C-raf*^{+/+}** issues de souris *B-raf*^{+/+}; *C-raf*^{+/+}; *Tyr::Cre*/o; *mT/mG* âgées de 21 jours (stade télogène)

-des **MSCs *B-raf*^{-/-}; *C-raf*^{-/-}** issues de souris *B-raf*^{-/-}; *C-raf*^{-/-}; *Tyr::Cre*/o; *mT/mG* âgées de 21 jours (stade télogène)

-des **mélanoblastes *B-raf*^{+/+}; *C-raf*^{+/+}** issus de souris *B-raf*^{+/+}; *C-raf*^{+/+}; *Tyr::Cre*/o; *mT/mG* âgées de quatre jours.

Pour chaque série, les populations de MSCs ou de mélanoblastes de quatre animaux provenant de portées différentes ont été purifiées et analysées indépendamment. L'analyse a donc porté sur douze échantillons (4 réplicats pour chacune des trois séries) correspondant à autant d'animaux.

Le nombre de MSCs ou de mélanoblastes présent dans la peau d'un animal étant très faible (de l'ordre de 20 000 à 50 000 cellules), nous avons dû recourir à un protocole d'amplification de l'ADNc pour l'ensemble de nos échantillons. L'analyse de la qualité de celui-ci nous a conduits à éliminer un échantillon de la série MSCs contrôles. Les échantillons restants ont été hybridés sur puces Affymetrix mouse Gene2.1 sur la plateforme de transcriptomique de l'Institut Curie. L'étude des composantes principales réalisée à partir des données des puces affymetrix nous a conduits à écarter certains réplicats qui différaient trop des autres, et risquaient ainsi de biaiser l'analyse. Au final, les analyses de profils d'expression génique ont pris en compte quatre réplicats des **MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-}**, contre deux réplicats pour les **MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+}** et les **mélanoblastes *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+}**. Ce faible nombre de réplicats diminue la fiabilité des résultats obtenus par l'analyse, nous obligeant à prendre ceux-ci avec précaution, et à accorder une importance toute particulière à la validation des gènes identifiés. Néanmoins, nous avons pu obtenir pour chacune des deux analyses une liste de gènes différentiellement exprimés, permettant de discriminer les populations **MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+}** des **MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-}**, et les **MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+}** des **mélanoblastes *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+}**. (**Figure 4**). De plus, les gènes *c-Kit*, *Dct* et *Tyrosinase*, préalablement montrés comme plus exprimés dans les **mélanoblastes *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+}** par comparaison aux **MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+}** (**Figure 3**), ressortent selon la même tendance d'expression dans l'analyse transcriptomique. Cependant, il est important de noter qu'un certain nombre de gène différentiellement exprimés selon les données transcriptomiques, n'ont pas pu être validés par RT-qPCR.

L'analyse comparative des profils d'expression génique des MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+} et des mélanoblastes *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+} a fait ressortir une signature métabolique particulière des MSCs, par rapports à leurs cellules progénitrices. Ainsi, dans les MSCs, les gènes codant pour les protéines du cycle de Krebs et pour celles constituant les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont moins exprimés (**Figure 5**). Les MSCs posséderaient un métabolisme anaérobie par opposition à celui des mélanoblastes faisant intervenir une respiration aérobie intense. Ces résultats sont cependant encore à valider, nous y reviendrons dans le chapitre "Discussion".

Par la suite, nous nous sommes concentrés sur l'analyse comparant les niveaux d'expression génique entre les MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+} et les MSCs *B-raf*^{-/-} *C-raf*^{-/-}, afin

d'atteindre notre objectif initial: comprendre le rôle des kinases RAF dans le maintien des MSCs.

II. Identification du gène *c-Met* comme cible de la voie RAS/RAF/MEK/ERK dans les MSCs:

II.A. Importante réduction de l'expression de *c-Met* dans les MSCs invalidées pour *B-raf* et *C-raf*

A partir des données transcriptomiques issues des MSCs contrôles et mutantes, nous avons identifié les gènes les plus différentiellement exprimés pouvant être cibles de la voie RAF/MEK/ERK. Nous avons alors entrepris de valider la différence d'expression de ces gènes par RT-qPCR, à la fois sur les réplicats contrôles et mutants inclus dans le transcriptome, mais aussi sur des populations de MSCs issues d'animaux supplémentaires. L'augmentation du nombre de réplicats testés (10 au total) permet de s'assurer de la représentativité des résultats.

Cette approche nous a permis de mettre en évidence une diminution très importante de l'expression du gène *c-Met*, codant pour le récepteur tyrosine kinase MET, dans les MSCs mutantes (**Figure 6**). La capacité de la signalisation HGF/SF-MET à activer la voie RAS/RAF/MEK/ERK, ainsi que son implication potentielle dans la mise en place du lignage mélanocytaire, la mélanogénèse, et sa dérégulation dans mélanome, nous ont conduit à considérer *c-Met* comme un gène candidat des plus intéressants. En effet, *c-Met* pourrait être une cible transcriptionnelle directe ou indirecte de la voie RAS/RAF/MEK/ERK, jouant un rôle dans le processus d'auto-maintenance des MSCs. Chez les animaux knockout, la disparition de *B-raf* et *C-raf* conduirait à une diminution de l'expression de *c-Met* ayant pour conséquence la disparition des MSCs. Afin de valider la perte d'expression de *c-Met* *in vivo*, des expériences d'immunohistochimie ont été menées sur des peaux en télogène de souris *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+};Tyr::Cre/o;mT/mG* et *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o;mT/mG*. Celles-ci mettent en évidence la présence du récepteur MET dans l'ensemble des kératinocytes de la niche du follicule pileux en télogène, chez les animaux contrôles comme chez les animaux knock-out pour *B-raf* et *C-raf*. De plus, d'après ces expériences, les MSCs *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}*

expriment le récepteur MET, tandis que la présence de MET est indétectable à la membrane de la plupart des MSCs *B-raf*^{-/-} *C-raf*^{-/-} (**Figure 7A**). Nous avons validé ces observations en réalisant la quantification du nombre de MSCs positives et négatives pour le signal MET dans les MSCs des deux génotypes (**Figure 7B**). Nous avons ainsi pu confirmer que dans 90% des MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+} un signal MET était visible à la membrane, tandis que ce signal n'était présent que dans environ 40% des MSCs *B-raf*^{-/-} *C-raf*^{-/-}. La délétion des kinases B-RAF et C-RAF semble donc avoir pour conséquence une diminution drastique du récepteur MET à la membrane de ces cellules, en accord avec la forte diminution du transcrit *c-Met* dans les MSCs.

II.B. Profil d'expression de MET et de son ligand dans la peau

Dans le but de comprendre le rôle du récepteur MET dans la régulation de l'homéostasie du lignage mélanocytaire, et plus particulièrement des MSCs, nous nous sommes intéressés aux profils d'expression de la protéine MET et de son ligand HGF/SF au cours du développement embryonnaire, et des différentes étapes du cycle du follicule pileux. Pour cela, nous avons établi une collaboration avec le laboratoire du Dr Flavio Maina (IBDM, Marseille) qui s'intéresse notamment aux rôles de la voie HGF/SF-MET au cours de l'embryogénèse murine. Son laboratoire a ainsi généré en 2011 une souris knock-in, dans laquelle une cassette loxP-Stop-LoxP suivie du rapporteur *LacZ* a été introduite au niveau de l'exon 12 du locus *c-Met* (lignée *Met*^{stop-LacZ/+}), provoquant une mutation perte de fonction de ce gène (**Figure 8A**) (Lamballe et al., 2011). L'expression du gène *LacZ* intervient suite à la délétion de la cassette LoxP-Stop-LoxP, du fait de l'expression de la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur ubiquitaire *Deleter*. La révélation X-Gal de l'activité β -galactosidase des tissus des animaux de cette lignée, permet donc l'identification des cellules exprimant physiologiquement MET. L'étude du profil d'expression de MET dans les embryons hétérozygotes *Met*^{stop-LacZ/+} au stade E13.5 a révélé l'absence de cette protéine dans les mélanoblastes (**Figure 8B**). En effet, le marquage des embryons *in toto* montre la présence de cellules LacZ⁺ sous-cutanées, pouvant être les précurseurs myogéniques dont la migration embryonnaire est connue pour dépendre de la signalisation HGF/SF-MET (**Figure 8**). En revanche, nous n'observons pas de marquage ponctuel au niveau des membres, du dos, de la tête et de l'oreille, qui correspondent aux mélanoblastes, comme nous l'avons montré chez les souris *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+};*Dct::LacZ*^o à

E13.5 (Figure S2, Valluet et al., 2012). Il semble donc que le récepteur tyrosine kinase MET n'est pas exprimé dans le lignage mélanocytaire à ce stade du développement. Ceci est cohérent avec notre précédente étude montrant l'absence d'activation de la voie MAPK/ERK dans les mélanoblastes des embryons à E13.5.

Afin de comprendre quel pourrait être le rôle de la signalisation HGF/SF-MET dans les MSCs, nous nous sommes intéressés au profil d'expression de MET et de l'HGF/SF au cours du cycle du follicule pileux. Nous nous sommes particulièrement interrogés sur la potentielle activation de cette signalisation au moment de la sortie de quiescence, puisque c'est à ce moment critique que nous avons détecté un défaut du cycle cellulaire chez les MSCs *B-raf*^{-/-} *C-raf*^{-/-}. Comme nous l'avons vu précédemment, MET est présent en télogène au niveau de l'ensemble des kératinocytes du bulge et du hair germ (**Figure 7A**). De plus, le récepteur MET a été montré comme fortement exprimé lors de l'entrée en anagène dans la niche du follicule, puis dans le follicule en cours de formation (Lindner et al., 2000). Nous avons montré par des expériences d'immunohistochimie, qu'au cours de la télogène l'HGF/SF est présent au niveau des fibroblastes de la papille dermique (**Figure 9**). Au début de l'anagène, on le retrouve exprimé essentiellement dans le hair germ, où les cellules souches kératinocytaires et mélanocytaires commencent à se diviser (**Figure 9**). En anagène avancée, l'HGF/SF se retrouve de nouveau dans la papille dermique localisée dans le bulbe des follicules matures. A partir de ces observations, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'HGF/SF serait sécrété par la papille dermique, puis diffuserait jusqu'au hair germ au moment de l'initiation de l'anagène. Il serait alors responsable de l'activation des MSCs, et éventuellement des KSCs. Les KSCs pourraient elles-mêmes être à l'origine de la synthèse d'HGF/SF, qui par action paracrine pourrait activer les récepteurs tyrosine kinase MET présents à la membrane des MSCs.

III. Rôle de la signalisation HGF/SF-MET dans les MSCs contrôles et mutantes *in vitro*

III.I. Mise en culture des MSCs

Dans le but d'étudier l'implication de la voie de signalisation HGF/SF dans la survie des MSCs, nous avons cherché à mettre en place un système nous permettant de cultiver ces

cellules *in vitro*. C'est ainsi que nous avons pu établir un système de co-culture des MSCs sur une couche nourricière de kératinocytes qui permet de se rapprocher du microenvironnement de la niche. Cette méthode consiste à ensemercer immédiatement les MSCs triées par FACS sur un tapis de cellules kératinocytaires murines, qui ont été préalablement traités à la mitomycine afin de bloquer leur division cellulaire. Les cultures primaires de MSCs ainsi établies commencent à effectuer des divisions cellulaires vers le deuxième jour de culture, mais ne restent dans un état indifférencié qu'environ une semaine. Au delà, nous observons l'apparition de mélanocytes pigmentés et une forte prolifération, suggérant une perte des caractéristiques de cellules souches. Celle-ci pourrait s'expliquer par la présence de sérum de veau foetal dans le milieu de culture. En effet, la survie des kératinocytes nourriciers nécessite impérativement la présence de sérum à une concentration minimale de 2%. Dans le but d'améliorer ce système de culture, c'est-à-dire conserver à plus long terme l'identité indifférencié des cellules triées, nous avons essayé de remplacer la couche nourricière de kératinocytes par une matrice artificielle. Le test de différents composants de la matrice extracellulaire nous a permis de définir la vitronectine et la fibronectine comme étant les protéines permettant la culture des MSCs *in vitro*. Cependant, la culture des MSCs sur matrice artificielle nécessite impérativement la présence d'un milieu préalablement incubé plusieurs heures avec les kératinocytes nourriciers. En effet, en l'absence de ce milieu conditionné les MSCs meurent en quelques heures. Nous pouvons en conclure que les kératinocytes sécrètent des facteurs essentiels à la survie des MSCs.

La possibilité de cultiver *in vitro* les MSCs nous a permis de comparer le comportement des MSCs issues de peaux d'animaux contrôles à celles issues de souris mutantes. Nous avons ainsi mis en évidence des différences dans les capacités prolifératives de ces cellules selon leur génotype. Ainsi, contrairement aux MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+}, les MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-} sont incapables de se diviser *in vitro*, suggérant un défaut du processus d'auto-renouvellement de ces dernières (**Figure 10A**). Cette observation est en accord avec l'étude précédente, qui montrait un défaut de prolifération de cultures primaires de mélanocytes knock-out pour *B-raf* et *C-raf* (**Figure 4, Valluet et al. 2012**).

Dans le but d'évaluer si le récepteur MET a un rôle fonctionnel dans les MSCs, nous avons étudié l'effet d'un traitement à l'HGF/SF des cultures primaires de MSCs établies sur kératinocytes. Les MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+} traitées au HGF/SF montrent un taux de

prolifération plus élevée que celle des cellules non-traitées (**Figure 10B**). En revanche, dans toutes les cultures de MSCs *B-raf^{-/-};C-raf^{-/-}* que nous avons réalisées, le traitement à l'HGF/SF n'améliore pas la capacité de ces cellules à se diviser (**Figure 10B**). Il est vraisemblable que cette absence de réponse s'explique par l'absence d'expression du récepteur MET dans les MSCs *B-raf^{-/-};C-raf^{-/-}*. Ces résultats suggèrent que la signalisation HGF/SF-MET promeut la division cellulaire des MSCs, probablement via la voie RAF/MEK/ERK.

Le fait que les MSCs survivent en absence de kératinocytes nourriciers uniquement si le milieu a été conditionné par ceux-ci, nous a amené à nous interroger sur l'éventualité d'une sécrétion d'HGF/SF par les kératinocytes, qui serait le facteur clé de la survie des MSCs. Le fait que nous ayons observé la présence d'HGF/SF dans la niche du follicule au moment de la sortie de quiescence, renforce cette hypothèse (**Figure 9**). Nous avons donc entrepris de cultiver les MSCs *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}* sur matrice artificielle en absence de milieu conditionné, mais avec ajout d'HGF/SF au milieu. Cependant, il n'a pas été possible d'établir de cultures de MSCs dans ces conditions. En revanche, nous avons montré que le traitement des MSCs *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}* au crizotinib (inhibiteur pharmacologique de MET), alors qu'elles sont cultivées sur matrice artificielle en présence de milieu conditionné, conduit à leur disparition brutale (**Figure 10C**). Ainsi, la signalisation HGF/SF-MET joue un rôle essentiel dans la survie des MSCs *in vitro*, même si d'autres facteurs que l'HGF/SF semblent être nécessaires au maintien des MSCs.

III.2. Régulation de l'expression de *c-Met* par la voie RAF/MEK/ERK dans des lignées de mélanocytes

Nous avons par la suite cherché à valider l'hypothèse d'une régulation de l'expression du gène *c-Met* par la voie RAS/RAF/MEK/ERK *in vitro*. Cependant, la difficulté de cultiver les MSCs en grand nombre rend ardue l'analyse du niveau d'expression du transcrit et de la protéine par des techniques classiques de biologie moléculaire. Nous avons donc réalisé des expériences *in vitro* d'inhibition de la voie sur des lignées de mélanocytes établies à partir de souris sauvages et facilement amplifiables. Ces lignées ont été traitées au U0126, un inhibiteur des protéines MEK. L'analyse par RT-qPCR de l'expression du transcrit *c-Met* en réponse au traitement montre une chute rapide de celui-ci qui persiste jusqu'à 3 heures

de traitement. Au delà, le niveau du transcrit remonte rapidement (**Figure 11A**). En revanche, l'analyse par western blot révèle le maintien de la quantité de protéine MET durant tout le traitement, et ce malgré l'absence persistante de la phosphorylation de la protéine ERK qui atteste de l'inhibition totale de la voie RAF/MEK/ERK même après trois heures de traitement (**Figure 11B**). Un mécanisme indépendant de MEK conduit donc à la réexpression du transcrit *c-Met* au delà de trois heures. Le traitement au cycloheximide, antibiotique bloquant l'initiation et l'élongation de la synthèse protéique, de cette lignée de mélanocytes montrent que MET possède une stabilité importante (**Figure 11C**). Le temps de demi-vie élevé de cette protéine explique pourquoi nous n'observons aucune variation de sa quantité lors d'un traitement au U0126 de quelques heures.

Même si nous observons une diminution du transcrit *c-Met* pendant les trois premières heures de traitement au U0, sa réexpression dans les mélanocytes alors que la voie RAF/MEK/ERK est toujours inhibée indique que ce système ne reproduit pas ce qui se passe *in vivo* dans les MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-}. Ainsi, le contrôle de l'expression de *c-Met* par la voie RAF/MEK/ERK pourrait être un mécanisme spécifique des MSCs. En accord avec cette hypothèse, nous n'avons pas observé de défauts ni dans les mélanoblastes au cours du développement, ni dans les mélanocytes différenciés du bulbe chez les souris knock-out pour *B-raf* et *C-raf* (Valluet et al., 2012).

IV. Rôle de MET dans les MSCs *in vivo*

Afin de confirmer nos résultats et de démontrer formellement l'implication de *c-Met* dans l'auto-renouvellement des MSCs *in vivo*, nous avons décidé d'étudier l'effet de l'inactivation de ce gène spécifiquement dans le lignage mélanocytaire chez la souris. Pour cela, nous avons réalisé le croisement des souris *Tyr::Cre/o;mT/mG* avec une lignée *Met*^{f/f} (Huh et al., 2004). Dans l'hypothèse d'un rôle de *c-Met* dans l'auto renouvellement des MSCs, nous nous attendions à observer leur disparition dans la niche des follicules des animaux knock-out pour *c-Met*, et l'apparition d'un phénotype de hair graying semblable à celui des souris knock-out pour *B-raf* et *C-raf*. A la naissance, comme attendu, les souris ne présentent pas de défaut de la pigmentation. En revanche, nous n'avons pas observé de phénotype de hair graying après la première mue, ou au cours des cycles du poil suivant, même à la suite d'épilations successives chez les animaux hétérozygotes

Met^{fl/+};Tyr::Cre/o;mT/mG et homozygotes *Met^{fl/fl};Tyr::Cre/o;mT/mG* (**Figure 12A**). Afin de vérifier l'efficacité du défloxxage du gène *c-Met* dans les MSCs de ces souris, celles-ci ont été triées puis génotypées. Nous avons ainsi constaté que le défloxxage de *c-Met* dans ces cellules était très partiel (**Figure 12B**), ce qui pourrait expliquer l'absence de phénotype des animaux *Met^{fl/fl} Tyr::Cre/o;mT/mG*. A l'heure actuelle, il ne nous est donc pas possible de conclure quant au rôle de *c-Met* dans le maintien des MSCs dans la niche des follicules *in vivo*.

Conclusion

La purification des MSCs à partir de la peau de souris a permis la comparaison des profils d'expression génique des MSCs contrôles et délétées pour *B-raf* et *C-raf*. C'est ainsi qu'une importante diminution de l'expression du gène *c-Met* a été détectée dans les MSCs knock-out. Celle-ci a été confirmée *in vivo* par des approches d'immunohistochimie et de quantification sur coupes de peaux de souris contrôles et mutantes. La mise au point d'une technique de cultures des MSCs a permis de confirmer un rôle de la signalisation HGF/SF-MET dans l'homéostasie des MSCs. Ainsi, le traitement au HGF/SF des MSCs contrôles favorise leur division, tandis que l'inhibition pharmacologique de MET provoque leur disparition. Ces données plaident en faveur de l'hypothèse d'une régulation de MET par la voie RAF/MEK/ERK dans les MSCs, qui permettrait leur maintien. De plus, des expériences d'inhibition de la voie RAF/MEK/ERK dans des mélanocytes suggèrent que cette régulation est restreinte aux seules MSCs. Cependant, nous n'avons pas encore pu confirmer par une approche génétique *in vivo* le rôle du récepteur tyrosine kinase MET dans le maintien des MSCs dans la niche du follicule pileux des souris.

Figure 1. Les souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f}; Tyr::Cre/o; Z/EG* développent un phénotype de hair graying consécutif à la disparition des MSCs.

(A) Photo de souris *B-raf^{f/+};C-raf^{f/+}; Tyr::Cre/o; Z/EG* et *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f}; Tyr::Cre/o; Z/EG* à un an. Les souris délétées pour *B-raf* et *C-raf* ont un pelage gris résultant du remplacement des poils noirs par des poils non pigmentés.

(B) Coupe histologique de peaux de souris *B-raf^{f/+};C-raf^{f/+}; Tyr::Cre/o; Z/EG* et *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f}; Tyr::Cre/o; Z/EG* à un an. Des MSCs GFP positives, indiquées par des flèches blanches, sont visibles dans la niche des follicules de souris contrôles. En revanche, aucune MSCs n'est visible dans le bulge ou le hair germ des souris mutantes. BG: bulge, DP: papille dermique, HG: hair germ.

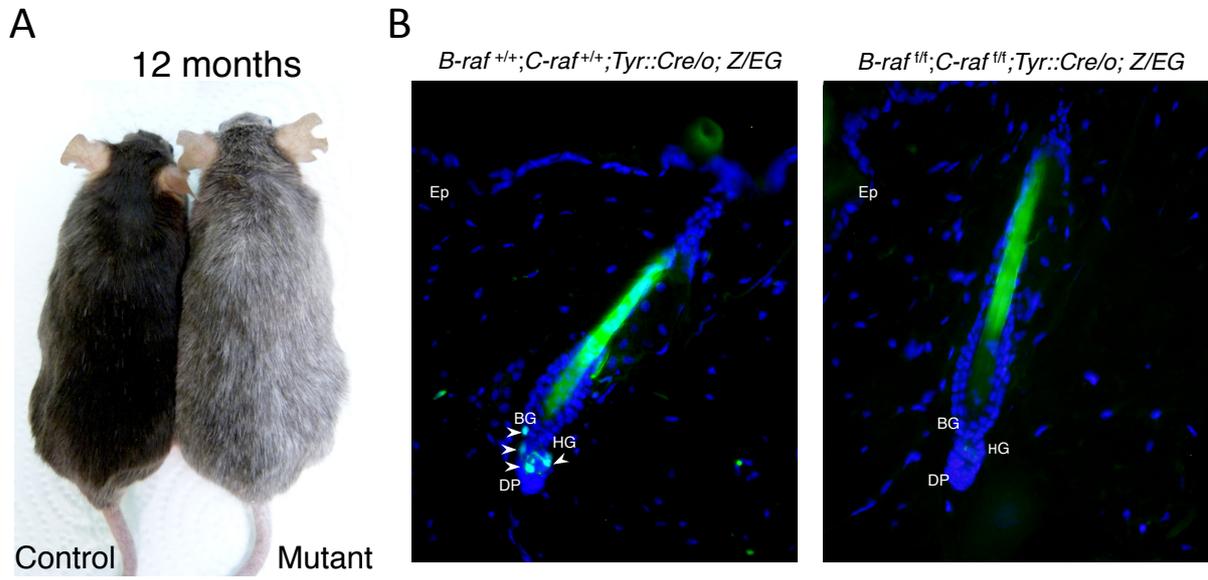


Figure 1

Figure 2. Purification des MSCs à partir de la peau de souris *Tyr::Cre/o; mT/mG*

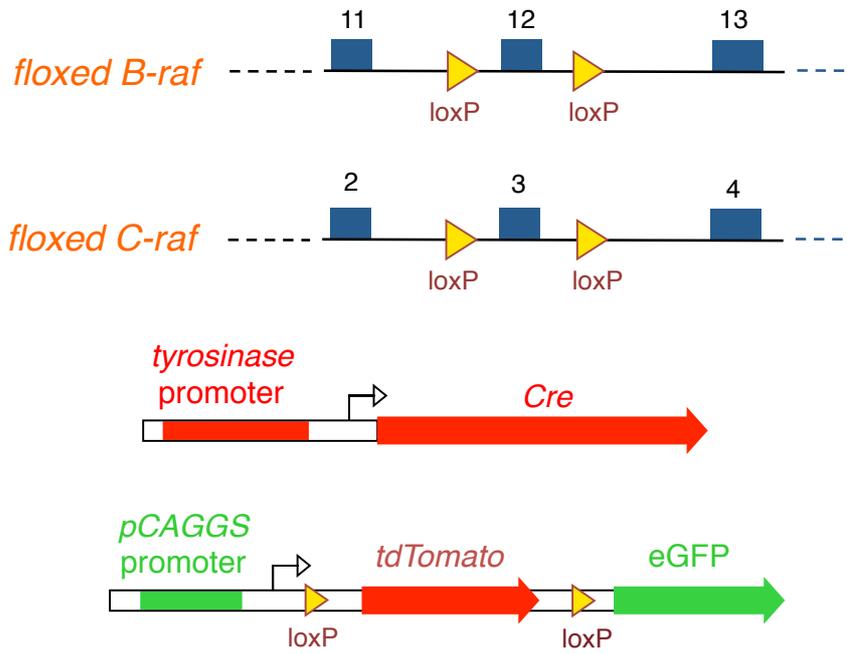
(A) Représentation schématique du génotype des souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f}; Tyr::Cre/o;mT/mG*. Les souris expriment de manière ubiquitaire la tdTomato grâce au transgène présent au locus Rosa26. Suite à l'action de la Cre dans les cellules du lignage mélanocytaire, les cellules expriment la GFP et les gènes *B-raf* et *C-raf* sont recombinés, conduisant à leur perte de fonction.

(B) Coupe histologique d'un follicule pileux de souris *B-raf^{f/+};C-raf^{f/+}; Tyr::Cre/o; mT/mG*. Les MSCs GFP positives sont indiquées par les flèches blanches. Les cellules de Schwann terminales de type II sont indiquées par les flèches bleues. BG: bulge, DP: papille dermique, HG: hair germ.

(C) Représentation de la population de MSCs (GFP+/tdTomato-/p75NGF-) isolée par FACS à partir de la peau d'une souris *B-raf^{f/+};C-raf^{f/+}; Tyr::Cre/o; mT/mG*. La population de MSCs issues de la peau d'une souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f}; Tyr::Cre/o;mT/mG* présente le même profil.

(D) Génotypage pour *B-raf* et *C-raf* de la population de MSCs purifiée à partir de peaux de souris *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f}; Tyr::Cre/o;mT/mG*. F: produit PCR correspondant à l'allèle floxé *B-raf* ou *C-raf*, Δ: produit PCR correspondant à l'allèle recombiné *B-raf* ou *C-raf*.

?



?

?

?

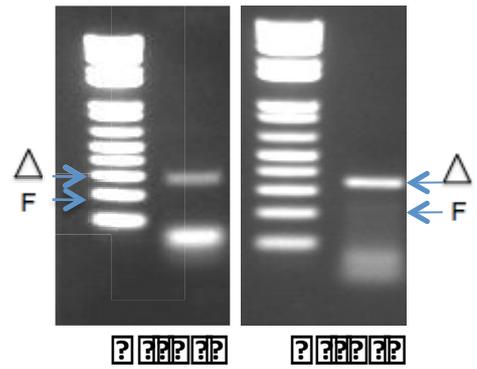
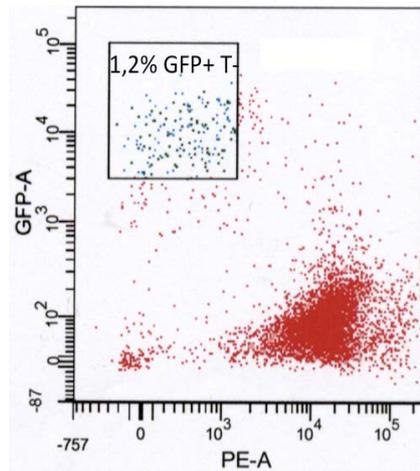
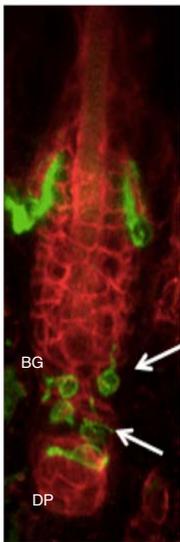


Figure 2

Figure 3. Les cellules isolées par FACS expriment des gènes spécifiques du lignage mélanocytaire.

Analyse par RT-qPCR du niveau d'expression des gènes *c-Kit*, *Dct* et *Tyrosinase* dans les populations GFP+/Tom-/p75NGF- isolées à partir des peaux d'animaux *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+};Tyr::Cre/o*; mT/mG âgées de 4 jours (tri de mélanoblastes *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}*) et de 21 jours (tri de MSCs *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}*). * p-value < à 0,5.

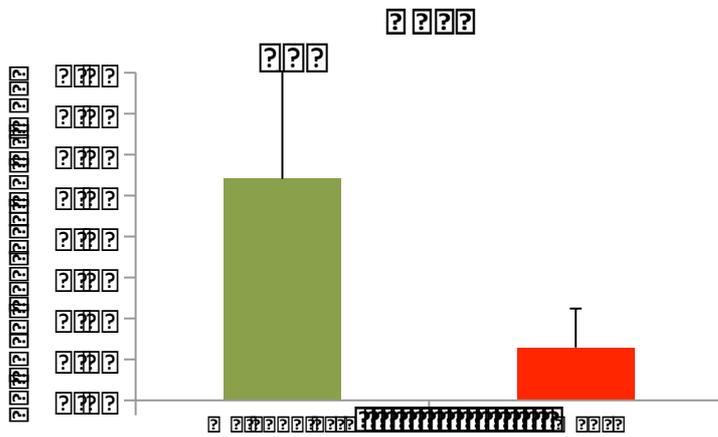
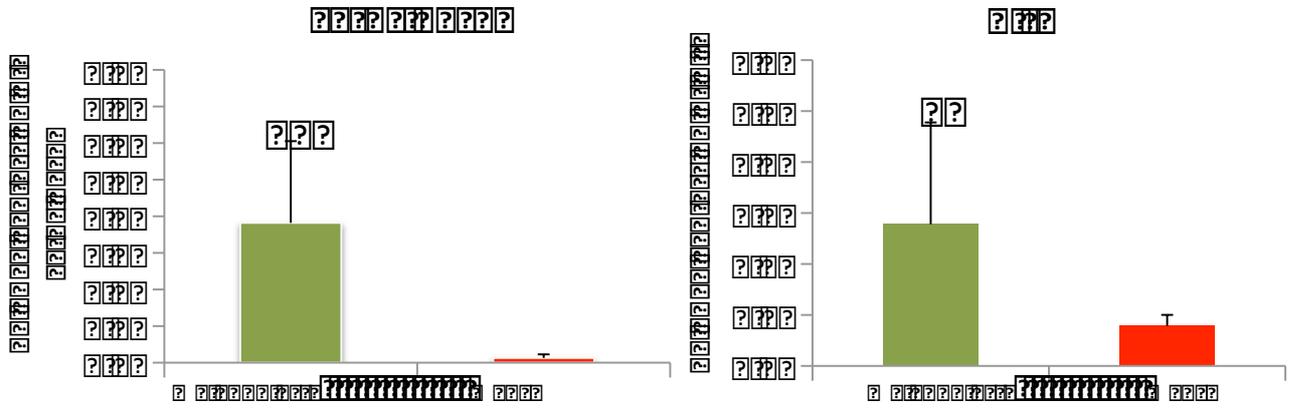


Figure 3

Figure 4. Représentation en heat map des analyses transcriptomiques

(A) Représentation en heat map de l'analyse transcriptomique supervisée des MSCs *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}* et des mélanoblastes *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}*. Les MSCs *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}* sont issues de peaux d'animaux *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}; Tyr::Cre/o; mT/mG* âgés de 21 jours, tandis que les mélanoblastes *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}* sont issues des animaux du même génotype mais âgés de 4 jours. Echelle de couleur: pour chaque gène, la couleur est d'autant plus rouge qu'il est relativement fortement exprimé dans l'échantillon.

(B) Représentation en heat map de l'analyse transcriptomique supervisée des MSCs *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}* et des MSCs *B-raf^{-/-};C-raf^{-/-}*. Les MSCs *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}* sont issues de peaux d'animaux *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+}; Tyr::Cre/o; mT/mG* âgés de 21 jours. Les MSCs *B-raf^{-/-};C-raf^{-/-}* sont issues de peaux d'animaux *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f}; Tyr::Cre/o; mT/mG* âgés de 21 jours. Echelle de couleur: pour chaque gène, la couleur est d'autant plus rouge qu'il est relativement fortement exprimé dans l'échantillon.

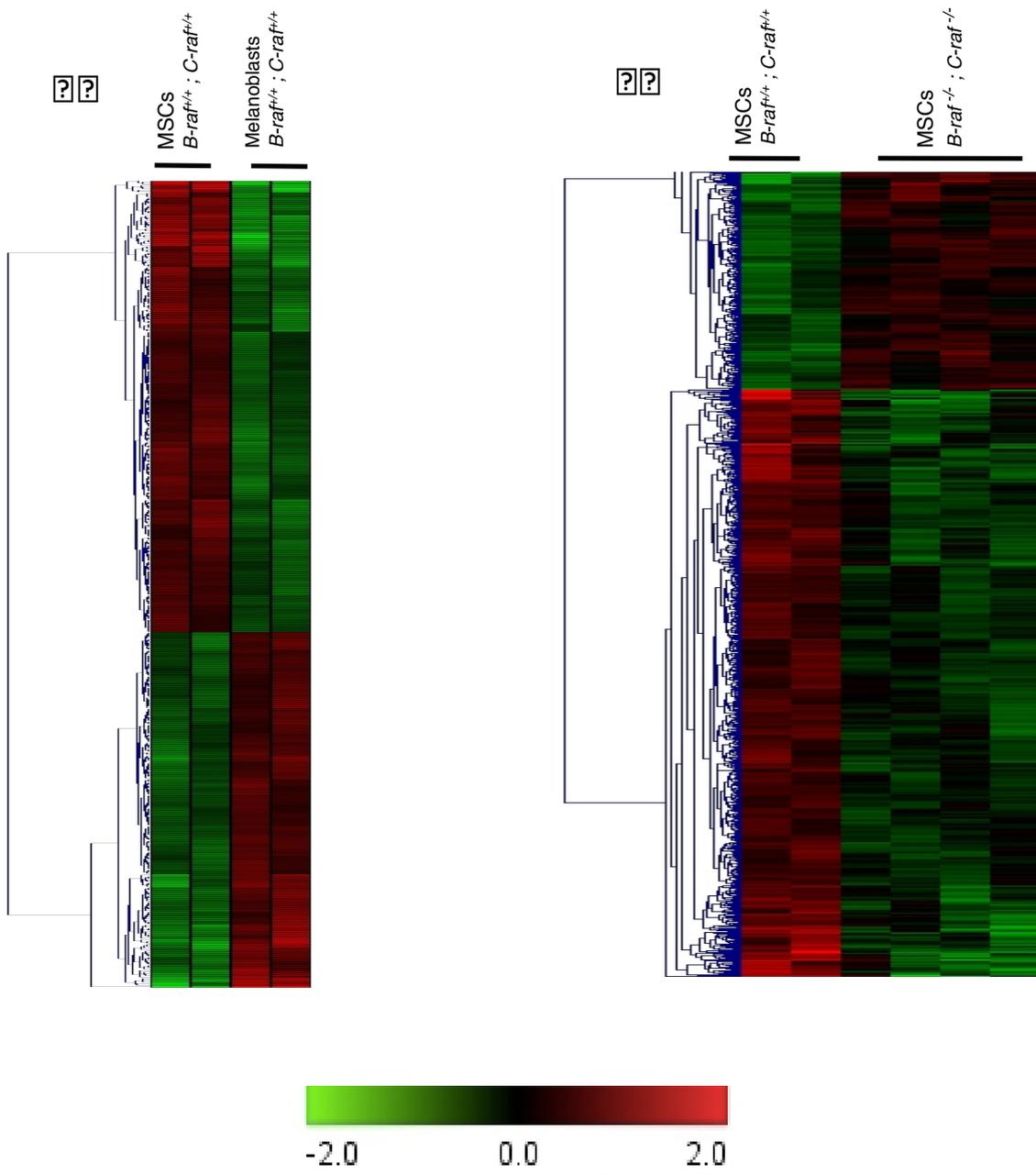


Figure 4

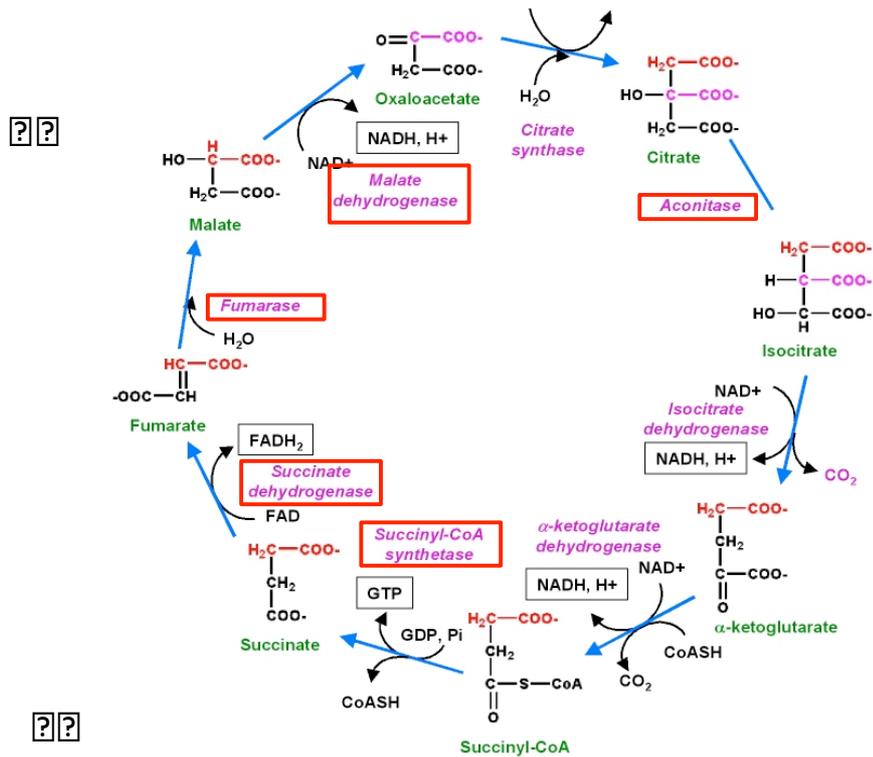
Figure 5. L'analyse transcriptomique révèle une signature métabolique différente dans les MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+} et les mélanoblastes *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+}

(A) Schéma du cycle de Krebs. Les protéines du cycle dont les gènes sont relativement moins exprimés chez les MSCs par rapport aux mélanoblastes, selon l'analyse transcriptomique, sont encadrées en rouge.

(adapté de chemwiki.ucdavis.edu)

(B) Tableau montrant l'ensemble des gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire qui sont significativement moins exprimés dans les MSCs comparativement aux mélanoblastes, d'après les données de l'analyse transcriptomique.

(adapté de cours-pharmacie.com)



Complex	Symbol	Name
I	Ndufb7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7
	Ndufa6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6 (B14)
	Ndufs1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1
	Ndufb6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6
	Ndufs6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6
	Ndufb8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 8
	Ndufb5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5
	Ndufa11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 11
	II	Sdhb
Sdhb		Succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip)
III	Uqcrc	Ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII
	Uqcr10	Ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit X
	Uqcrc2	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2
IV	Cox5a	Cytochrome c oxidase subunit Va
	Cox6c	Cytochrome c oxidase subunit Vic
	Cox5b	Cytochrome c oxidase subunit Vb
V	Atp5g3	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C3 (subunit 9)
	Atp5c1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1
	Atp6ap1	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 1
	Atp6v1g1	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit G1
	Atp6v0d1	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit D1

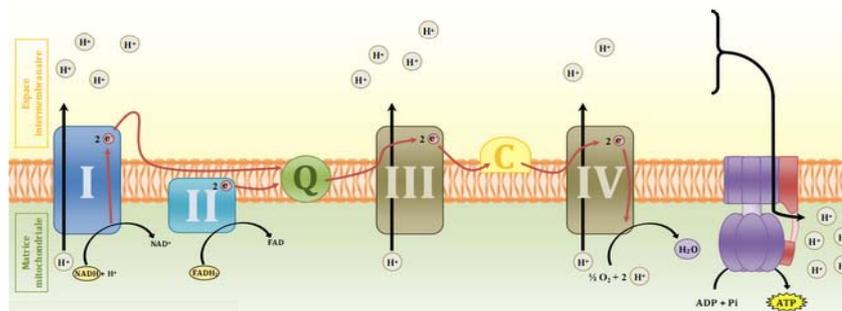


Figure 5

Figure 6. Diminution de l'expression du gène *c-Met* dans les MSCs des souris knock-out pour *B-raf* et *C-raf*

Analyse par RT-qPCR du niveau d'expression du gène *c-Met* dans les MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+} (WT) et les MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-} (KO), n=10 animaux pour chaque génotype. La normalisation a été réalisée sur trois gènes de ménages différents: *Hprt*, *B2m*, *Gapdh*. ** p-value < à 0.01.

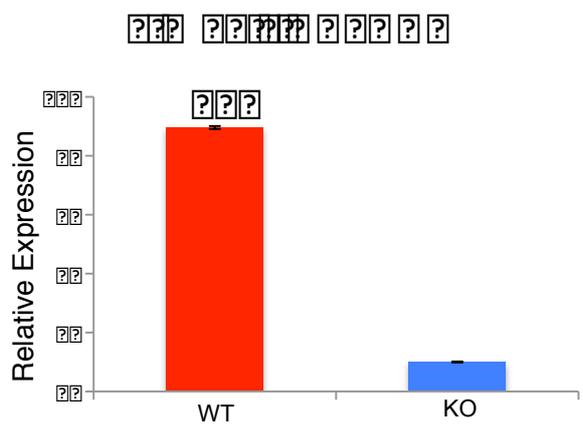
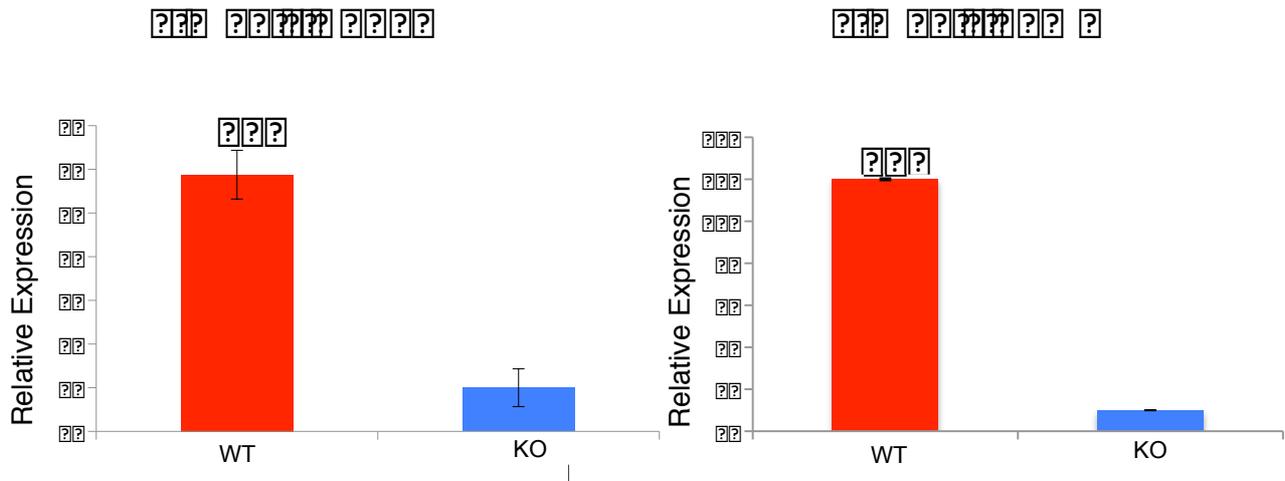


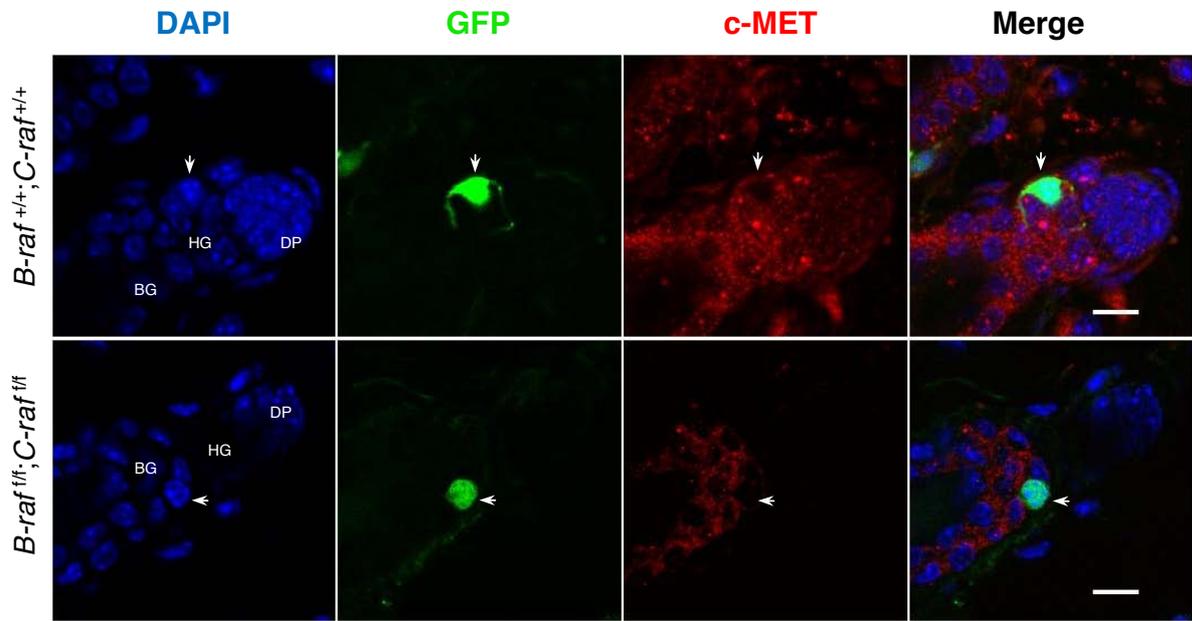
Figure 6

Figure 7. Diminution du récepteur MET à la membrane des MSCs knock-out pour *B-raf* et *C-raf*

(A) Immunohistochimies anti-MET réalisées sur des coupes de peaux issues d'animaux *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+};*Tyr::Cre/o;mT/mG* et *B-raf*^{f/f};*C-raf*^{f/f};*Tyr::Cre/o;mT/mG* âgées de 21 jours (stade de la télogène). Les MSCs GFP positives sont indiquées par les flèches blanches. La protéine MET est visible à la membrane des MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+} (en rouge), mais pas à celle des MSCs *B-raf*^{f/f};*C-raf*^{f/f}. BG: bulge, DP: papille dermique, HG: hair germ. La barre d'échelle correspond à 10µm.

(B) Quantification du pourcentage de MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+}(WT) et de MSCs *B-raf*^{f/f};*C-raf*^{f/f}(KO) positives ou négatives pour MET. Les MSCs ont été comptées sur des coupes de peaux d'animaux *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+};*Tyr::Cre/o;mT/mG* (WT) et *B-raf*^{f/f};*C-raf*^{f/f};*Tyr::Cre/o;mT/mG* (KO) marquées pour MET par immunohistochimie. * p-value < à 0,5.

?



??

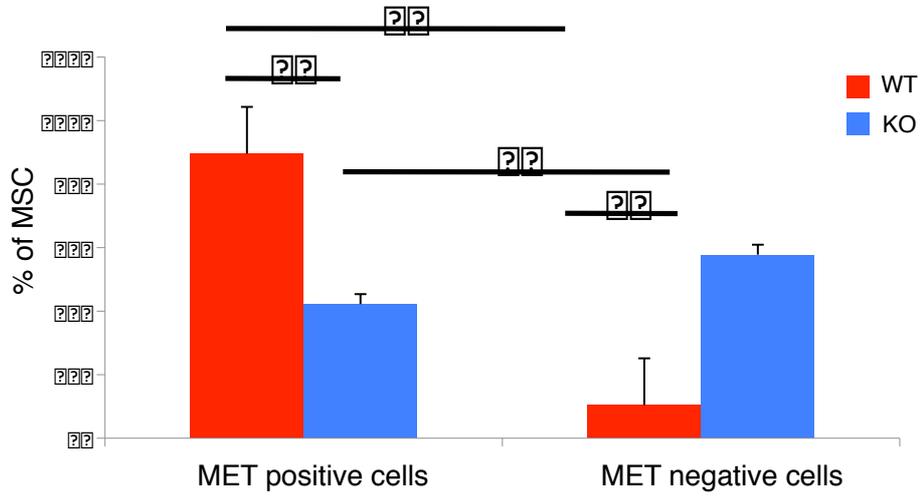


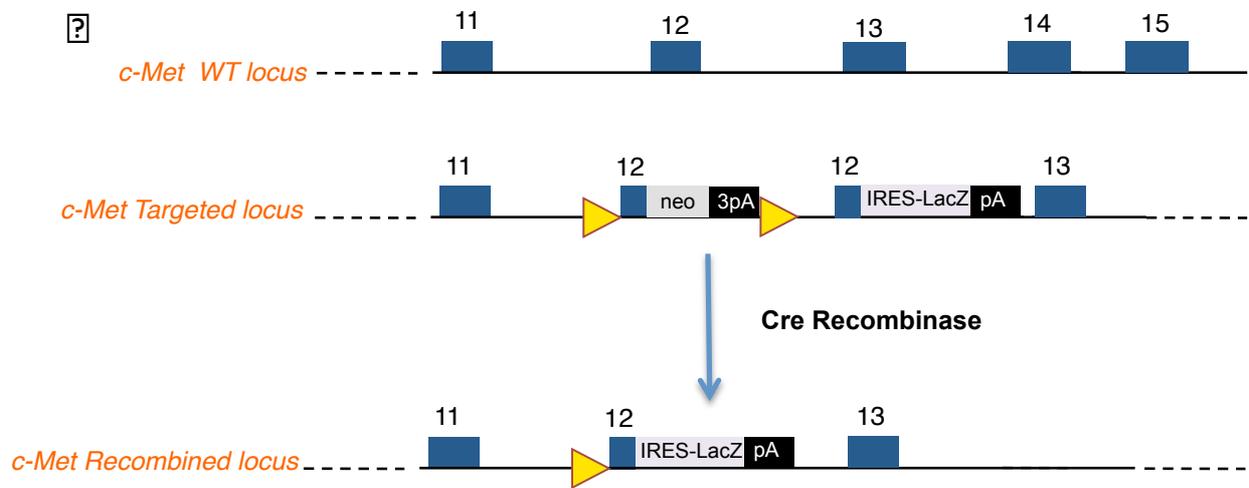
Figure 7

Figure 8. Le récepteur MET n'est pas présent dans les mélanoblastes au stade E13.5

(A) Représentation schématique de la stratégie utilisée pour obtenir les embryons *Met^{LacZ/+}*.

L'insertion d'une cassette stop suivie du gène rapporteur LacZ au locus de *c-Met* provoque une perte de fonction de ce gène. L'expression du gène LacZ fait suite à l'excision de la cassette loxP-neo-stop, ce qui permet le marquage des cellules MET positives. La cassette neo est formée par le gène Neomycin suivi de trois copies du signal de polyadénylation SV40 (3pA). Dans notre modèle, la Cre est exprimée sous le contrôle du promoteur d'un gène ubiquitaire.

(B) Révélation X-Gal *in toto* de l'activité β -galactosidase d'embryons *Met^{stop-LacZ/+}* au stade E13.5. Le marquage X-Gal montre l'expression physiologique du récepteur MET. Les flèches noires indiquent les localisations des mélanoblastes à ce stade du développement: oreilles, tête, membres, dos.



??

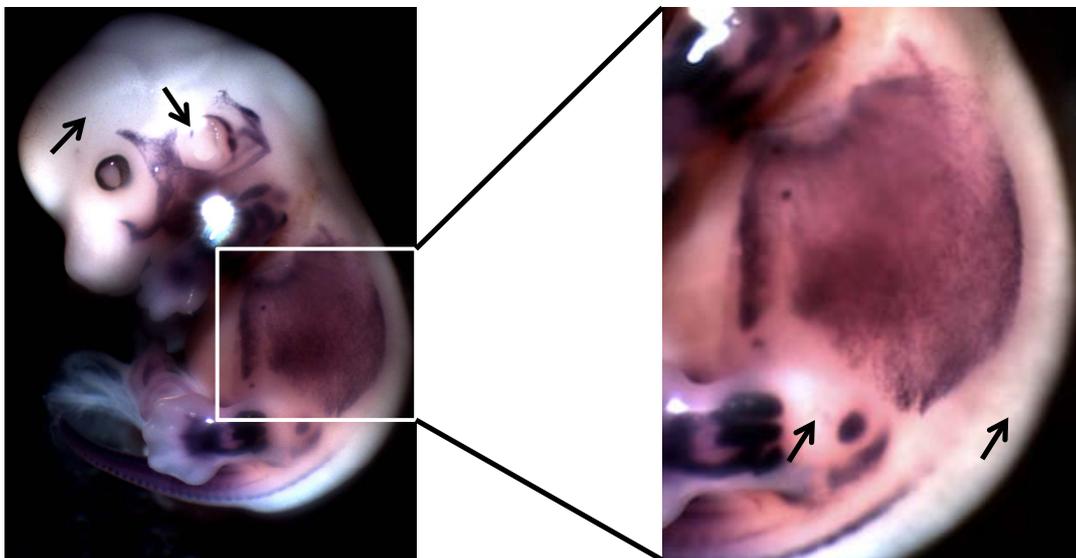


Figure 8

Figure 9. Expression du ligand HGF/SF au cours du cycle du follicule pileux

Immunohistochimies anti-HGF/SF réalisées sur des coupes de peaux issues d'animaux *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+};Tyr::Cre/o;mT/mG* et *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o;mT/mG* montrant la localisation de l'HGF/SF au cours du cycle du poil. Les flèches blanches indiquent le signal HGF/SF le plus fort.

Lors de la télogène, l'HGF/SF est localisé au niveau de la papille dermique. Au démarrage de l'anagène, le ligand de MET est retrouvé au niveau du hair germ, là où les cellules souches kératinocytaires et mélanocytaires commencent à proliférer. Par la suite, lorsque le follicule grandit pour créer sa partie transitoire avec à sa base le bulbe, l'HGF/SF se localise au niveau de la papille dermique, au contact de la matrice contenant les mélanocytes et les kératinocytes en prolifération. BG: bulge, DP: papille dermique, HG: hair germ, MA: matrice, ORS: outer root sheath. La barre d'échelle correspond à 10µm.

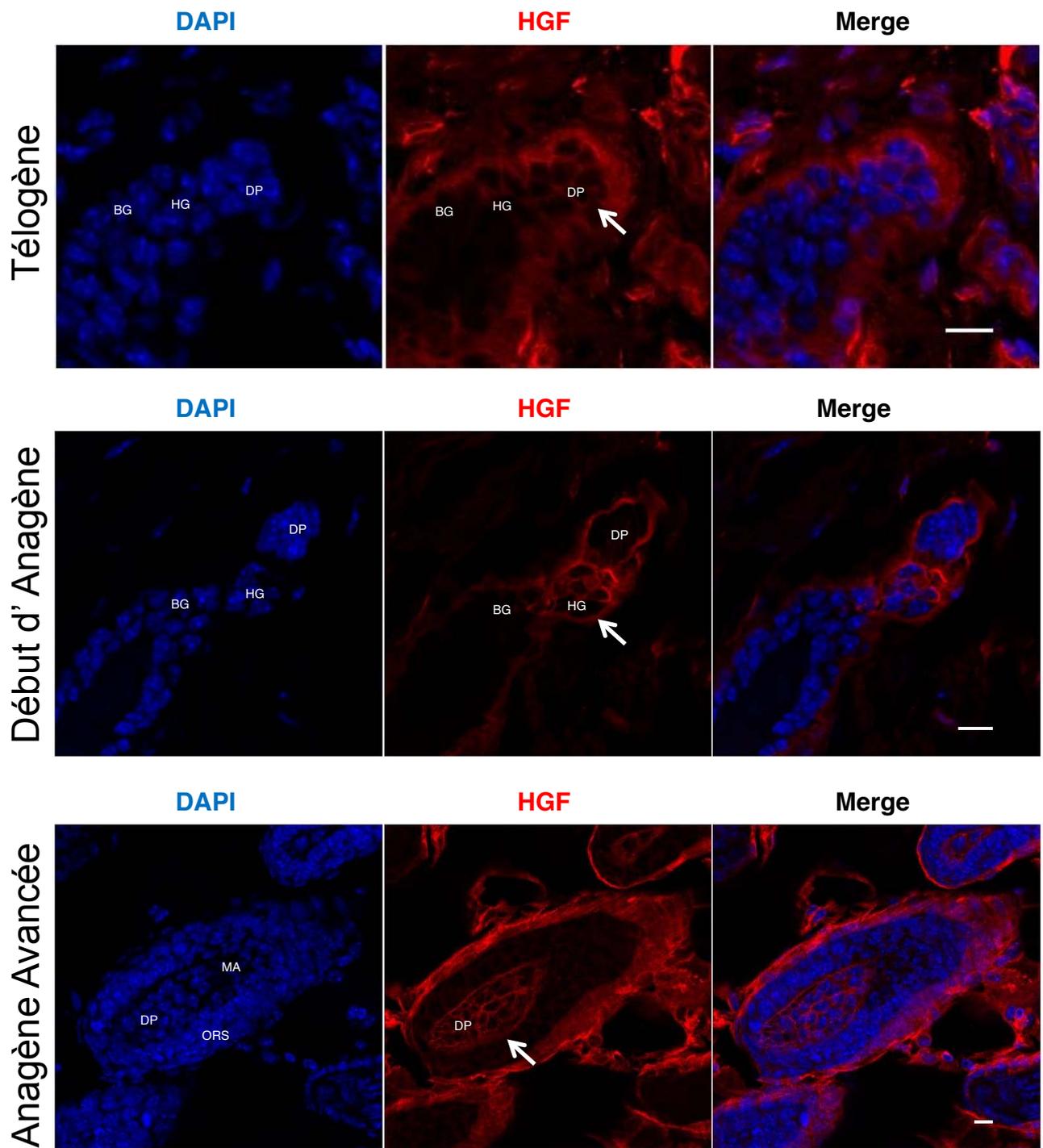


Figure 9

Figure 10. Implication de la signalisation HGF/SF-MET dans le maintien et la division des MSCs *in vitro*

(A) Courbes de croissance des MSCs purifiées à partir d'animaux *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+};Tyr::Cre/o;mT/mG* et *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o;mT/mG*. Les MSCs sont cultivées sur une couche de kératinocytes nourriciers traités à la mitomycine. Deux cultures réalisées indépendamment sont représentées.

(B) Courbe de croissance des MSCs purifiées à partir d'animaux *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+};Tyr::Cre/o;mT/mG* et *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o;mT/mG* traitées ou non au HGF/SF (10ng/mL). Les MSCs sont cultivées sur une couche de kératinocytes nourriciers traités à la mitomycine. Deux cultures réalisées indépendamment sont représentées pour chaque génotype.

(C) Courbe de croissance des MSCs purifiées à partir d'animaux *B-raf^{+/+};C-raf^{+/+};Tyr::Cre/o;mT/mG* traitées au HGF (10ng/mL), au Crizotinib (10ng/mL) ou non-traitées (control). Les MSCs sont cultivées sur une matrice de vitronectine en présence de milieu préalablement incubé avec des kératinocytes pendant plusieurs heures. Deux cultures réalisées indépendamment sont représentées.

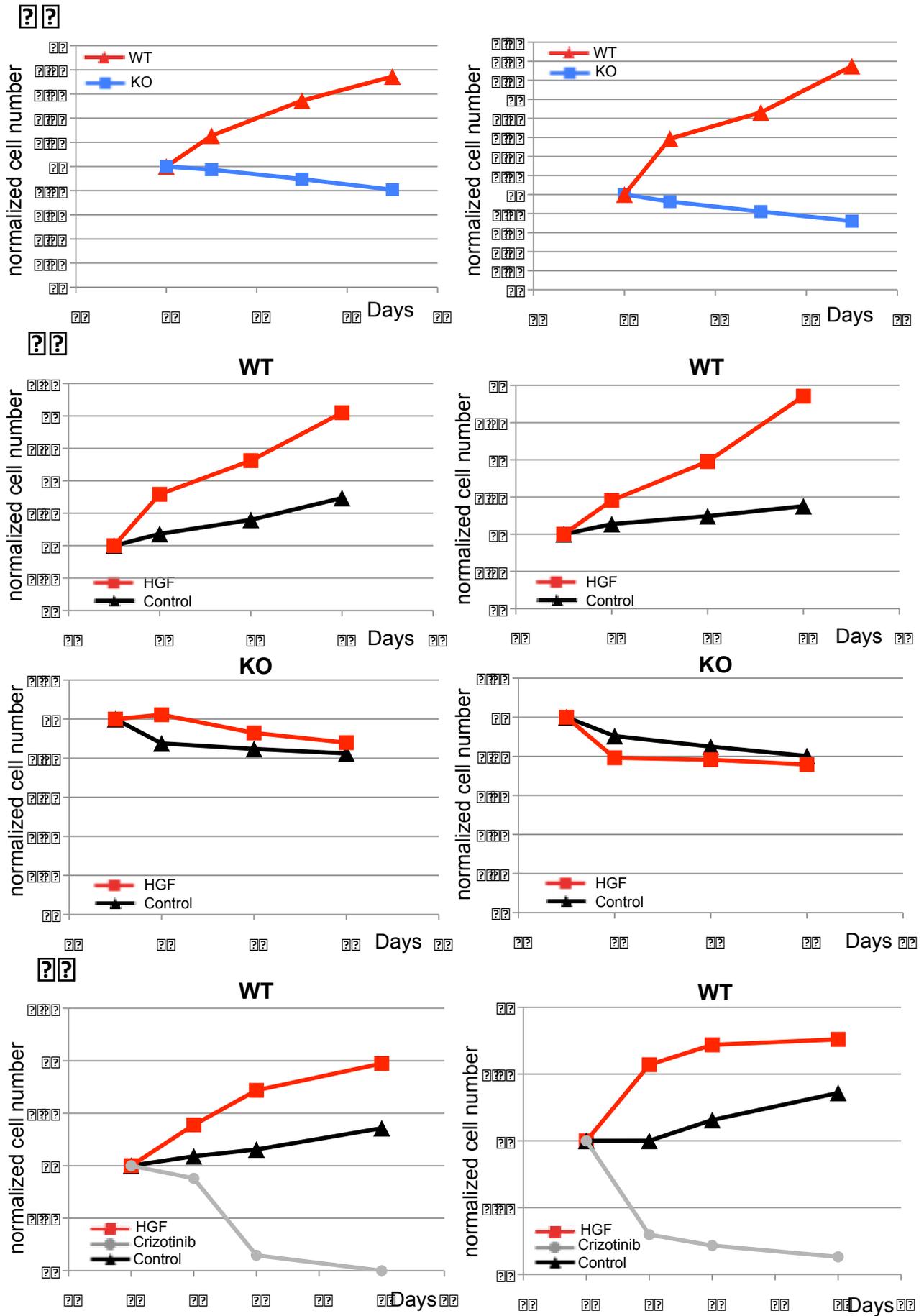


Figure 10

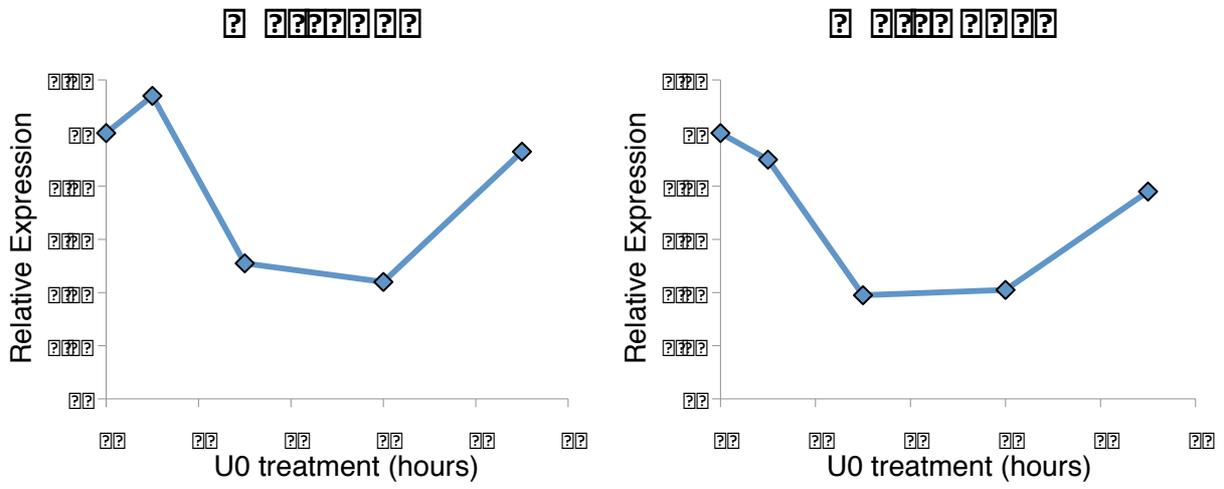
Figure 11. Régulation du transcrit *c-Met* par la voie RAS/RAF/MEK/ERK dans une lignée de mélanocytes *in vitro*.

(A) Analyse par RT-qPCR de la quantité relative de transcrit *c-Met* au cours du temps dans une lignée immortalisée de mélanocytes sauvages traités au U0126.

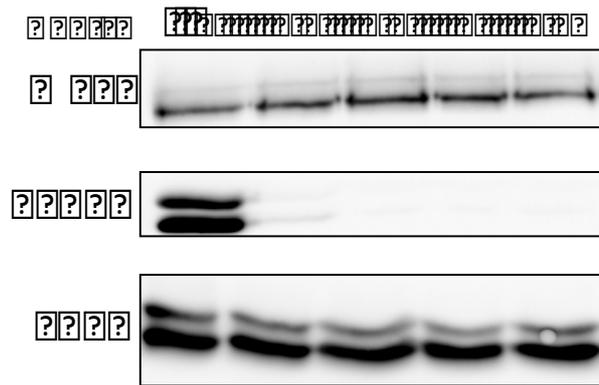
(B) Analyse par western-blot de l'expression des protéines MET, ERK et du niveau de phosphorylation de ERK dans une lignée immortalisée de mélanocytes sauvages traités au U0126.

(C) Analyse par western-blot du niveau d'expression de la protéine MET dans une lignée immortalisée de mélanocytes sauvages traités au cycloheximide. Le niveau d'expression de l'actine est utilisé comme témoin de charge.

??



??



??

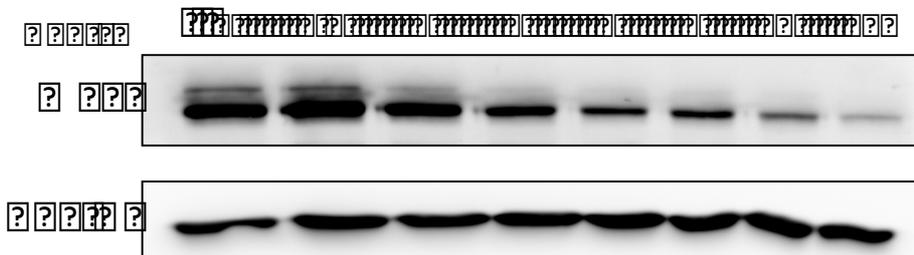


Figure 11

Figure 12. Etude du phénotype des souris *Met^{f/f};Tyr::Cre/o;mT/mG*

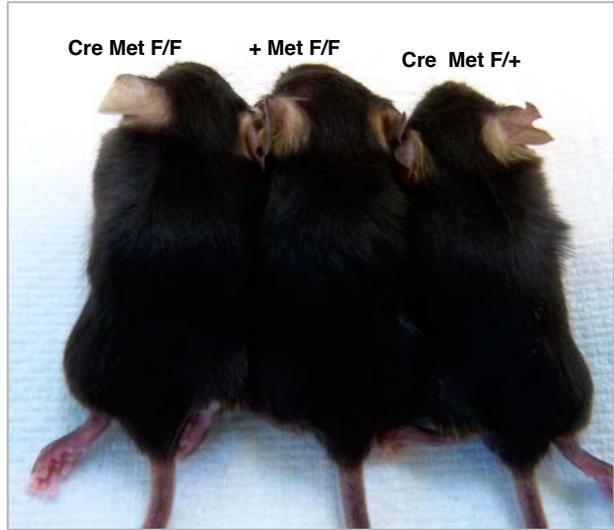
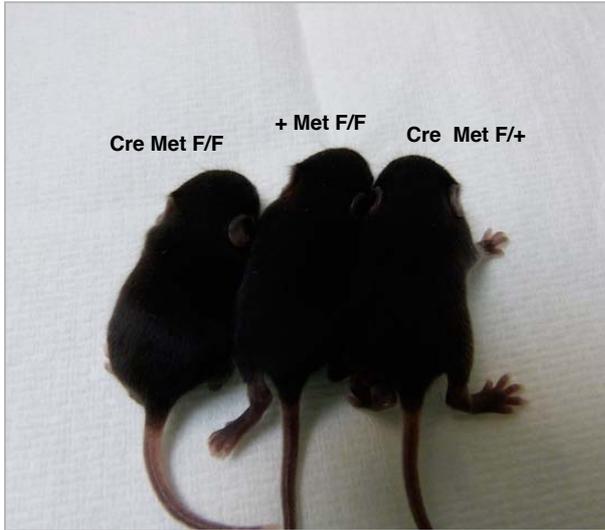
(A) Les souris homozygotes *Met^{f/f};Tyr::Cre/o;mT/mG* et les souris hétérozygotes *Met^{f/+};Tyr::Cre/o;mT/mG* ne montrent aucun défaut de pigmentation à 10 jours, 21 jours ou après épilations. La souris *Met^{f/+};+/o;mT/mG* est utilisé comme contrôle.

(B) Génotypage de la population de MSCs purifiée à partir de la peau d'un animal hétérozygote *Met^{f/+};Tyr::Cre/o;mT/mG*. Deux PCR ont été réalisées: l'une fait apparaître l'allèle *Met* floxé et l'allèle sauvage, la seconde permet la visualisation de l'allèle après recombinaison par la Cre. F: allèle floxé, WT: allèle sauvage, Δ: allèle défloqué. La présence résiduelle de l'allèle floxé dans les MSCs indique que le défloqué n'est pas total.



J10

J21



7 semaines – Après une épilation

20 semaines – Après 4 épilations

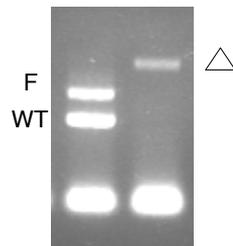
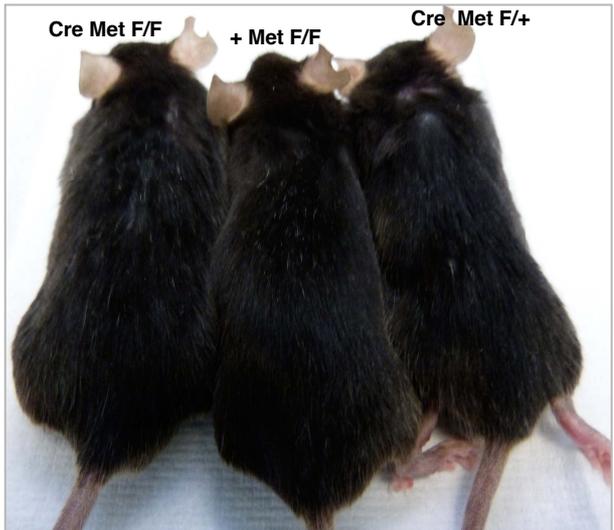


Figure 12

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Lignées de Souris

La lignée *B-raf^{f/f};C-raf^{f/f};Tyr::Cre/o*, préalablement décrite (Valluet et al., 2012), a été croisée avec la lignée double rapportrice *Z/EG* (Novak et al., 2000) ou *mT/mG* (Muzumdar et al., 2007). Les souris *B-raf^{f/+};C-raf^{f/+};Tyr::Cre/o* ont été utilisées comme contrôles.

La lignée *Met^{f/f}* (Huh et al., 2004) a été croisée avec les lignées *Tyr::Cre/o* (Delmas et al., 2003) et *mT/mG* (Muzumdar et al., 2007). Les animaux *Met^{f/+};Tyr::Cre/o;mT/mG* ont été utilisés comme contrôles.

Le transgène *Tyr::Cre* étant localisé sur le chromosome X, seuls les mâles ont été utilisés pour les expériences. Les souris sont maintenues sur un fond mixte C57/Bl6-129SV. Les souris au pelage noir ont été sélectionnées afin de mieux visualiser le phénotype de hair graying.

Toutes les expériences ont été réalisées en conformation avec les directives de l'Union Européenne (86/609/EEC) et celles du Comité National Français pour l'Expérimentation Animale (87/848).

Protocole de purification des MSCs et des mélanoblastes

La peau de souris âgées de 21 jours (stade télogène), ou de quatre jours (stade anagène), est entièrement prélevée puis disséquée pour retirer les vaisseaux sanguins et le tissu graisseux. La peau est détaillée en morceaux d'environ 5mm sur 5mm. Ces fragments sont incubés dans une solution de dissociation (HBSS 1X (Hank's balanced salt solution), Dispase (25mg/mL, Invitrogen), CollagénaseIV (25mg/mL, Invitrogen)) pendant 2h (peau à P21) ou 1h (peau à P4) à 37°C. La suspension de peau est passée à travers une aiguille 18G, filtrée sur tamis de 40µm et mélangée (1:1) avec une solution de FACS Buffer (RPMI (Gibco/Invitrogen), 5% FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma), 200mM EDTA) à 4°C. Le mélange est centrifugé (1300rpm pendant 4min à 4°C) puis le culot est repris dans 1mL de la solution FACS Buffer. La solution est incubée avec un anticorps anti-p75NGF rabbit (1/500; Abcam,) à 4°C pendant 1h. Après lavage dans la solution de FACS Buffer, la solution est incubée avec l'anticorps secondaire Alexa 10Fluor® 647 anti-rabbit pendant 30min à 4°C.

Après lavage et filtration, les cellules GFP+ Tomato- p75NGF- sont isolées par FACS à l'aide d'un FACS Calibur Cytometer (BD biosciences).

Culture des MSCs

Les MSCs isolées par FACS sont ensemencées en plaque 96 puits sur un tapis de cellules kératinocytaires. Les kératinocytes nourriciers appartiennent à une lignée immortalisée de kératinocytes sauvages de souris (XB2). Avant l'ensemencement des MSCs, les kératinocytes sont traités à la mitomycine C (4µg/ml; Sigma) pendant 3h à 37°C, afin de bloquer leur prolifération. Les MSCs sur kératinocytes sont cultivées en présence de milieu RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) contenant 5% FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin. En absence de kératinocytes, les MSCs sont ensemencées sur une matrice de vitronectine (Sigma), avec du milieu RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen), 5% FBS conditionné une nuit en présence des kératinocytes XB2. Les cellules ont éventuellement été traitées à l'HGF/SF (40ng/mL, R&D) ou au Crizotinib (5µg/mL, Clinisciences). Le traitement démarre le lendemain de la mise en culture et le milieu est changé chaque jour. Le comptage a été réalisé à partir de photos du puits en entier et analysés à l'aide du logiciel ImageJ.

Préparation de cDNA et RT-qPCR à partir des MSCs

Les ARN totaux issus des MSCs ont été extraits, rétro-transcrits en cDNA, et amplifiés grâce au kit Ovation Pico SL (Nugen). Les cDNA ainsi obtenus ont été hybridés sur puces Affymetrix Mogene 2.1 ou utilisés pour des expériences de RT-qPCR. Les ARN totaux issus des mélanocytes en culture ont été extraits à l'aide du kit RNAeasy Mini Kit (Quiagen), et rétro-transcrits grâce au kit Cloned-AMV (Invitrogen). Les RT-qPCR ont été réalisées en utilisant le SYBR Green real-time PCR Master Mix (Invitrogen) .

IHC sur peaux de souris:

Les peaux de souris ont été prélevées puis fixées dans une solution PBS-formaldehyde 4% pendant une nuit. Après une incubation de deux jours dans du sucrose 30%, elles ont été incluses dans l'OCT (Tissu OCT, LaboNord). Les coupes (8µm) sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica), puis lavées dans une solution PBST (PBS 1X, 0,1% Tween20). Pour le

marquage HGF/SF, les coupes subissent un démasquage antigénique par chauffage 20min dans une solution 10mM sodium citrate. Les coupes (démasquées ou non) sont traitées 1h à température ambiante dans une solution de PBST-10% Goat Serum (Sigma), puis incubées dans la même solution de blocage à 4°C une nuit entière en présence des anticorps primaires: rabbit anti-MET (1/200, Santa Cruz), Rabbit anti-HGF (1/500, Santa Cruz), Chicken anti-GFP (1/300, Abcam). Les coupes sont rincées dans la solution de PBST puis incubées 1h à température ambiante en présence des anticorps secondaires (1/300): Alexa 10Fluor® 488 anti-chicken, 594 anti-rabbit. Les coupes sont montées dans le milieu de montage Fluoroshield with Dapi (Sigma).

Acquisition et analyse des images

Les images ont été acquises sur la plateforme d'imagerie de l'Institut Curie PICT-IBiSA, avec un microscope confocal (Leica SP5) équipé d'un objectif 40x/1,25, et ont ensuite été analysées avec le logiciel ImageJ.

Culture cellulaire

Les mélanocytes immortalisés sont cultivés dans le milieu HAM F-12 (Gibco, Invitrogen) contenant 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin et 2mM L-glutamine (Invitrogen). L'inhibiteur U0126 MEK (Sigma) a été utilisé à la concentration de 10µM. Les extraits cellulaires ont été préparés à l'aide d'une solution de lyse (Tris 20mM pH7.4, NaCl 100mM, Triton X100 0.5%, protease and phosphatase inhibitors).

Western Blot

Les expériences de western blot ont été conduites selon le protocole précédemment décrit par (Valluet et al., 2012). Les membranes ont été incubées avec les anticorps anti-MET (1/200, Santa Cruz), anti-pERK (1/2000, Sigma), anti-ERK (1/2000, Santa Cruz) et anti-βactin (1/5000, Sigma).

DISCUSSION

Des mutations touchant les gènes *NRAS* et *BRAF*, appartenant à la voie RAS/RAF/MEK/ERK, sont fréquemment retrouvées dès les étapes précoces de la carcinogénèse des mélanomes cutanés. Ces mutations sont ainsi retrouvées dans les cellules à l'origine du mélanome (tumor initiating cells, parfois appelées cancer stem cells), qui partagent de nombreuses similitudes avec les MSCs. En effet, ces deux types cellulaires possèdent notamment un très faible taux de prolifération et une capacité d'auto-renouvellement. Paradoxalement, malgré la connaissance de plus en plus précise du rôle de la voie RAS/RAF/MEK/ERK dans le mélanome, son rôle physiologique dans le développement du lignage mélanocytaire et dans l'homéostasie des MSCs est toujours mal connu.

Le travail que j'ai mené au cours de mon doctorat avait pour objectif de contribuer à une meilleure compréhension du rôle des kinases B-RAF et C-RAF dans la régulation du lignage mélanocytaire de la souris. Je me suis plus particulièrement intéressée à leur fonction dans le processus d'auto-renouvellement des MSCs, grâce à l'utilisation de souris invalidées pour ces deux kinases.

Dans cette dernière partie, nous discuterons des résultats obtenus, et proposerons des perspectives permettant de mieux comprendre le rôle des kinases RAF et MET dans la régulation de l'homéostasie des MSCs au sein de la niche des follicules pileux de souris.

La délétion de *B-raf* et *C-raf* entraîne une disparition des MSCs

Les souris *BRaf^{fl/fl};CRaf^{fl/fl};Tyr::Cre/o* générées au laboratoire ne présentent pas de défaut de pigmentation du pelage, que ce soit à la naissance ou au cours des premières semaines de vie. Cependant, après la première mue (21 jours après la naissance), les poils noirs sont progressivement remplacés par des poils dépourvus de pigmentation, donnant une apparence grise au pelage des souris double knock-out. Ce phénotype, désigné sous le nom de hair graying, s'accroît avec l'âge des animaux ou suite à des épilations successives qui forcent la régénération des poils. Nous avons montré que ce phénotype était dû à un épuisement des MSCs localisées dans la niche des follicules pileux. En effet, ces cellules sont absentes des follicules des souris *BRaf^{fl/fl};CRaf^{fl/fl};Tyr::Cre/o* âgées d'un an, ou ayant été

épilées à plusieurs reprises. Au cours de l'anagène, une partie des MSCs du follicule sortent de quiescence en réponse à des signaux en provenance du micro-environnement de la niche. Elles subissent alors une division que l'on suppose asymétrique (même si cela reste formellement à démontrer), afin de générer deux cellules filles. L'une des cellules filles donne naissance aux mélanoblastes puis aux mélanocytes différenciés, et l'autre une MSC qui rentre à nouveau en quiescence permettant l'auto-renouvellement. Chez les souris *BRaf^{fl/fl};CRaf^{fl/fl};Tyr::Cre/o*, les quelques MSCs activées au démarrage d'un nouveau cycle vont disparaître par un mécanisme dont nous ne connaissons pas la nature exacte. Au bout de plusieurs cycles du poil, le réservoir de MSCs s'épuise, empêchant la production de mélanocytes. Les poils générés lors des cycles suivants seront donc blancs. Les souris *BRaf^{fl/fl};CRaf^{fl/fl};Tyr::Cre/o* ne deviennent cependant jamais totalement blanches. En effet, la phase de repos (télogène) s'allonge à chaque cycle, ce qui rend la génération de nouveaux poils moins fréquente au cours du vieillissement. De plus, chez la souris, le poil du cycle précédent reste au niveau du canal du follicule (on l'appelle alors le club hair). Ces deux éléments peuvent expliquer la présence persistante d'un certain nombre de poils noirs chez les souris *BRaf^{fl/fl};CRaf^{fl/fl};Tyr::Cre/o* de plus d'un an.

Redondance fonctionnelle de B-RAF et C-RAF dans les MSCs

Nous avons observé que les souris simples knock-out pour *B-raf* ou *C-raf* ne développaient pas de phénotype de hair graying. De plus, la présence d'un seul allèle de *B-raf* ou d'un seul allèle de *C-raf* suffit au maintien des MSCs dans la niche du follicule. Les kinases B-RAF et C-RAF ont donc des fonctions redondantes dans la régulation de l'homéostasie des MSCs. Ces observations démontrent également que la formation d'hétérodimères B-RAF/C-RAF n'est pas requise *in vivo* pour le maintien des MSCs. Les hétérodimères ayant une activité kinase plus élevée que les homodimères, nous pouvons avancer l'hypothèse qu'un niveau d'activité kinase de base suffit à assurer l'auto-renouvellement des MSCs.

Notre laboratoire a également obtenu des données démontrant l'existence de fonctions redondantes des kinases B-RAF et C-RAF dans le contexte du mélanome. En effet, dans une étude à laquelle j'ai participé (manuscrit en annexe), nous avons développé un modèle

murin de mélanome induit par l'expression de la forme humaine mutée N-RAS^{Q61K} dans le lignage mélanocytaire. Dans ce modèle, la perte de B-RAF et/ou de C-RAF a été induite de manière constitutive ou conditionnelle, spécifiquement dans le lignage mélanocytaire. Nous avons ainsi pu montrer que l'expression d'une seule des kinases C-RAF et B-RAF était suffisante pour la croissance des tumeurs. En revanche, cette étude a montré pour la première fois que B-RAF était nécessaire à la formation des nevi, alors que C-RAF jouait un rôle mineur dans les étapes précoces de la carcinogenèse.

Les MSCs n'exprimant plus *B-raf* et *C-raf* présentent un défaut d'entrée dans le cycle cellulaire

Contrairement à certains modèles murins décrits dans la littérature, la disparition des MSCs chez les souris knockout pour *B-raf* et *C-raf* n'est pas due à leur différenciation précoce dans la niche. Nos expériences *in vivo* ont révélé que les MSCs délétées pour *B-raf* et *C-raf* présentaient un défaut d'entrée en phase S lors de leur sortie de quiescence. De plus, nous avons montré *in vitro* que les MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-}, contrairement aux MSCs contrôles, sont incapables de se diviser. De même, des cultures de mélanocytes primaires issues d'animaux double knock-out pour *B-raf* et *C-raf* possèdent un défaut de prolifération. Quel est alors le devenir des MSCs knock-out dans la niche lors de la sortie de quiescence? Une première hypothèse serait une disparition par un mécanisme d'apoptose. Bien que nous n'ayons pas observé ce phénomène, nous ne pouvons l'exclure totalement, puisqu'il pourrait survenir dans une fenêtre de temps réduite. Une seconde hypothèse, que nous privilégions à l'heure actuelle, serait un défaut dans la division asymétrique des MSCs knock-out conduisant à leur incapacité à s'auto-renouveler.

Mise au point des analyses transcriptomiques

Afin de comprendre le rôle de la voie RAF/MEK/ERK dans le maintien des MSCs, nous avons voulu déterminer quelles étaient ses cibles transcriptionnelles. Nous avons donc entrepris plusieurs analyses transcriptomiques dont les objectifs étaient d'une part de comparer les profils d'expression génique des MSCs contrôles et des MSCs n'exprimant plus *B-raf* et *C-raf*, et d'autre part de mieux caractériser les MSCs. Ce second objectif a été

réalisé en comparant les profils d'expression des MSCs contrôles à leurs cellules progénitrices: les mélanoblastes.

Ces analyses ont nécessité la purification de petites populations de MSCs ou de mélanoblastes présentes à certains stades dans la peau des souris contrôles et mutantes. Dans ce but, nous avons croisé les souris *B-raf^{fl/fl}; C-raf^{fl/fl}; Tyr::Cre* avec la lignée double rapportrice *mT/mG*. Cette lignée permet d'isoler par FACS les cellules du lignage mélanocytaire grâce à l'expression membranaire de la GFP. Les MSCs *B-raf^{+/+}; C-raf^{+/+}* et les MSCs *B-raf^{-/-}; C-raf^{-/-}* ont été isolées à partir de quatre peaux d'animaux de chacun des génotypes. Ces peaux étaient en télogène (21 jours après la naissance), stade où les seules cellules du lignage mélanocytaire présentes sont les MSCs. Les mélanoblastes ont été purifiés à partir de quatre peaux de souris contrôles âgées de quatre jours, stade où les mélanoblastes colonisent les follicules. Nous avons ainsi obtenu quatre échantillons de chacune des trois populations suivantes: MSCs *B-raf^{+/+}; C-raf^{+/+}*, MSCs *B-raf^{-/-}; C-raf^{-/-}* et mélanoblastes *B-raf^{+/+}; C-raf^{+/+}*, qui ont été analysés sur puces à ADN.

L'analyse des données transcriptomiques issues des puces nous a contraint à écarter deux échantillons des MSCs *B-raf^{+/+}; C-raf^{+/+}* et deux échantillons des mélanoblastes *B-raf^{+/+}; C-raf^{+/+}*. En effet, ces échantillons s'éloignaient trop des autres dans une analyse en composantes principales. En conséquence, le nombre d'échantillons comparés lors des analyses des profils géniques MSCs *B-raf^{+/+}; C-raf^{+/+}* versus MSCs *B-raf^{-/-}; C-raf^{-/-}* et MSCs *B-raf^{+/+}; C-raf^{+/+}* versus mélanoblastes *B-raf^{+/+}; C-raf^{+/+}* est insuffisant pour avoir une bonne homogénéité et une représentativité. Ces analyses manquent donc vraisemblablement de robustesse. C'est pourquoi les gènes identifiés comme différentiellement exprimés lors de ces analyses doivent être validés par qPCR sur un plus grand nombre d'échantillons.

Analyse transcriptomique des MSCs et des mélanoblastes

L'analyse comparative des profils d'expression des MSCs *B-raf^{+/+}; C-raf^{+/+}* et des mélanoblastes *B-raf^{+/+}; C-raf^{+/+}* avait pour but de mieux caractériser les MSCs, étant donné que peu de choses sont connues sur cette population cellulaire. Toutefois, elle n'a pas

permis d'identifier un marqueur spécifique des MSCs. En revanche, une observation particulièrement intéressante qui est ressortie de cette analyse a été la mise en évidence de changements métaboliques importants entre les MSCs et leurs précurseurs mélanoblastiques. En effet, les MSCs montrent une diminution très importante de l'expression de six des huit gènes codant pour les enzymes impliquées dans les réactions métaboliques du cycle de Krebs. En outre, un nombre conséquent de gènes codant pour les protéines formant les cinq complexes protéiques de la chaîne respiratoire mitochondriale sont moins exprimés dans les MSCs, comparativement aux mélanoblastes. Les MSCs semblent donc présenter une faible respiration mitochondriale et privilégient plutôt un métabolisme anaérobie pour produire leur énergie. De manière intéressante, ce type de métabolisme a déjà été montré dans d'autres populations de cellules souches adultes telles que les cellules souches hématopoïétiques, mésenchymateuses et neurales (Ochocki and Simon, 2013; Shyh-Chang et al., 2013), qui résident dans une niche hypoxique. L'hypoxie a été montrée comme étant un facteur essentiel du maintien de la quiescence des cellules souches. Ainsi, l'augmentation du taux d'oxygène induit la prolifération et la différenciation des HSCs, conduisant à un épuisement précoce de ces cellules. Une théorie avancée est que cet environnement participe au maintien de la faible prolifération des cellules souches et leur évite le stress oxydatif associé aux tissus mieux oxygénés, permettant le maintien à long terme du pool de cellules souches (Busuttill et al., 2003; Eliasson and Jönsson, 2010; Lekli et al., 2009). De manière intéressante, dans la niche du follicule pileux, une étude a suggéré l'expression de marqueurs hypoxiques (glucose transporter 1 (GLUT1) et carbonic anhydrase IX (CA IX)) (Rathman-Josserand et al., 2013). Cependant, à l'heure actuelle, le rôle de cette hypoxie dans le maintien de la quiescence des cellules souches du follicule n'a pas été mise en évidence. Les données de cette analyse transcriptomique devront cependant encore être confirmées.

Analyse transcriptomique des MSCs contrôles et des MSCs délétées pour *B-raf* et *C-raf*

La comparaison des profils d'expression génique des MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+} et des MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-} avait pour objectif d'identifier des cibles de la voie RAF/MAPK impliquées dans l'auto-renouvellement des MSCs. A partir des résultats de cette analyse, nous avons identifié un certain nombre de gènes candidats différentiellement exprimés

entre les MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+} et les MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-}. Pour un certain nombre de ces gènes, il n'a pas été possible de valider par qPCR ces variations d'expression, sans doute du fait des faiblesses de l'analyse évoquées plus haut. Toutefois, nous avons pu confirmer la forte diminution de l'expression du gène *c-Met* dans les MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-} par rapport aux MSCs contrôles. De plus, nous avons montré *in vivo* une forte diminution du récepteur MET à la membrane des MSCs knock-out. Etant donné le rôle du gène *c-Met* dans la carcinogenèse du mélanome, il nous est apparu comme une cible transcriptionnelle de la voie RAF/MAPK intéressante car potentiellement impliqué dans le maintien des MSCs.

Rôle de MET dans la division des MSCs *in vitro*

Nous avons donc entrepris d'évaluer le rôle de la signalisation HGF/SF-MET dans les MSCs. Pour cela, nous avons mis au point une technique de culture des MSCs *in vitro*. Ainsi, nous avons démontré pour la première fois la possibilité de cultiver les MSCs *in vitro* sur une couche de kératinocytes nourriciers. Ce système présente cependant des limites, puisque nous ne pouvons conserver les MSCs à l'état indifférencié plus de quelques jours. Afin d'améliorer ce système en se rapprochant au plus près du microenvironnement de la niche, il serait intéressant d'essayer une technique de culture tridimensionnelle des MSCs en présence de cellules kératinocytaires, ou éventuellement de cellules souches kératinocytaires, qui pourraient être purifiées à partir de la peau de souris. De manière intéressante, nous avons montré qu'il était possible de cultiver les MSCs sur une matrice artificielle avec un milieu de culture cellulaire préalablement incubé avec des kératinocytes. Sans ce milieu conditionné, il n'est pas possible d'établir de culture de MSCs sur matrice, ce qui démontre que des facteurs sécrétés par les kératinocytes sont nécessaires au maintien des MSCs.

La culture des MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+} et des MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-} en présence d'HGF/SF a montré que l'activation du récepteur MET stimule la division des MSCs contrôles, mais pas celle des MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-}. De plus, l'inhibition du récepteur MET par le crizotinib dans les MSCs *B-raf*^{+/+};*C-raf*^{+/+} conduit à leur mort. Ces données nous ont permis de confirmer l'hypothèse d'un rôle de MET dans la division des MSCs.

Régulation de l'expression de *c-Met* par la voie RAF/MEK/ERK:

Nos données *in vivo* et *in vitro* suggèrent une régulation de l'expression de *c-Met* par la voie RAF/MEK/ERK. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié son expression dans une lignée de mélanocytes en réponse au U0126, un inhibiteur des protéines MEK. Nous avons bien observé une diminution du transcrit *c-Met* en réponse à l'inhibition de la voie RAF/MEK/ERK. Cependant, une réexpression de *c-Met* intervient rapidement, alors même que la voie RAF/MEK/ERK est toujours inhibée. Ces résultats montrent que, dans les mélanocytes différenciés, un mécanisme indépendant de la voie RAF/MEK/ERK est capable de compenser son inhibition et d'assurer l'expression de MET. En utilisant un inhibiteur de la voie PI3K/AKT, nous avons pu montrer que cette voie n'était pas responsable de l'expression de *c-Met* dans ce contexte (résultats non présentés). Ces observations nous ont amené à la conclusion que les mélanocytes différenciés ne reproduisaient pas ce que nous avons observé *in vivo* dans les MSCs. En accord avec cette hypothèse, une expérience préliminaire a montré que le traitement *in vitro* au crizotinib des mélanocytes n'affecte pas leur prolifération (résultats non présentés).

La régulation de *c-Met* par la voie RAF/MEK/ERK n'intervient pas non plus dans les mélanoblastes au cours du développement embryonnaire. Ainsi, les souris mutées naissent sans défaut de pigmentation, la prolifération et la migration des mélanoblastes est normale. De plus, nous avons montré qu'au stade E13.5 le récepteur MET n'est pas présent dans les mélanoblastes et la voie ERK/MAPK n'est pas activée.

L'ensemble de ces données nous conduisent à penser que le mécanisme de régulation de l'expression de *c-Met* par la voie RAF/MEK/ERK est spécifique des MSCs. Une expérience envisagée pour montrer cette régulation de *c-Met* dans les MSCs *in vitro*, consisterait à inhiber la voie RAF/MEK/ERK grâce au U0126 dans des MSCs contrôles, puis étudier par immunofluorescence la présence du récepteur MET à la membrane de ces cellules.

Rôle du récepteur MET *in vivo* dans les MSCs

Selon l'hypothèse que nous privilégions, la voie RAF/MEK/ERK régule l'expression de *c-Met*, permettant la présence du récepteur à la membrane des MSCs et ainsi l'auto-renouvellement de ces cellules lors de l'anagène. L'étude du profil d'expression du ligand HGF/SF nous permet d'émettre une hypothèse concernant l'activation de MET au moment de la sortie de quiescence. Ainsi, la papille dermique produit de l'HGF/SF en télogène. Celui-ci semble diffuser jusqu'à la niche du follicule pileux, et se retrouve au niveau du hair germ au début de l'anagène. Il est alors probable que l'HGF/SF active de manière paracrine le récepteur MET localisé à la membrane des KSCs et des MSCs. Afin de confirmer cette activation de MET au moment de la sortie de quiescence dans les MSCs, nous sommes en train de mettre au point un marquage par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps anti-phosphoMET. En accord avec l'hypothèse d'une implication de la signalisation de l'HGF/SF-MET dans la sortie de quiescence des MSCs, il a été montré que l'injection d'HGF/SF dans la peau de souris sauvages conduit à un allongement de l'anagène (Lindner et al., 2000). L'activation du récepteur MET dans les MSCs pourrait entraîner la sortie de quiescence et participer à la régulation de la division de ces cellules. Ainsi, nous pouvons supposer que chez les souris *BRaf^{f1/f1};CRaf^{f1/f1};Tyr::Cre/o*, l'absence de MET empêche l'entrée dans le cycle cellulaire des MSCs.

Afin de valider le rôle de MET dans le maintien des MSCs *in vivo*, nous avons croisé une lignée de souris knock-out pour *c-Met* avec la lignée *Tyr::Cre/o;mT/mG*. Selon notre hypothèse, l'absence de MET dans le lignage mélanocytaire devrait conduire à une disparition des MSCs et donc à un phénotype de hair graying similaire à celui des souris double knock-out pour *B-raf* et *C-raf*. Toutefois, les souris *Met^{f/f}; Tyr::Cre/o;mT/mG* n'ont développé aucun phénotype. Nous avons envisagé la possibilité d'un déflochage partiel du gène *c-Met*. Grâce à l'expression du transgène *mT/mG* dans cette lignée, les MSCs ont été isolées et génotypées, ce qui a révélé la présence persistante d'une quantité importante de l'allèle floxé du gène *c-Met*. Il est donc probable qu'au moins un allèle de *c-Met* soit maintenu dans une ou plusieurs MSCs de chaque follicule, conduisant au maintien de l'expression de la protéine, ce qui empêcherait l'épuisement des MSCs. La raison pour laquelle l'efficacité de la recombinaison des allèles de *c-Met* n'est pas complète dans le lignage mélanocytaire reste inconnue. Il pourrait s'agir d'un problème d'expression du promoteur de la *Tyrosinase* qui contrôle l'expression de la Cre. Cependant, la lignée transgénique *Tyr::Cre/o* (Delmas et al., 2003) a été utilisée pour générer de nombreuses lignées murines knock-out conditionnel et il n'a jamais été fait mention d'un problème de

défloxxage. Une explication alternative serait une difficulté d'accès de la Cre au locus de *c-Met* dans le lignage. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'un défloxxage partiel des allèles *c-Met^{f/f}* dans les kératinocytes de la lignée de souris *c-Met^{f/f};K14::Cre* (Borowiak et al., 2004). Dans cette étude, les auteurs utilisent une lignée *c-Met^{f/f}* différente de celle que nous utilisons (Huh et al., 2004), mais montrent que le gène *c-Met* échappe à la recombinaison dans environ 5% des kératinocytes épidermiques.

Afin d'améliorer l'efficacité du défloxxage de l'allèle *c-Met^{f/f}* dans les MSCs, nous avons entrepris de croiser la lignée *Met^{f/f}* avec une lignée transgénique *Pgk::Cre*. L'expression ubiquitaire et précoce de la Cre, grâce au promoteur du gène *Pgk*, conduit au défloxxage de l'allèle *c-Met* dans les souris *Met^{A/+}; Pgk::Cre* générées. Ces dernières sont actuellement croisées avec les souris *Met^{f/f}; Tyr::Cre/o*. Nous espérons que les MSCs de la peau des souris *Met^{A/f}; Tyr::Cre/o* n'auront plus d'allèles *c-Met* fonctionnel. En effet, dans les MSCs de ces souris, un seul allèle *c-Met* devra être recombiné par la Cre exprimée sous le contrôle du promoteur *Tyrosinase*, ce qui rend cet événement plus probable. Nous pourrions alors étudier le phénotype de ces animaux, et ainsi déterminer si la disparition du récepteur MET dans les MSCs conduit à un phénotype identique à celui observé en absence des kinases B-RAF et C-RAF.

En parallèle de cette approche génétique, nous avons réalisé une expérience consistant à traiter des animaux *B-raf^{f/+}; C-raf^{f/+}; Tyr::Cre/o* à l'aide du crizotinib. Les souris ont été épilées afin de forcer le démarrage d'un nouveau cycle du follicule pileux et donc la sortie de quiescence des MSCs. Post-épilation et durant les cinq jours suivants, les souris ont été gavées au crizotinib à raison de 50mg/kg/jour. Selon notre hypothèse, l'administration de cet inhibiteur au stade critique de la sortie de quiescence devrait conduire à la disparition des MSCs et donc au hair graying. Malheureusement, nous n'avons pas pu observer de blanchiment du poil des souris *B-raf^{f/+}; C-raf^{f/+}; Tyr::Cre* traitées au crizotinib, en raison d'un défaut de repousse du poil. En effet, les poils de la zone épilée repoussent beaucoup plus lentement chez les souris traitées par rapport aux animaux non traités. Chez ces derniers, le nouveau poil met trois semaines à se développer totalement, mais commence à être visible une semaine après l'épilation. Chez les animaux gavés au crizotinib, le poil n'apparaît qu'au bout de trois semaines en moyenne, et met de six à huit semaines pour atteindre sa longueur maximale. Il semble donc que le crizotinib ait un effet délétère sur les kératinocytes du follicule, ce qui est en accord avec la mort des kératinocytes observée *in*

in vitro après traitement avec cet inhibiteur. Il a été montré que la délétion de *c-Met* dans les kératinocytes épidermiques n'altère pas la peau, mais empêche la prolifération des kératinocytes en cas de blessure (Chmielowiec et al., 2007). En accord, avec cette étude, la peau de nos souris n'est pas lésée, mais l'inhibition de MET semble bloquer la prolifération des kératinocytes du follicule, et donc la formation d'un nouveau poil. Le traitement au crizotinib empêcherait donc la sortie de quiescence des KSCs et des MSCs, confirmant l'importance de la signalisation HGF/SF-MET au moment de l'anagène. Par la suite, le crizotinib étant éliminé de l'organisme des souris, les KSCs et les MSCs de la niche pourraient sortir de quiescence et régénérer un nouveau poil pigmenté.

Par quelle voie le récepteur MET promeut l'auto-renouvellement des MSCs? Hypothèse d'une boucle d'activation positive de MET dans les MSCs

Selon notre hypothèse, *c-Met* est une cible transcriptionnelle de la voie RAF/MEK/ERK impliquée dans le maintien des MSCs. Cependant, nous ignorons quelle(s) voie(s) en aval de MET intervient dans la régulation de l'auto-renouvellement des MSCs. Etant donné nos données sur le défaut dans le cycle cellulaire des MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-} et le rôle connu de la signalisation RAF/MEK/ERK dans la régulation du cycle cellulaire, nous pouvons émettre l'hypothèse que c'est cette voie qui serait activée dans les MSCs via MET. Ainsi, la voie RAF/MEK/ERK activerait la transcription de *c-Met* et serait elle-même activée par le récepteur MET, formant une boucle d'activation positive de MET dans les MSCs (Figure à la fin de la Discussion). Dans les MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-}, l'absence de B-RAF et C-RAF conduirait à une absence de MET à la membrane, donc une perte d'activation de la voie RAF/MEK/ERK et un défaut de la division cellulaire. Dans le but de prouver que MET régule sa propre expression via la voie RAF/MAPK, nous pourrions croiser les souris *B-raf*^{f/f}; *C-raf*^{f/f}; *Tyr::Cre*/*o* avec la lignée transgénique *Rosa26*^{LacZ-stop-Met}. Cette lignée, générée par le laboratoire du Dr Maina (Genestine et al., 2011), permet une expression gain de fonction du gène *c-Met* après excision de la cassette stop dans les cellules exprimant la Cre. Dans l'hypothèse où la voie RAF/MEK/ERK contrôle l'expression de *c-Met* et où MET agit via cette même voie pour promouvoir sa propre expression et maintenir les MSCs, les

souris *B-raf^{ff/f}; C-raf^{ff/f}; Tyr::Cre/o; Rosa26^{LacZ-stop-Met}* devraient développer un hair graying. En effet, l'expression de MET grâce au transgène ne pourra sauver le phénotype des souris *B-raf^{ff/f}; C-raf^{ff/f}; Tyr::Cre/o*, puisque l'absence de B-RAF et C-RAF empêchera une signalisation via la voie RAF/MEK/ERK assurant l'auto-renouvellement des MSCs. A l'inverse, si les souris *B-raf^{ff/f}; C-raf^{ff/f}; Tyr::Cre/o; Rosa26^{LacZ-stop-Met}* ne développent pas de hair graying, il est probable que MET passe par une autre voie que RAF/MEK/ERK pour promouvoir l'auto-renouvellement des MSCs.

PERSPECTIVES

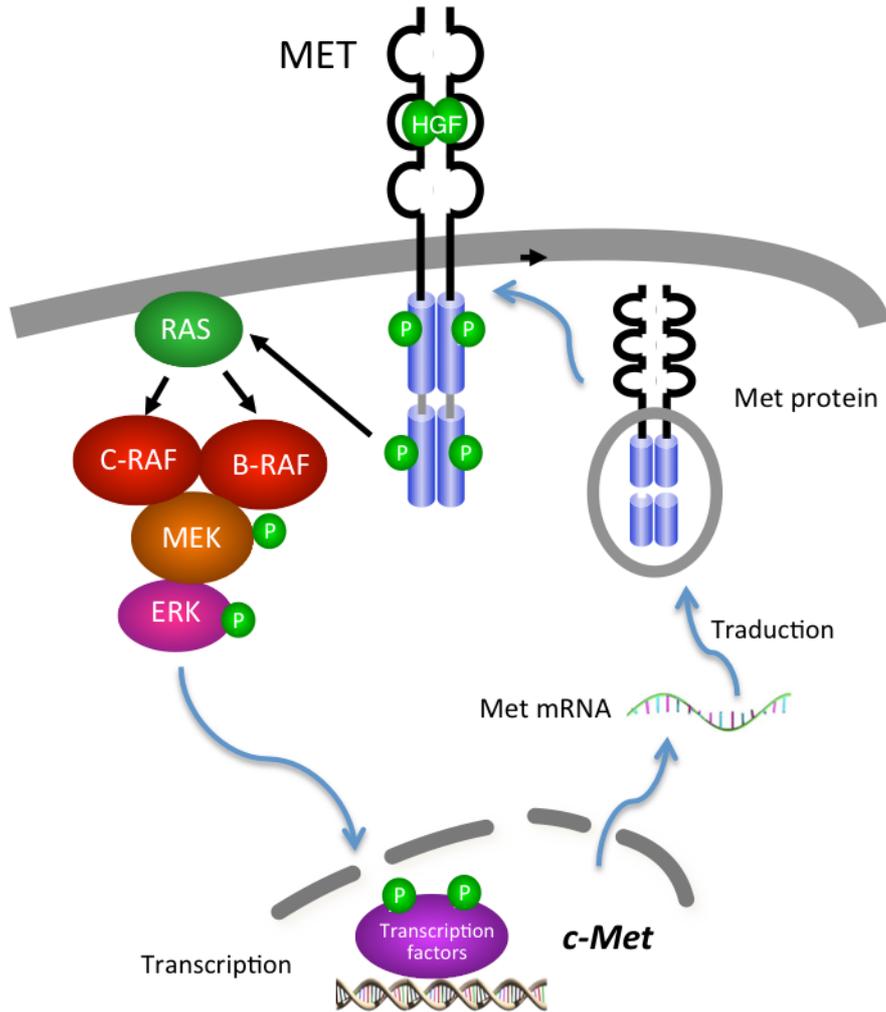
Afin d'identifier le mécanisme responsable de la disparition des MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-}, nous avons envisagé des approches permettant de suivre le devenir de ces cellules *in vivo*. Ces approches pourraient aussi nous permettre de déterminer la proportion de MSCs activées à chaque démarrage du cycle, ainsi que leur mode de division, symétrique ou asymétrique.

Tout d'abord, nous pourrions envisager de croiser la lignée *B-raf*^{f/f};*C-raf*^{f/f};*mT/mG* avec une lignée murine *Dct::Cre*^{Ert2}. Les souris *B-raf*^{f/f};*C-raf*^{f/f};*Dct::Cre*^{Ert2};*mT/mG* âgées de 21 jours seraient traitées au tamoxifène, par badigeonnage de la peau une ou plusieurs fois. Ce traitement permettrait de défloxxer les allèles des gènes *B-raf* et *C-raf* dans un nombre limité de MSCs au moment de leur sortie de quiescence. Les MSCs *B-raf*^{-/-};*C-raf*^{-/-} seraient GFP positives, nous permettant de suivre le devenir de leurs cellules filles. Il serait alors possible de déterminer si ces cellules donnent naissance à des mélanocytes différenciés dans le bulbe, ce qui serait en faveur de l'hypothèse d'une différenciation des deux cellules filles, avec absence de renouvellement d'une MSCs. La stratégie de croisement de nos souris avec la lignée *Dct::Cre*^{Ert2} nécessiterait au préalable de générer la lignée *Dct::Cre*^{Ert2} qui n'existe pas à notre connaissance. De plus, il n'est pas possible d'utiliser la lignée *Tyr::Cre*^{Ert2} car le gène *Tyrosinase* est trop faiblement exprimé dans les MSCs pour avoir un défloxxage efficace des gènes *raf*. Dans nos lignées transgéniques *Tyr::Cre/o* le défloxxage a lieu dans les mélanoblastes au cours du développement embryonnaire. Comme les MSCs dérivent des mélanoblastes qui colonisent la niche et entrent en quiescence, ils sont bien défloxxés pour les gènes *B-raf* et *C-raf*.

Une seconde approche envisagée pour suivre ces cellules *in vivo* serait d'utiliser une technique particulièrement innovante développée par le laboratoire du Dr Greco (Rompolas et al., 2012). Celle-ci permet de suivre par microscopie bi-photonique les cellules de follicules pileux localisés dans la peau d'oreilles chez la souris vivante. Les auteurs ont ainsi pu étudier les divisions des KSCs lors de l'anagène. Grâce au transgène *mT/mG* présent dans nos lignées de souris, nous pourrions suivre la division et le devenir des MSCs exprimant la GFP dans le contexte de la niche. Cette approche pourrait permettre de déterminer si les MSCs se divisent de manière asymétrique au cours de l'anagène. De

?

l gi J e ? Pb ? d ? d ? h ? Pi i ? d ? ? P ? ? H ? P ? a ? o ? P ? b ? g e ? ? P ? i ? ? ? ? ? i ? b ? H ? i ? P ? o ? d ? P ? i ? ? ? ? ? o ? i ? ? P ? ? ? ? d ? b ? ? P ? b ? a ? ? u ? g ? ? P ? ?
? g ? é ? P ? i ? u ? o ? d ? ? ? u ? b ? é ? o ? P ? ? ? g ? ? P ? o ? u ? g ? T ? P ? a ? P ? o ? d ? ? ? ? g ? ? ? é ? o ? ? ? é ? P ? a ? H ? ? o ? u ? ? p ? d ? b ? P ? z ? ? ?



?

BDARVoaUmô PU7Ai ?U77?2?rs 2rAP77U77 ?2?77?Pa?Ua77 ?2?a?

IPèl bPi i ayo ?P?y? ?FPi d?uod1 HP? ?b?2?2?ueP?2?2?) ? ?2?) ?2?2?P?d?g?P? ?2?2?è?2?duo ?2?P?2
I? ?2?) ?2?2?P?b?H?P? d?Pgb? ?2?2?2?2?P?2?2?2?ueP?2?2?) ? ?2) ?2?2?P?o ?2?2?2? ?2?2?e? ? ? P?2?b?H?P?g?o?P?2?ug? ? P?2
?I?2?2?2?2?duo ? ? ui ?2?P?2?P?2?2? ? bud?H?o?P?2? ?2?2?

?

?

?

?

CONCLUSION GENERALE

Des mutations dans les acteurs de la voie RAS/RAF/MEK/ERK sont présentes dans la majorité des cas de mélanomes cutané. Cette observation plaide en faveur d'un rôle important de cette voie de signalisation dans la régulation du lignage mélanocytaire. A l'aide de modèles murins invalidés pour deux protéines kinases membres de la voie, j'ai cherché à comprendre son rôle dans l'homéostasie du lignage mélanocytaire.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse apportent des perspectives nouvelles sur le rôle des kinases RAF et MET dans ce lignage. En effet, ils ont mis en évidence l'implication de B-RAF et C-RAF dans le contrôle de l'auto-renouvellement des cellules souches mélanocytaires chez la souris. De plus, ils suggèrent un lien entre les voies RAF/MAPK et HGF/MET dans les MSCs. Cette étude apporte des éléments en faveur d'une boucle de régulation de ces deux voies, impliquée dans le contrôle de la division d'une population de cellules souches adultes.

La compréhension des mécanismes physiologiques d'auto-renouvellement des MSCS pourrait permettre de mieux appréhender les mécanismes pathologiques intervenant lors de la carcinogénèse du mélanome. En effet, les mutations des protéines RAF sont présentes dans les cellules à l'origine de la tumeur qui partagent des caractéristiques communes avec les MSCs.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abella, J.V., Peschard, P., Naujokas, M.A., Lin, T., Saucier, C., Urbé, S., and Park, M. (2005). Met/Hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for Hrs phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9632–9645.

Ackermann, J., Fruttschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A., and Beermann, F. (2005). Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* *65*, 4005–4011.

Adameyko, I., Lallemand, F., Aquino, J.B., Pereira, J.A., Topilko, P., Müller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., et al. (2009). Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* *139*, 366–379.

Albino, A.P., Le Strange, R., Oliff, A.I., Furth, M.E., and Old, L.J. (1984). Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity? *Nature* *308*, 69–72.

Albino, A.P., Nanus, D.M., Mentle, I.R., Cordon-Cardo, C., McNutt, N.S., Bressler, J., and Andreeff, M. (1989). Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene* *4*, 1363–1374.

Anderson, N.G., Maller, J.L., Tonks, N.K., and Sturgill, T.W. (1990). Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* *343*, 651–653.

Andl, T., Reddy, S.T., Gaddapara, T., and Millar, S.E. (2002). WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev. Cell* *2*, 643–653.

Atit, R., Sgaier, S.K., Mohamed, O.A., Taketo, M.M., Dufort, D., Joyner, A.L., Niswander, L., and Conlon, R.A. (2006). Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev. Biol.* *296*, 164–176.

Bardelli, A., Corso, S., Bertotti, A., Hobor, S., Valtorta, E., Siravegna, G., Sartore-Bianchi, A., Scala, E., Cassingena, A., Zecchin, D., et al. (2013). Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov.* *3*, 658–673.

Bardwell, L., and Thorner, J. (1996). A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 373–374.

Barnier, J.V., Papin, C., Eychène, A., Lecoq, O., and Calothy, G. (1995). The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* *270*, 23381–23389.

Birchmeier, C., Sonnenberg, E., Weidner, K.M., and Walter, B. (1993). Tyrosine kinase receptors in the control of epithelial growth and morphogenesis during development. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *15*, 185–190.

Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G.F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 915–925.

Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* *376*, 768–771.

Blanpain, C., Lowry, W.E., Geoghegan, A., Polak, L., and Fuchs, E. (2004). Self-Renewal, Multipotency, and the Existence of Two Cell Populations within an Epithelial Stem Cell Niche. *Cell* *118*, 635–648.

Borowiak, M., Garratt, A.N., Wüstefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C., and Birchmeier, C. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 10608–10613.

Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Roth, W., Nakamura, M., Chen, L.H., Herzog, W., Lindner, G., McMahon, J.A., Peters, C., Lauster, R., et al. (1999). Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction. *Nat. Cell Biol.* *1*, 158–164.

Bowers, D.C., Fan, S., Walter, K.A., Abounader, R., Williams, J.A., Rosen, E.M., and Laterra, J. (2000). Scatter factor/hepatocyte growth factor protects against cytotoxic death in human glioblastoma via phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathways. *Cancer Res.* *60*, 4277–4283.

Brownell, I., Guevara, E., Bai, C.B., Loomis, C.A., and Joyner, A.L. (2011). Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell Stem Cell* *8*, 552–565.

Busuttil, R.A., Rubio, M., Dollé, M.E.T., Campisi, J., and Vijg, J. (2003). Oxygen

accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell* 2, 287–294.

Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90, 859–869.

Catling, A.D., Reuter, C.W., Cox, M.E., Parsons, S.J., and Weber, M.J. (1994). Partial purification of a mitogen-activated protein kinase kinase activator from bovine brain. Identification as B-Raf or a B-Raf-associated activity. *J. Biol. Chem.* 269, 30014–30021.

Chang, C.-Y., Pasolli, H.A., Giannopoulou, E.G., Guasch, G., Gronostajski, R.M., Elemento, O., and Fuchs, E. (2013). NFIB is a governor of epithelial-melanocyte stem cell behaviour in a shared niche. *Nature*.

Chi, W., Wu, E., and Morgan, B.A. (2013). Dermal papilla cell number specifies hair size, shape and cycling and its reduction causes follicular decline. *Dev. Camb. Engl.* 140, 1676–1683.

Chiang, C., Swan, R.Z., Grachtchouk, M., Bolinger, M., Litingtung, Y., Robertson, E.K., Cooper, M.K., Gaffield, W., Westphal, H., Beachy, P.A., et al. (1999). Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev. Biol.* 205, 1–9.

Chmielowiec, J., Borowiak, M., Morkel, M., Stradal, T., Munz, B., Werner, S., Wehland, J., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2007). c-Met is essential for wound healing in the skin. *J. Cell Biol.* 177, 151–162.

Cooper, C.S., Park, M., Blair, D.G., Tainsky, M.A., Huebner, K., Croce, C.M., and Vande Woude, G.F. (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311, 29–33.

Cotsarelis, G. (2006). Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1459–1468.

Cotsarelis, G., Sun, T.T., and Lavker, R.M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61, 1329–1337.

Crabtree, G.R., and Olson, E.N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 *Suppl*, S67-79.

Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.-H., Aiba, S., Bröcker, E.-B., LeBoit, P.E., et al. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N. Engl. J. Med.* *353*, 2135–2147.

DasGupta, R., and Fuchs, E. (1999). Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 4557–4568.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* *417*, 949–954.

Delmas, V., Martinuzzi, S., Bourgeois, Y., Holzenberger, M., and Larue, L. (2003). Cre-mediated recombination in the skin melanocyte lineage. *Genes. N. Y. N* 2000 *36*, 73–80.

Dent, P., Haser, W., Haystead, T.A., Vincent, L.A., Roberts, T.M., and Sturgill, T.W. (1992). Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* *257*, 1404–1407.

Dhomen, N., and Marais, R. (2009). BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* *23*, 529–545, ix.

Dietrich, S., Abou-Rebyeh, F., Brohmann, H., Bladt, F., Sonnenberg-Riethmacher, E., Yamaai, T., Lumsden, A., Brand-Saberi, B., and Birchmeier, C. (1999). The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 1621–1629.

Djian-Zaouche, J., Campagne, C., Reyes-Gomez, E., Gadin-Czerw, S., Bernex, F., Louise, A., Relaix, F., Buckingham, M., Panthier, J.-J., and Aubin-Houzelstein, G. (2012). Pax3 GFP , a new reporter for the melanocyte lineage, highlights novel aspects of PAX3 expression in the skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* *25*, 545–554.

Domen, J., Cheshier, S.H., and Weissman, I.L. (2000). The Role of Apoptosis in the Regulation of Hematopoietic Stem Cells. *J. Exp. Med.* *191*, 253–264.

Douarin, N.L., and Kalcheim, C. (1999). *The Neural Crest* (Cambridge University Press).

Downward, J. (2003). Role of receptor tyrosine kinases in G-protein-coupled receptor regulation of Ras: transactivation or parallel pathways? *Biochem. J.* *376*, e9-10.

Duesbery, N., and Vande Woude, G. (2006). BRAF and MEK mutations make a late entrance. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2006, pe15.

Dumaz, N., Hayward, R., Martin, J., Ogilvie, L., Hedley, D., Curtin, J.A., Bastian, B.C., Springer, C., and Marais, R. (2006). In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res.* 66, 9483–9491.

Dupin, E., and Le Douarin, N.M. (2003). Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene* 22, 3016–3023.

Edlundh-Rose, E., Egyházi, S., Omholt, K., Månsson-Brahme, E., Platz, A., Hansson, J., and Lundeberg, J. (2006). NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res.* 16, 471–478.

Eliasson, P., and Jönsson, J.-I. (2010). The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J. Cell. Physiol.* 222, 17–22.

van Elsas, A., Zerp, S.F., van der Flier, S., Krüse, K.M., Aarnoudse, C., Hayward, N.K., Ruiters, D.J., and Schrier, P.I. (1996). Relevance of ultraviolet-induced N-ras oncogene point mutations in development of primary human cutaneous melanoma. *Am. J. Pathol.* 149, 883–893.

Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.-M., Zhao, X., Christensen, J., et al. (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039–1043.

Ernfors, P. (2010). Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Exp. Cell Res.* 316, 1397–1407.

Eskandarpour, M., Huang, F., Reeves, K.A., Clark, E., and Hansson, J. (2009). Oncogenic NRAS has multiple effects on the malignant phenotype of human melanoma cells cultured in vitro. *Int. J. Cancer* 124, 16–26.

Eychène, A., Dusanter-Fourt, I., Barnier, J.V., Papin, C., Charon, M., Gisselbrecht, S., and Calothy, G. (1995). Expression and activation of B-Raf kinase isoforms in human and murine leukemia cell lines. *Oncogene* 10, 1159–1165.

Falk, S., Wurdak, H., Ittner, L.M., Ille, F., Sumara, G., Schmid, M.-T., Draganova, K., Lang, K.S., Paratore, C., Leveen, P., et al. (2008). Brain area-specific effect of TGF-beta signaling on Wnt-dependent neural stem cell expansion. *Cell Stem Cell* 2, 472–483.

Fan, S., Ma, Y.X., Wang, J.A., Yuan, R.Q., Meng, Q., Cao, Y., Latterra, J.J., Goldberg, I.D., and Rosen, E.M. (2000). The cytokine hepatocyte growth factor/scatter factor inhibits apoptosis and enhances DNA repair by a common mechanism involving signaling through phosphatidylinositol 3' kinase. *Oncogene* 19, 2212–2223.

Farrar, M.A., Alberol-Ila, J., and Perlmutter, R.M. (1996). Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature* 383, 178–181.

Fuchs, E. (2007). Scratching the surface of skin development. *Nature* 445, 834–842.

Fuchs, E. (2009). Finding one's niche in the skin. *Cell Stem Cell* 4, 499–502.

Fukumoto, S., Hsieh, C.M., Maemura, K., Layne, M.D., Yet, S.F., Lee, K.H., Matsui, T., Rosenzweig, A., Taylor, W.G., Rubin, J.S., et al. (2001). Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *J. Biol. Chem.* 276, 17479–17483.

Galabova-Kovacs, G., Matzen, D., Piazzolla, D., Meissl, K., Plyushch, T., Chen, A.P., Silva, A., and Baccarini, M. (2006). Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1325–1330.

Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L., and Fuchs, E. (1998). De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 95, 605–614.

Genestine, M., Caricati, E., Fico, A., Richelme, S., Hassani, H., Sunyach, C., Lamballe, F., Panzica, G.C., Pettmann, B., Helmbacher, F., et al. (2011). Enhanced neuronal Met signalling levels in ALS mice delay disease onset. *Cell Death Dis.* 2, e130.

Gherardi, E., Youles, M.E., Miguel, R.N., Blundell, T.L., Iamele, L., Gough, J., Bandyopadhyay, A., Hartmann, G., and Butler, P.J.G. (2003). Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 12039–12044.

Ghosh, P., and Chin, L. (2009). Genetics and genomics of melanoma. *Expert Rev.*

Dermatol. 4, 131.

Goding, C.R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.* 14, 1712–1728.

Goel, V.K., Lazar, A.J.F., Warneke, C.L., Redston, M.S., and Haluska, F.G. (2006). Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 126, 154–160.

Graveel, C., Su, Y., Koeman, J., Wang, L.-M., Tessarollo, L., Fiscella, M., Birchmeier, C., Swiatek, P., Bronson, R., and Vande Woude, G. (2004). Activating Met mutations produce unique tumor profiles in mice with selective duplication of the mutant allele. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17198–17203.

Greco, V., and Guo, S. (2010). Compartmentalized organization: a common and required feature of stem cell niches? *Dev. Camb. Engl.* 137, 1586–1594.

Greco, V., Chen, T., Rendl, M., Schober, M., Pasolli, H.A., Stokes, N., dela Cruz-Racelis, J., and Fuchs, E. (2009). A Two-Step Mechanism for Stem Cell Activation during Hair Regeneration. *Cell Stem Cell* 4, 155–169.

Green, H. (1977). Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell* 11, 405–416.

Gridelli, C., Peters, S., Sgambato, A., Casaluce, F., Adjei, A.A., and Ciardiello, F. (2014). ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer Treat. Rev.* 40, 300–306.

Halaban, R., Rubin, J.S., Funasaka, Y., Cobb, M., Boulton, T., Faletto, D., Rosen, E., Chan, A., Yoko, K., and White, W. (1992). Met and hepatocyte growth factor/scatter factor signal transduction in normal melanocytes and melanoma cells. *Oncogene* 7, 2195–2206.

Hartmann, G., Naldini, L., Weidner, K.M., Sachs, M., Vigna, E., Comoglio, P.M., and Birchmeier, W. (1992). A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation but not mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 11574–11578.

Hearing, V.J. (2005). Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J. Dermatol. Sci.* 37, 3–14.

Hearing, V.J. (2011). Determination of melanin synthetic pathways. *J. Invest. Dermatol.* *131*, E8–E11.

Heidorn, S.J., Milagre, C., Whittaker, S., Nourry, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J.S., Springer, C.J., Pritchard, C., et al. (2010). Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* *140*, 209–221.

Horsley, V., Aliprantis, A.O., Polak, L., Glimcher, L.H., and Fuchs, E. (2008). NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell* *132*, 299–310.

Hubbard, S.R. (2004). Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 464–471.

Huelsken, J., Vogel, R., Erdmann, B., Cotsarelis, G., and Birchmeier, W. (2001). beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* *105*, 533–545.

Huh, C.-G., Factor, V.M., Sánchez, A., Uchida, K., Conner, E.A., and Thorgeirsson, S.S. (2004). Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4477–4482.

Huleihel, M., Goldsborough, M., Cleveland, J., Gunnell, M., Bonner, T., and Rapp, U.R. (1986). Characterization of murine A-raf, a new oncogene related to the v-raf oncogene. *Mol. Cell. Biol.* *6*, 2655–2662.

Hunt, G., and Thody, A.J. (1995). Agouti protein can act independently of melanocyte-stimulating hormone to inhibit melanogenesis. *J. Endocrinol.* *147*, R1-4.

Ikawa, S., Fukui, M., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Yamamoto, T., and Toyoshima, K. (1988). B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 2651–2654.

Imokawa, G., Yada, Y., Morisaki, N., and Kimura, M. (1998). Biological characterization of human fibroblast-derived mitogenic factors for human melanocytes. *Biochem. J.* *330 (Pt 3)*, 1235–1239.

Inomata, K., Aoto, T., Binh, N.T., Okamoto, N., Tanimura, S., Wakayama, T., Iseki, S., Hara, E., Masunaga, T., Shimizu, H., et al. (2009). Genotoxic Stress Abrogates Renewal of

Melanocyte Stem Cells by Triggering Their Differentiation. *Cell* 137, 1088–1099.

Inoue-Narita, T., Hamada, K., Sasaki, T., Hatakeyama, S., Fujita, S., Kawahara, K., Sasaki, M., Kishimoto, H., Eguchi, S., Kojima, I., et al. (2008). Pten deficiency in melanocytes results in resistance to hair graying and susceptibility to carcinogen-induced melanomagenesis. *Cancer Res.* 68, 5760–5768.

Ito, M., Kawa, Y., Ono, H., Okura, M., Baba, T., Kubota, Y., Nishikawa, S.-I., and Mizoguchi, M. (1999). Removal of Stem Cell Factor or Addition of Monoclonal Anti-c-KIT Antibody Induces Apoptosis in Murine Melanocyte Precursors. *J. Invest. Dermatol.* 112, 796–801.

Ito, M., Kizawa, K., Toyoda, M., and Morohashi, M. (2002). Label-retaining cells in the bulge region are directed to cell death after plucking, followed by healing from the surviving hair germ. *J. Invest. Dermatol.* 119, 1310–1316.

Ito, M., Kizawa, K., Hamada, K., and Cotsarelis, G. (2004). Hair follicle stem cells in the lower bulge form the secondary germ, a biochemically distinct but functionally equivalent progenitor cell population, at the termination of catagen. *Differ. Res. Biol. Divers.* 72, 548–557.

Ivan, M., Bond, J.A., Prat, M., Comoglio, P.M., and Wynford-Thomas, D. (1997). Activated ras and ret oncogenes induce over-expression of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human thyroid epithelial cells. *Oncogene* 14, 2417–2423.

Jafari, M., Papp, T., Kirchner, S., Diener, U., Henschler, D., Burg, G., and Schiffmann, D. (1995). Analysis of ras mutations in human melanocytic lesions: activation of the ras gene seems to be associated with the nodular type of human malignant melanoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121, 23–30.

Jahoda, C.A., Horne, K.A., and Oliver, R.F. (1984). Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. *Nature* 311, 560–562.

Jaks, V., Barker, N., Kasper, M., van Es, J.H., Snippert, H.J., Clevers, H., and Toftgård, R. (2008). Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat. Genet.* 40, 1291–1299.

Jesenberger, V., Procyk, K.J., R uth, J., Schreiber, M., Theussl, H.C., Wagner, E.F., and Baccarini, M. (2001). Protective role of Raf-1 in Salmonella-induced macrophage apoptosis. *J.*

Exp. Med. *193*, 353–364.

Joffre, C., Barrow, R., Ménard, L., Calleja, V., Hart, I.R., and Kermorgant, S. (2011). A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* *13*, 827–837.

Kanteti, R., Nallasura, V., Loganathan, S., Tretiakova, M., Kroll, T., Krishnaswamy, S., Faoro, L., Cagle, P., Husain, A.N., Vokes, E.E., et al. (2009). PAX5 is expressed in small-cell lung cancer and positively regulates c-Met transcription. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *89*, 301–314.

Karlsson, G., Blank, U., Moody, J.L., Ehinger, M., Singbrant, S., Deng, C.-X., and Karlsson, S. (2007). Smad4 is critical for self-renewal of hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* *204*, 467–474.

Kawaida, K., Matsumoto, K., Shimazu, H., and Nakamura, T. (1994). Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 4357–4361.

Kawano, M., Komi-Kuramochi, A., Asada, M., Suzuki, M., Oki, J., Jiang, J., and Imamura, T. (2005). Comprehensive Analysis of FGF and FGFR Expression in Skin: FGF18 Is Highly Expressed in Hair Follicles and Capable of Inducing Anagen from Telogen Stage Hair Follicles. *J. Invest. Dermatol.* *124*, 877–885.

Kim, T.H., Xiong, H., Zhang, Z., and Ren, B. (2005). beta-Catenin activates the growth factor endothelin-1 in colon cancer cells. *Oncogene* *24*, 597–604.

Kimura-Ueki, M., Oda, Y., Oki, J., Komi-Kuramochi, A., Honda, E., Asada, M., Suzuki, M., and Imamura, T. (2012). Hair Cycle Resting Phase Is Regulated by Cyclic Epithelial FGF18 Signaling. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 1338–1345.

Kobielak, K., Pasolli, H.A., Alonso, L., Polak, L., and Fuchs, E. (2003). Defining BMP functions in the hair follicle by conditional ablation of BMP receptor IA. *J. Cell Biol.* *163*, 609–623.

Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* *351 Pt 2*, 289–305.

Kondo, T., and Hearing, V.J. (2011). Update on the regulation of mammalian melanocyte

function and skin pigmentation. *Expert Rev. Dermatol.* 6, 97–108.

Kos, L., Aronzon, A., Takayama, H., Maina, F., Ponzetto, C., Merlino, G., and Pavan, W. (1999). Hepatocyte growth factor/scatter factor-MET signaling in neural crest-derived melanocyte development. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* 12, 13–21.

Kumar, R., Angelini, S., Snellman, E., and Hemminki, K. (2004). BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *J. Invest. Dermatol.* 122, 342–348.

Kunisada, T., Yamazaki, H., Hirobe, T., Kamei, S., Omoteno, M., Tagaya, H., Hemmi, H., Koshimizu, U., Nakamura, T., and Hayashi, S.-I. (2000). Keratinocyte expression of transgenic hepatocyte growth factor affects melanocyte development, leading to dermal melanocytosis. *Mech. Dev.* 94, 67–78.

Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R., and Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358, 417–421.

Lamballe, F., Genestine, M., Caruso, N., Arce, V., Richelme, S., Helmbacher, F., and Maina, F. (2011). Pool-specific regulation of motor neuron survival by neurotrophic support. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 11144–11158.

Lander, A., Kimble, J., Clevers, H., Fuchs, E., Montarras, D., Buckingham, M., Calof, A., Trumpp, A., and Oskarsson, T. (2012). What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC Biol.* 10, 19.

Larsson, J., Blank, U., Helgadottir, H., Björnsson, J.M., Ehinger, M., Goumans, M.-J., Fan, X., Levéen, P., and Karlsson, S. (2003). TGF- β signaling-deficient hematopoietic stem cells have normal self-renewal and regenerative ability in vivo despite increased proliferative capacity in vitro. *Blood* 102, 3129–3135.

Le Douarin, N.M., Creuzet, S., Couly, G., and Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Dev. Camb. Engl.* 131, 4637–4650.

Legué, E., and Nicolas, J.-F. (2005). Hair follicle renewal: organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors. *Dev. Camb. Engl.* 132, 4143–4154.

Lekli, I., Gurusamy, N., Ray, D., Tosaki, A., and Das, D.K. (2009). Redox regulation of

stem cell mobilization. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 87, 989–995.

Lennerz, J.K., Kwak, E.L., Ackerman, A., Michael, M., Fox, S.B., Bergethon, K., Lauwers, G.Y., Christensen, J.G., Wilner, K.D., Haber, D.A., et al. (2011). MET amplification identifies a small and aggressive subgroup of esophagogastric adenocarcinoma with evidence of responsiveness to crizotinib. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 4803–4810.

Li, L., and Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 327, 542–545.

Lien, W.-H., and Fuchs, E. (2014). Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes Dev.* 28, 1517–1532.

Lindner, G., Menrad, A., Gherardi, E., Merlino, G., Welker, P., Handjiski, B., Roloff, B., and Paus, R. (2000). Involvement of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 14, 319–332.

Lo Celso, C., Prowse, D.M., and Watt, F.M. (2004). Transient activation of beta-catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours. *Dev. Camb. Engl.* 131, 1787–1799.

Lokker, N.A., Mark, M.R., Luis, E.A., Bennett, G.L., Robbins, K.A., Baker, J.B., and Godowski, P.J. (1992). Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *EMBO J.* 11, 2503–2510.

Lowry, W.E., Blanpain, C., Nowak, J.A., Guasch, G., Lewis, L., and Fuchs, E. (2005). Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev.* 19, 1596–1611.

Luo, Z., Tzivion, G., Belshaw, P.J., Vavvas, D., Marshall, M., and Avruch, J. (1996). Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature* 383, 181–185.

Maina, F., and Klein, R. (1999). Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat. Neurosci.* 2, 213–217.

Maina, F., Hilton, M.C., Ponzetto, C., Davies, A.M., and Klein, R. (1997). Met receptor

signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes Dev.* *11*, 3341–3350.

Maini, P.K., Baker, R.E., and Chuong, C.-M. (2006). Developmental biology. The Turing model comes of molecular age. *Science* *314*, 1397–1398.

Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., Mason, C.S., and Marshall, C.J. (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* *272*, 4378–4383.

Mardaryev, A.N., Meier, N., Poterlowicz, K., Sharov, A.A., Sharova, T.Y., Ahmed, M.I., Rapisarda, V., Lewis, C., Fessing, M.Y., Ruenger, T.M., et al. (2011). Lhx2 differentially regulates Sox9, Tcf4 and Lgr5 in hair follicle stem cells to promote epidermal regeneration after injury. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 4843–4852.

Maroun, C.R., Naujokas, M.A., Holgado-Madruga, M., Wong, A.J., and Park, M. (2000). The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 8513–8525.

Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* *80*, 179–185.

Marx, M., Crisanti, P., Eychène, A., Béchade, C., Laugier, D., Ghysdaël, J., Pessac, B., and Calothy, G. (1988). Activation and transduction of c-mil sequences in chicken neuroretina cells induced to proliferate by infection with avian lymphomatosis virus. *J. Virol.* *62*, 4627–4633.

Matsumoto, K., Tajima, H., and Nakamura, T. (1991). Hepatocyte growth factor is a potent stimulator of human melanocyte DNA synthesis and growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *176*, 45–51.

Maurer, G., Tarkowski, B., and Baccharini, M. (2011). Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. *Oncogene* *30*, 3477–3488.

McKay, M.M., and Morrison, D.K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* *26*, 3113–3121.

Medrano, E.E., Yang, F., Boissy, R., Farooqui, J., Shah, V., Matsumoto, K., Nordlund, J.J.,

and Park, H.Y. (1994). Terminal differentiation and senescence in the human melanocyte: repression of tyrosine-phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase 2 selectively defines the two phenotypes. *Mol. Biol. Cell* 5, 497–509.

Meloche, S. (1995). Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44mapk and p42mapk isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition. *J. Cell. Physiol.* 163, 577–588.

Meloche, S., Seuwen, K., Pagès, G., and Pouyssegur, J. (1992). Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 6, 845–854.

Merrill, B.J., Gat, U., DasGupta, R., and Fuchs, E. (2001). Tcf3 and Lef1 regulate lineage differentiation of multipotent stem cells in skin. *Genes Dev.* 15, 1688–1705.

Michalopoulos, G.K., and DeFrances, M.C. (1997). Liver regeneration. *Science* 276, 60–66.

Milagre, C., Dhomen, N., Geyer, F.C., Hayward, R., Lambros, M., Reis-Filho, J.S., and Marais, R. (2010). A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS. *Cancer Res.* 70, 5549–5557.

Miller, A.J., and Mihm, M.C. (2006). Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 355, 51–65.

Moriyama, M., Osawa, M., Mak, S.-S., Ohtsuka, T., Yamamoto, N., Han, H., Delmas, V., Kageyama, R., Beermann, F., Larue, L., et al. (2006). Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. *J. Cell Biol.* 173, 333–339.

Morris, R.J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J.S., Sawicki, J.A., and Cotsarelis, G. (2004). Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat. Biotechnol.* 22, 411–417.

Müller-Röver, S., Handjiski, B., van der Veen, C., Eichmüller, S., Foitzik, K., McKay, I.A., Stenn, K.S., and Paus, R. (2001). A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J. Invest. Dermatol.* 117, 3–15.

Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593–605.

Myung, P.S., Takeo, M., Ito, M., and Atit, R.P. (2013). Epithelial Wnt ligand secretion is required for adult hair follicle growth and regeneration. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 31–41.

Nakamura, T., Nawa, K., and Ichihara, A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *122*, 1450–1459.

Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., and Shimizu, S. (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* *342*, 440–443.

Naldini, L., Weidner, K.M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R.P., Hartmann, G., Zarnegar, R., and Michalopoulos, G.K. (1991). Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* *10*, 2867–2878.

Närhi, K., Järvinen, E., Birchmeier, W., Taketo, M.M., Mikkola, M.L., and Thesleff, I. (2008). Sustained epithelial beta-catenin activity induces precocious hair development but disrupts hair follicle down-growth and hair shaft formation. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 1019–1028.

Natali, P.G., Nicotra, M.R., Di Renzo, M.F., Prat, M., Bigotti, A., Cavaliere, R., and Comoglio, P.M. (1993). Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. *Br. J. Cancer* *68*, 746–750.

Natali, P.G., Prat, M., Nicotra, M.R., Bigotti, A., Olivero, M., Comoglio, P.M., and Di Renzo, M.F. (1996). Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *Int. J. Cancer* *69*, 212–217.

Newton-Bishop, J.A., Chang, Y.-M., Iles, M.M., Taylor, J.C., Bakker, B., Chan, M., Leake, S., Karpavicius, B., Haynes, S., Fitzgibbon, E., et al. (2010). Melanocytic nevi, nevus genes, and melanoma risk in a large case-control study in the United Kingdom. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *19*, 2043–2054.

Neyt, C., Jagla, K., Thisse, C., Thisse, B., Haines, L., and Currie, P.D. (2000). Evolutionary origins of vertebrate appendicular muscle. *Nature* *408*, 82–86.

Nishikawa, S., Kusakabe, M., Yoshinaga, K., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Era,

T., Sakakura, T., and Nishikawa, S. (1991). In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *EMBO J.* *10*, 2111–2118.

Nishimura, E.K., Yoshida, H., Kunisada, T., and Nishikawa, S.I. (1999). Regulation of E- and P-cadherin expression correlated with melanocyte migration and diversification. *Dev. Biol.* *215*, 155–166.

Nishimura, E.K., Jordan, S.A., Oshima, H., Yoshida, H., Osawa, M., Moriyama, M., Jackson, I.J., Barrandon, Y., Miyachi, Y., and Nishikawa, S.-I. (2002). Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* *416*, 854–860.

Nishimura, E.K., Granter, S.R., and Fisher, D.E. (2005). Mechanisms of Hair Graying: Incomplete Melanocyte Stem Cell Maintenance in the Niche. *Science* *307*, 720–724.

Nishimura, E.K., Suzuki, M., Igras, V., Du, J., Lonning, S., Miyachi, Y., Roes, J., Beermann, F., and Fisher, D.E. (2010). Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance. *Cell Stem Cell* *6*, 130–140.

Noramly, S., Freeman, A., and Morgan, B.A. (1999). beta-catenin signaling can initiate feather bud development. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 3509–3521.

Novak, A., Guo, C., Yang, W., Nagy, A., and Lobe, C.G. (2000). Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genes. N. Y. N* *2000* *28*, 147–155.

Nowak, J.A., Polak, L., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2008). Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell Stem Cell* *3*, 33–43.

Ochocki, J.D., and Simon, M.C. (2013). Nutrient-sensing pathways and metabolic regulation in stem cells. *J. Cell Biol.* *203*, 23–33.

Ohyama, M., Terunuma, A., Tock, C.L., Radonovich, M.F., Pise-Masison, C.A., Hopping, S.B., Brady, J.N., Udey, M.C., and Vogel, J.C. (2006). Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J. Clin. Invest.* *116*, 249–260.

Olivero, M., Rizzo, M., Madeddu, R., Casadio, C., Pennacchietti, S., Nicotra, M.R., Prat, M., Maggi, G., Arena, N., Natali, P.G., et al. (1996). Overexpression and activation of

hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br. J. Cancer* *74*, 1862–1868.

Osawa, M., Egawa, G., Mak, S.-S., Moriyama, M., Freter, R., Yonetani, S., Beermann, F., and Nishikawa, S.-I. (2005). Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche. *Development* *132*, 5589–5599.

Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K., and Barrandon, Y. (2001). Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* *104*, 233–245.

Oshimori, N., and Fuchs, E. (2012). Paracrine TGF- β signaling counterbalances BMP-mediated repression in hair follicle stem cell activation. *Cell Stem Cell* *10*, 63–75.

Otsuka, T., Takayama, H., Sharp, R., Celli, G., LaRoche, W.J., Bottaro, D.P., Ellmore, N., Vieira, W., Owens, J.W., Anver, M., et al. (1998). c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype. *Cancer Res.* *58*, 5157–5167.

Oved, S., and Yarden, Y. (2002). Signal transduction: molecular ticket to enter cells. *Nature* *416*, 133–136.

Papin, C., Eychène, A., Brunet, A., Pagès, G., Pouyssegur, J., Calothy, G., and Barnier, J.V. (1995). B-Raf protein isoforms interact with and phosphorylate Mek-1 on serine residues 218 and 222. *Oncogene* *10*, 1647–1651.

Papin, C., Denouel, A., Calothy, G., and Eychène, A. (1996). Identification of signalling proteins interacting with B-Raf in the yeast two-hybrid system. *Oncogene* *12*, 2213–2221.

Paus, R., and Foitzik, K. (2004). In search of the “hair cycle clock”: a guided tour. *Differ. Res. Biol. Divers.* *72*, 489–511.

Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J., and Sturgill, T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* *10*, 885–892.

Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G.,

Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., et al. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* *18*, 883–891.

Peschard, P., Fournier, T.M., Lamorte, L., Naujokas, M.A., Band, H., Langdon, W.Y., and Park, M. (2001). Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol. Cell* *8*, 995–1004.

Peters, E.M.J., Tobin, D.J., Botchkareva, N., Maurer, M., and Paus, R. (2002). Migration of melanoblasts into the developing murine hair follicle is accompanied by transient c-Kit expression. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *50*, 751–766.

Petrelli, A., Gilestro, G.F., Lanzardo, S., Comoglio, P.M., Migone, N., and Giordano, S. (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* *416*, 187–190.

Peyssonnaud, C., and Eychène, A. (2001). The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *93*, 53–62.

Plikus, M.V., Mayer, J.A., de la Cruz, D., Baker, R.E., Maini, P.K., Maxson, R., and Chuong, C.-M. (2008). Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature* *451*, 340–344.

Plikus, M.V., Baker, R.E., Chen, C.-C., Fare, C., de la Cruz, D., Andl, T., Maini, P.K., Millar, S.E., Widelitz, R., and Chuong, C.-M. (2011). Self-organizing and stochastic behaviors during the regeneration of hair stem cells. *Science* *332*, 586–589.

Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., et al. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* *33*, 19–20.

Potempa, S., and Ridley, A.J. (1998). Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol. Biol. Cell* *9*, 2185–2200.

Poulikakos, P.I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K.M., and Rosen, N. (2010). RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* *464*, 427–

Poynter, J.N., Elder, J.T., Fullen, D.R., Nair, R.P., Soengas, M.S., Johnson, T.M., Redman, B., Thomas, N.E., and Gruber, S.B. (2006). BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Res.* *16*, 267–273.

Pritchard, C.A., Samuels, M.L., Bosch, E., and McMahon, M. (1995). Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 6430–6442.

Pritchard, C.A., Bolin, L., Slattery, R., Murray, R., and McMahon, M. (1996). Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr. Biol.* *6*, 614–617.

Rabbani, P., Takeo, M., Chou, W., Myung, P., Bosenberg, M., Chin, L., Taketo, M.M., and Ito, M. (2011). Coordinated Activation of Wnt in Epithelial and Melanocyte Stem Cells Initiates Pigmented Hair Regeneration. *Cell* *145*, 941–955.

Rapp, U.R., Goldsborough, M.D., Mark, G.E., Bonner, T.I., Groffen, J., Reynolds, F.H., and Stephenson, J.R. (1983). Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 4218–4222.

Rathman-Josserand, M., Genty, G., Lecardonnell, J., Chabane, S., Cousson, A., François Michelet, J., and Bernard, B.A. (2013). Human hair follicle stem/progenitor cells express hypoxia markers. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 2094–2097.

Raymond, K., Deugnier, M.-A., Faraldo, M.M., and Glukhova, M.A. (2009). Adhesion within the stem cell niches. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 623–629.

Reddy, S., Andl, T., Bagasra, A., Lu, M.M., Epstein, D.J., Morrisey, E.E., and Millar, S.E. (2001). Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. *Mech. Dev.* *107*, 69–82.

Rendl, M., Lewis, L., and Fuchs, E. (2005). Molecular dissection of mesenchymal-epithelial interactions in the hair follicle. *PLoS Biol.* *3*, e331.

Reynolds, A.J., and Jahoda, C.A. (1992). Cultured dermal papilla cells induce follicle

formation and hair growth by transdifferentiation of an adult epidermis. *Dev. Camb. Engl.* *115*, 587–593.

Ridley, A.J., Comoglio, P.M., and Hall, A. (1995). Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 1110–1122.

Rompolas, P., Deschene, E.R., Zito, G., Gonzalez, D.G., Saotome, I., Haberman, A.M., and Greco, V. (2012). Live imaging of stem cell and progeny behaviour in physiological hair-follicle regeneration. *Nature* *487*, 496–499.

Rong, S., Segal, S., Anver, M., Resau, J.H., and Vande Woude, G.F. (1994). Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 4731–4735.

Rushworth, L.K., Hindley, A.D., O'Neill, E., and Kolch, W. (2006). Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2262–2272.

Saldana-Caboverde, A., and Kos, L. (2010). Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* *23*, 160–170.

Schiering, N., Knapp, S., Marconi, M., Flocco, M.M., Cui, J., Perego, R., Rusconi, L., and Cristiani, C. (2003). Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the hepatocyte growth factor receptor c-Met and its complex with the microbial alkaloid K-252a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12654–12659.

Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* *103*, 211–225.

Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* *373*, 699–702.

Schmidt, L., Duh, F.M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S.W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M., et al. (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.* *16*, 68–73.

Schmidt-Ullrich, R., and Paus, R. (2005). Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *27*, 247–261.

Schneider, M.R., Schmidt-Ullrich, R., and Paus, R. (2009). The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr. Biol. CB 19*, R132-142.

Schulze-Bergkamen, H., Brenner, D., Krueger, A., Suess, D., Fas, S.C., Frey, C.R., Dax, A., Zink, D., Büchler, P., Müller, M., et al. (2004). Hepatocyte growth factor induces Mcl-1 in primary human hepatocytes and inhibits CD95-mediated apoptosis via Akt. *Hepatol. Baltim. Md 39*, 645–654.

Shyh-Chang, N., Daley, G.Q., and Cantley, L.C. (2013). Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Dev. Camb. Engl. 140*, 2535–2547.

Sick, S., Reinker, S., Timmer, J., and Schlake, T. (2006). WNT and DKK determine hair follicle spacing through a reaction-diffusion mechanism. *Science 314*, 1447–1450.

Sonnenberg, E., Weidner, K.M., and Birchmeier, C. (1993). Expression of the met-receptor and its ligand, HGF-SF during mouse embryogenesis. *EXS 65*, 381–394.

Stark, J., Andl, T., and Millar, S.E. (2007). Hairy math: insights into hair-follicle spacing and orientation. *Cell 128*, 17–20.

Steingrímsson, E., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2006). Mouse coat color mutations: From fancy mice to functional genomics. *Dev. Dyn. 235*, 2401–2411.

Stenn, K.S., and Paus, R. (2001). Controls of hair follicle cycling. *Physiol. Rev. 81*, 449–494.

Stern, C.D., Ireland, G.W., Herrick, S.E., Gherardi, E., Gray, J., Perryman, M., and Stoker, M. (1990). Epithelial scatter factor and development of the chick embryonic axis. *Dev. Camb. Engl. 110*, 1271–1284.

Stewart, F. (1996). Roles of mesenchymal-epithelial interactions and hepatocyte growth factor-scatter factor (HGF-SF) in placental development. *Rev. Reprod. 1*, 144–148.

St-Jacques, B., Dassule, H.R., Karavanova, I., Botchkarev, V.A., Li, J., Danielian, P.S., McMahon, J.A., Lewis, P.M., Paus, R., and McMahon, A.P. (1998). Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr. Biol. CB 8*, 1058–1068.

Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M., and Gray, J. (1987). Scatter factor is a fibroblast-

derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 327, 239–242.

Storm, S.M., Cleveland, J.L., and Rapp, U.R. (1990). Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene* 5, 345–351.

Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., et al. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 487, 500–504.

Tachibana, M. (1999). Sound needs sound melanocytes to be heard. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* 12, 344–354.

Takayama, H., La Rochelle, W.J., Anver, M., Bockman, D.E., and Merlino, G. (1996). Scatter factor/hepatocyte growth factor as a regulator of skeletal muscle and neural crest development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5866–5871.

Takayama, H., LaRochelle, W.J., Sharp, R., Otsuka, T., Kriebel, P., Anver, M., Aaronson, S.A., and Merlino, G. (1997). Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 701–706.

Takeda, N., Jain, R., Leboeuf, M.R., Padmanabhan, A., Wang, Q., Li, L., Lu, M.M., Millar, S.E., and Epstein, J.A. (2013). Hopx expression defines a subset of multipotent hair follicle stem cells and a progenitor population primed to give rise to K6+ niche cells. *Dev. Camb. Engl.* 140, 1655–1664.

Takeo, M., Lee, W., Rabbani, P., Sun, Q., Hu, H., Lim, C.H., Manga, P., and Ito, M. (2016). EdnrB Governs Regenerative Response of Melanocyte Stem Cells by Crosstalk with Wnt Signaling. *Cell Rep.* 15, 1291–1302.

Tanimura, S., Tadokoro, Y., Inomata, K., Binh, N.T., Nishie, W., Yamazaki, S., Nakauchi, H., Tanaka, Y., McMillan, J.R., Sawamura, D., et al. (2011). Hair Follicle Stem Cells Provide a Functional Niche for Melanocyte Stem Cells. *Cell Stem Cell* 8, 177–187.

Thomas, S., Thomas, M., Wincker, P., Babarit, C., Xu, P., Speer, M.C., Munnich, A., Lyonnet, S., Vekemans, M., and Etchevers, H.C. (2008). Human neural crest cells display molecular and phenotypic hallmarks of stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3411–3425.

Tiede, S., Kloepper, J.E., Bodò, E., Tiwari, S., Kruse, C., and Paus, R. (2007). Hair follicle stem cells: walking the maze. *Eur. J. Cell Biol.* 86, 355–376.

Tulasne, D., Paumelle, R., Leroy, C., Reveneau, S., Vandebunder, B., and Fafeur, V. (2002). Involvement of RAS-ERK signaling in multiple biological responses to HGF/SF. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973, 105–108.

Tumbar, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W.E., Rendl, M., and Fuchs, E. (2004). Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin. *Science* 303, 359–363.

Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T., and Kitamura, N. (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702–705.

Ujiie, H., Tomida, M., Akiyama, H., Nakajima, Y., Okada, D., Yoshino, N., Takiguchi, Y., and Tanzawa, H. (2012). Serum hepatocyte growth factor and interleukin-6 are effective prognostic markers for non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 32, 3251–3258.

Urbé, S., Mills, I.G., Stenmark, H., Kitamura, N., and Clague, M.J. (2000). Endosomal localization and receptor dynamics determine tyrosine phosphorylation of hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7685–7692.

Valluet, A., Druillennec, S., Barbotin, C., Dorard, C., Monsoro-Burq, A.H., Larcher, M., Pouponnot, C., Baccarini, M., Larue, L., and Eychène, A. (2012). B-Raf and C-Raf are required for melanocyte stem cell self-maintenance. *Cell Rep.* 2, 774–780.

Van Mater, D., Kolligs, F.T., Dlugosz, A.A., and Fearon, E.R. (2003). Transient activation of beta -catenin signaling in cutaneous keratinocytes is sufficient to trigger the active growth phase of the hair cycle in mice. *Genes Dev.* 17, 1219–1224.

Wadewitz, A.G., Winer, M.A., and Wolgemuth, D.J. (1993). Developmental and cell lineage specificity of raf family gene expression in mouse testis. *Oncogene* 8, 1055–1062.

Watt, F.M. (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J.* 21, 3919–3926.

Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004a). The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 875–885.

Wellbrock, C., Ogilvie, L., Hedley, D., Karasarides, M., Martin, J., Niculescu-Duvaz, D., Springer, C.J., and Marais, R. (2004b). V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res.* *64*, 2338–2342.

Weston, J.A. (1991). Sequential segregation and fate of developmentally restricted intermediate cell populations in the neural crest lineage. *Curr. Top. Dev. Biol.* *25*, 133–153.

Wojnowski, L., Stancato, L.F., Zimmer, A.M., Hahn, H., Beck, T.W., Larner, A.C., Rapp, U.R., and Zimmer, A. (1998). Crf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech. Dev.* *76*, 141–149.

Wojnowski, L., Stancato, L.F., Larner, A.C., Rapp, U.R., and Zimmer, A. (2000). Overlapping and specific functions of Braf and Crf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* *91*, 97–104.

Wolf, I., Rubinfeld, H., Yoon, S., Marmor, G., Hanoch, T., and Seger, R. (2001). Involvement of the activation loop of ERK in the detachment from cytosolic anchoring. *J. Biol. Chem.* *276*, 24490–24497.

Woo, S.-H., Baba, Y., Franco, A.M., Lumpkin, E.A., and Owens, D.M. (2012). Excitatory glutamate is essential for development and maintenance of the piloneural mechanoreceptor. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 740–748.

Xiao, G.H., Jeffers, M., Bellacosa, A., Mitsuuchi, Y., Vande Woude, G.F., and Testa, J.R. (2001). Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 247–252.

Yajima, I., and Larue, L. (2008). The location of heart melanocytes is specified and the level of pigmentation in the heart may correlate with coat color. *Pigment Cell Melanoma Res.* *21*, 471–476.

Yamamoto, Y., Livet, J., Pollock, R.A., Garces, A., Arce, V., deLapeyrière, O., and Henderson, C.E. (1997). Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is a muscle-derived survival factor for a subpopulation of embryonic motoneurons. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 2903–2913.

Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple

substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors Chur Switz*. 24, 21–44.

Youssef, K.K., Van Keymeulen, A., Lapouge, G., Beck, B., Michaux, C., Achouri, Y., Sotiropoulou, P.A., and Blanpain, C. (2010). Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat. Cell Biol.* 12, 299–305.

Zeng, Z.-S., Weiser, M.R., Kuntz, E., Chen, C.-T., Khan, S.A., Forslund, A., Nash, G.M., Gimbel, M., Yamaguchi, Y., Culliford, A.T., et al. (2008). c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases. *Cancer Lett.* 265, 258–269.

Zhang, Y., Andl, T., Yang, S.H., Teta, M., Liu, F., Seykora, J.T., Tobias, J.W., Piccolo, S., Schmidt-Ullrich, R., Nagy, A., et al. (2008). Activation of beta-catenin signaling programs embryonic epidermis to hair follicle fate. *Dev. Camb. Engl.* 135, 2161–2172.

Zhang, Y.V., Cheong, J., Ciapurin, N., McDermitt, D.J., and Tumber, T. (2009). Distinct Self-Renewal and Differentiation Phases in the Niche of Infrequently Dividing Hair Follicle Stem Cells. *Cell Stem Cell* 5, 267–278.

Zou, H.Y., Li, Q., Lee, J.H., Arango, M.E., McDonnell, S.R., Yamazaki, S., Koudriakova, T.B., Alton, G., Cui, J.J., Kung, P.-P., et al. (2007). An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res.* 67, 4408–4417.

ANNEXE

RAF proteins exert both specific and compensatory functions during tumor progression of NRAS-driven melanoma

Coralie Dorard^{1,2,3,4,5}, Céline Barbotin^{1,2,3,4,5}, Magalie Larcher^{1,2,3,4,5}, Alexandra Garancher^{1,2,3,4}, Jessy Leloup^{1,2,3,4,5}, Friedrich Beermann⁶, Manuela Baccarini⁷, Celio Pouponnot^{1,2,3,4}, Lionel Larue^{1,2,3,4,5}, Alain Eychène^{1,2,3,4,5*} and Sabine Druillennec^{1,2,3,4,5*}

¹ Institut Curie, Orsay F-91405, France

² INSERM U1021, Centre Universitaire, Orsay F-91405, France

³ CNRS UMR 3347, Centre Universitaire, Orsay F-91405, France

⁴ Université Paris Sud-11, Orsay F-91405, France

⁵ Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer

⁶ Swiss Institute for Experimental Cancer Research (ISREC), Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne 1015, Switzerland

⁷ Max F. Perutz Laboratories, Center for Molecular Biology, University of Vienna, Vienna 1030, Austria

Running title: BRAF and CRAF contribution to NRAS-driven melanoma

Keywords: ARAF; BRAF; CRAF; Melanoma; resistance

*Correspondence:

Dr. Sabine Druillennec

E-mail : sabine.druillennec-rodriere@curie.fr

Dr. Alain Eychène

E-mail : eychene@curie.fr

Institut Curie - Recherche

Bâtiment 110, Centre Universitaire

91405 - ORSAY Cedex, FRANCE

Tel. 33-1 69 86 30 41

Fax. 33-1 69 86 30 51

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

SUMMARY:

NRAS and its downstream effector BRAF are frequently mutated in melanoma. Paradoxically, CRAF but not BRAF was shown to be critical for various RAS-driven cancers, raising the question of the role of RAF proteins in NRAS-induced melanoma. Using conditional ablation of *Raf* genes in NRAS-induced mouse melanoma models, we investigated their contribution in tumor progression, from the onset of benign tumors to malignant tumor maintenance. We show that BRAF expression is absolutely required for nevi development, demonstrating a critical role in the early stages of NRAS-driven melanoma. After melanoma formation, single *Braf* or *Craf* ablation is not sufficient to block tumor growth, showing redundant functions for RAF kinases. Finally, proliferation of resistant cells emerging in the absence of BRAF and CRAF remains dependent on ARAF-mediated ERK activation. These results reveal specific and compensatory functions for BRAF and CRAF and highlight an addiction to RAF signaling in NRAS-driven melanoma.

INTRODUCTION

Melanomagenesis is a multistep process arising from the transformation of skin melanocytes and leading to cutaneous melanoma, the most devastating type of skin cancer due to its highly metastatic potential¹. Activation of the RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway is found in the vast majority of melanomas and often occurs through mutations of either NRAS or BRAF (15-20% and 40-50% cutaneous melanomas, respectively)^{2,3}. These driver mutations represent a very early event found in benign melanocytic lesions, called nevi, and are maintained throughout all stages of invasive and metastatic melanoma. The development of drugs such as Vemurafenib and Dabrafenib, which selectively inhibit BRAF^{V600E}, the most frequent BRAF mutation, represents a major breakthrough in melanoma treatment, triggering an response rate of 80% in phase I clinical trials and an overall survival benefit in phase III studies^{4,5}. Unfortunately, resistances rapidly occur and most of responding patients relapse after 5-6 months of treatment⁶. In addition, such compounds cannot be used to treat half of melanoma patients, especially those harboring NRAS mutations, since BRAF inhibitors paradoxically activate the MAPK/ERK pathway in BRAF wild-type cells^{7,8}. Indeed, BRAF^{V600E} and NRAS mutations, although mutually exclusive, are not strictly equivalent and the contribution of RAF signaling downstream of NRAS remained to be clarified⁹⁻¹¹.

Despite much attention being focused on BRAF mutant melanoma, NRAS was the first melanoma oncogene to be identified¹², and mutations in NRAS, KRAS and HRAS are present in about 20%, 2% and 1% of all melanomas, respectively¹³. NRAS^{Q61K/R/L} are the most frequent NRAS mutations, although point mutations at positions 12 and 13 also occur occasionally. Substantial evidence supports the RAF/MAPK pathway as a key downstream effector of oncogenic RAS in melanoma¹⁴, although other RAS downstream signaling pathways such as the phospho-inositide-3-kinase (PI3K), RAC1 and RAL also contribute to melanomagenesis¹⁵⁻¹⁷. Under physiological conditions in melanocytes, growth factors such as HGF and SCF activate RAS, which in turn binds its effectors, including RAF proteins^{18,19}. In vertebrates, there exists three RAF proteins called ARAF, BRAF and CRAF that activate MAPK-ERK kinases (MEK1 and MEK2), which in turn activate extracellular signal-regulated kinases (ERK1 and ERK2)²⁰. Using knockout mice, we have shown that BRAF and CRAF are not necessary

for melanocyte lineage development, but are required for and play redundant functions in melanocyte stem cell self-maintenance ²¹.

In NRAS-mutated human melanoma cell lines, CRAF has been proposed to be the major ERK activator ⁹. However, paradoxical activation of the MAPK/ERK pathway by BRAF inhibitors is observed in NRAS-mutated melanoma and results from the recruitment of inhibited BRAF at the membrane where it acts as a scaffold to enhance CRAF activity ⁸. Alternative mechanisms have been proposed that rely on either transactivation of RAF dimers or disruption of RAF inhibitory autophosphorylation by BRAF inhibitors ^{22,23}. A critical role for CRAF in RAS-driven skin tumorigenesis as well as in KRAS-induced lung cancer has been demonstrated in mouse models, suggesting that CRAF could be the prevalent effector in RAS-driven cancers ^{24 26}. Intriguingly, while BRAF is mutated in up to 50% of melanoma, no CRAF mutation was found so far, suggesting that oncogenic CRAF activation may not be sufficient for tumor initiation ²⁷. Therefore, the assumption that BRAF but not CRAF could be dispensable for NRAS-induced melanoma appears paradoxical.

To address this question, we reevaluated the respective contribution of RAF kinases in RAS-induced melanoma using NRAS^{Q61K}-induced mouse melanoma models in which single or compound ablation of *Braf* and *Craf* genes can be achieved in the melanocyte lineage upon tyrosinase promoter-driven Cre or Cre^{ERT2} expression ^{21,28,29}. Importantly, we previously reported that neither single nor double deletion of BRAF and CRAF affected the early development of the melanocyte lineage in a wild-type NRAS background. In addition, double but not single knockout mice developed a hair graying phenotype after the first hair molting, which occurs after three weeks of life ²¹. Because the early development of the lineage is not altered in BRAF and CRAF knockouts, these models allowed us to investigate the role of both RAF kinases in tumor progression from initiation to malignant melanoma.

Our results showed that BRAF, but not CRAF, was critical for the formation of early skin melanocytic lesions, including nevi-like benign tumors. Single knockout of either CRAF or BRAF was not sufficient to prevent malignant tumor growth and maintenance *in vivo* and cell proliferation *in vitro*. In contrast, concomitant ablation of both BRAF and CRAF resulted in a complete blockage of tumor growth. This cooperative effect on cell proliferation was also observed in NRAS-mutated human melanoma cell lines. Finally, ablation of BRAF and CRAF lead to the emergence of resistant cells

showing an ARAF-dependent reactivation of ERK and cell proliferation. Taken together, these results show that RAF signaling is absolutely required downstream of NRAS, and disclose both specific and compensatory functions for BRAF and CRAF kinases in NRAS-induced mouse melanoma.

RESULTS

BRAF is required for early steps of NRAS^{Q61K}-driven melanomagenesis

The role of BRAF and CRAF kinases in NRAS-induced cutaneous melanoma was assessed by inactivating *Raf* genes in the *Tyr::NRAS^{Q61K/0};Ink4a^{+/-}* transgenic mouse model²⁸. Constitutive expression of an activated form of human NRAS (NRAS^{Q61K}) in the melanocytic lineage results in spontaneous cutaneous melanoma development, a process that is accelerated on an *Ink4a*-deficient background. Inactivation of *Raf* genes into the melanocyte lineage was performed by crossing double *Braf^{fl/fl};Craf^{fl/fl}* or single *Braf^{fl/fl};Craf^{+/+}* or *Braf^{+/+};Craf^{fl/fl}* conditional knockout mice²¹ to the *Tyr::Cre⁰* transgenic mice, in which the *Tyrosinase* promoter is active from embryonic day E10.5 to adulthood³⁰. Conversion of floxed alleles by Cre recombinase and loss of BRAF and/or CRAF expression were demonstrated previously²¹. The resulting genotype of mouse lines is (*Braf^{fl/fl};Craf^{+/+};Tyr::NRAS^{Q61K/0};Ink4a^{+/-};Tyr::Cre⁰*), (*Braf^{+/+};Craf^{fl/fl};Tyr::NRAS^{Q61K/0};Ink4a^{+/-};Tyr::Cre⁰*) and (*Braf^{fl/fl};Craf^{fl/fl};Tyr::NRAS^{Q61K/0};Ink4a^{+/-};Tyr::Cre⁰*), respectively named BRAF KO, CRAF KO and BRAF/CRAF KO in the manuscript. Mice were also crossed to *Dct::LacZ⁰* reporter mice in order to trace cells from the melanocyte lineage³¹.

In agreement with previous reports^{28,32,33}, *Tyr::NRAS^{Q61K/0};Ink4a^{+/-}* control mice, when compared to wild-type mice, rapidly started to develop a highly hyperpigmented phenotype within the first week, which was remarkable on dorsal skin after depilation at 6 months (Figure 1A). This phenotype was associated with the presence of a high number of black dome-shaped nevi (Figure 1B). As shown on histological sections of adult back skin (Figure 1C), hyperpigmentation was linked to an abnormal localization of melanin deposits and numerous melanocytes in the papillary dermis close to the epidermis, compared to wild-type mice. Melanin-containing melanophages are also present particularly in the subcutaneous fat layer. Importantly, staining for β -galactosidase activity on dorsal skin from newborn (P0.5) animals indicated that NRAS^{Q61K} did not affect the normal development of the melanocytic lineage before birth (Figure S1), as previously reported³³. In contrast, at P10, while melanocytes were mainly located in the hair shaft and the bulb in normal mice, they accumulated in clusters at the epidermis/dermis junction and in intra-follicular part of the dermis in NRAS^{Q61K} control mice (Figure 1D) leading to hyperpigmentation and nevi emergence³³.

Deletion of both BRAF and CRAF upon Cre expression in melanocytic cells induced a complete reversion of the hyperpigmented phenotype since double knockout mice were indistinguishable from wild-type mice with a normal light skin (Figure 1A). Like in wild-type mice, only a very few number of weakly pigmented and flat spots were present (Figure 1B). No abnormal localization of melanocytes or melanin-deposits was observed in adult skin (Figure 1C). Likewise, LacZ positive cells at P10 were mainly located in the hair follicle as found in wild-type animals (Figure 1D). Of note, the development of the normal melanocytic lineage at stages preceding the appearance of the NRAS phenotype was not affected in BRAF/CRAF KO animals (Figure S1), as previously reported²¹. These observations demonstrated that RAF signaling is required downstream of NRAS^{Q61K} for the development of the associated phenotype.

Single deletion of either BRAF or CRAF gave rise to markedly different phenotypes (Figure 1A-C). While CRAF-deficient mice developed only a weakly altered hyperpigmented phenotype, BRAF-deficient mice displayed a nearly complete reversion of the phenotype. In CRAF-deficient mice, dorsal skin appeared dark, with numerous nevi. Histological analyses revealed the presence of aberrant location of melanocytes and melanin-deposit in the dermis and fat layer. This suggested that CRAF was weakly required for NRAS-induced hyperpigmentation. In contrast, BRAF deletion resulted in a pigmentation pattern similar to that of double knockout or wild-type mice. Only a few numbers of pigmented spots were observed, and skin sections were nearly unpigmented. We quantified the skin lesions by counting the number of pigmented spots per cm² on the back of BRAF KO or CRAF KO mice (Figure 1E). Tenfold more spots were counted in CRAF-deficient compared to BRAF-deficient skin portions. In addition, these skin lesions displayed characteristics of highly pigmented and dome-shaped nevi in CRAF KO animals, whereas they were very weakly pigmented and remained flat in BRAF KO animals. We analysed the distribution of melanocytes in P10 skins of both single knockouts and counted the number of LacZ-positive cells per microscopic field in the dermis (Figure 1F). The localization of melanocytes in BRAF-deficient mice was not different from that of double knockout animals. In contrast, we observed a significantly higher number of dermal melanocytes in CRAF KO compared to BRAF KO, in agreement with the higher number of nevi found in adult skins. Taken together, these results show that although BRAF is dispensable for normal melanocyte lineage

development and homeostasis ²¹, it is critical for NRAS-induced hyperpigmentation and nevi formation.

We then looked at the emergence of melanoma in single and double *Raf* knockout animals. 53.5% of *Tyr::NRAS^{Q61K/0};Ink4a^{+/-}* control mice (31 out of 58) developed melanoma with an average latency of 10.8 ± 2.7 months (Figure 1G). No tumor was observed in BRAF KO and BRAF/CRAF KO mice, in agreement with the lack of hyperpigmented phenotype upon early BRAF deletion, thereby confirming the requirement of BRAF for tumor initiation. Conversely, 21% of CRAF KO animals (7 out of 33) displayed melanoma with an average higher latency of 15.7 ± 1.8 months. The lower incidence and longer latency compared to control mice could be either in favor of a role for CRAF in tumor growth or due to the mild effect of its early deletion on hyperpigmentation and nevi appearance as described above.

Taken together, these results demonstrate a specific function for BRAF during the early stages of melanomagenesis that cannot be compensated by CRAF.

BRAF and CRAF display compensatory functions during late stages of NRAS^{Q61K}-driven melanomagenesis

In order to study the respective roles of BRAF and CRAF in melanoma growth after tumor initiation, we generated a second NRAS-mutated melanoma model in which *Raf* gene ablation is controlled in a spatio-temporal manner by using the *Tyr::CreERT2⁰* transgene expressing a tamoxifen-inducible Cre recombinase ²⁹. Control animals (67%, 117 of 174) developed cutaneous melanoma within about 8 months after birth (8.1 ± 2.3 months) (data not shown).

We first attempted to look at the effect of *Raf* gene ablation by directly treating the tumors of the different genotypes with tamoxifen but did not observe tumor regression whatever the genotype studied but in most cases, complete recombination of floxed *Raf* alleles was not achieved (data not shown). Therefore, we looked at the consequence of *Raf* genes ablation on tumor growth by comparing the effect of tamoxifen and vehicle treatment on the same primary tumor subcutaneously transplanted into two identical cohorts of nude mice. In parallel, we also looked at the effect of *Raf* genes ablation in vitro, on melanoma cultures established from primary mouse tumors and treated with

4-hydroxy-tamoxifen (4OHT). Treatment of control tumors with tamoxifen or control cultures with 4OHT did not affect tumor growth and cell proliferation, respectively (Figure S2). As shown on Figure 2A, tamoxifen administration totally blocked tumor growth in mice grafted with double $Braf^{flf};Craf^{flf}$ tumors, compared to vehicle. Consequently, we were unable to collect any tumor material at the end of the experiment in tamoxifen-treated animals. *In vitro*, 4OHT-induced recombination was highly efficient in double $Braf^{flf};Craf^{flf}$ melanoma cell culture since BRAF and CRAF expression was nearly undetectable at day 4 and completely abolished at day 7 of treatment (Figure 2B). Moreover, the concomitant loss of BRAF and CRAF impaired MAPK pathway activation as evidenced by western blot analysis of MEK and ERK phosphorylation status (Figure 2B) and strongly inhibited cell proliferation (Figure 2C). Cell cycle analyses revealed that BRAF and CRAF double knockout cells accumulated into G0/G1 phase resulting in a fewer proportion of cells in S-phase compared to DMSO-treated samples (Figure 2D). Cell cycle arrest was not accompanied by cell death since no increase of the sub-G1 fractions in FACS profiles or induction of caspase 3 activity were observed during treatment (data not shown). Taken together, these results demonstrated that the RAF/MAPK pathway is absolutely required for NRAS^{Q61K}-driven tumor growth in melanoma.

The same strategy was used to study *in vivo* and *in vitro* the respective functions of BRAF or CRAF in tumors from single $Braf^{flf};Craf^{+/+}$ and $Braf^{+/+};Craf^{flf}$ knockouts. Western blot analyses confirmed the efficient recombination of floxed alleles upon Cre activation by showing a complete loss of BRAF or CRAF expression in solid tumors and in cultures after treatment by tamoxifen or 4OHT, respectively (Figures 3B&D and Figures 3F&H, respectively). Interestingly, BRAF loss had no effect on either tumor growth or cell proliferation (Figures 3A&C). CRAF depletion reproducibly induced a very weak effect on tumor growth and a mild slowdown of cell proliferation (Figures 3E&G). Following BRAF or CRAF loss *in vitro*, only a modest decrease in MEK and ERK phosphorylation was observed at day 4 of treatment and the levels of MEK and ERK activation returned to normal at day 7. These results demonstrated that, in contrast to the striking effect obtained with the double BRAF/CRAF deletion, neither CRAF nor BRAF loss alone was sufficient to efficiently block tumor growth and cell proliferation. This strongly suggested that compensatory effects between BRAF and CRAF could rapidly take place. To verify this hypothesis at the molecular level, we looked at the ability of

endogenous BRAF and CRAF to interact with NRAS by performing *in situ* proximity ligation assays (PLA). Results in Figures 4A and 4B showed the presence of both NRAS/BRAF and NRAS/CRAF complexes in control parental cells. The specificity of the PLA signal was confirmed by the absence of signal in BRAF- or CRAF-depleted cells. These findings were confirmed by co-immunoprecipitation experiments using an NRAS specific antibody that enabled to detect interactions between NRAS and both BRAF and CRAF (Figure S3). In agreement with the lack of effect of BRAF depletion on growth curve and cell proliferation, the kinase activity of CRAF was comparable in both parental and BRAF KO cells (Figure 4C). In contrast, BRAF kinase activity was increased in CRAF KO cells (Figure 4D), explaining the compensatory effect of BRAF in the absence of CRAF. Taken together these results led us to propose that while CRAF acts as the predominant kinase downstream of NRAS^{Q61K} to sustain melanoma growth, its loss can be rapidly compensated by BRAF.

NRAS-mutated human melanoma cells require both BRAF and CRAF for ERK activation and proliferation

It has been previously reported that in RAS-mutated human melanoma cell lines, CRAF but not BRAF was required for MAPK activation presumably because BRAF cannot be activated when RAS is mutated⁹. Our observations in the mouse model being in apparent discrepancy with these conclusions, we reinvestigated the respective functions of BRAF and CRAF by using RNA interference experiments in three human melanoma cell lines harboring NRAS mutations: WM1361 (NRAS^{Q61K}), WM852 (NRAS^{Q61R}) and Sbc12 (NRAS^{Q61K}). Western blot analyses showed the efficiency of BRAF and/or CRAF depletion by two distinct siRNA couples (siBRAF1/siCRAF1 and siBRAF2/siCRAF2 in Figure 5A and Figure S4A, respectively). Proliferation rate was also measured after BrdU incorporation (Figure 5B and Figure S4B). Consistent results were obtained in the three different cell lines. Down regulation of CRAF expression induced a decrease in ERK activation as reported⁹ and affected cell proliferation. However, BRAF depletion also affected ERK phosphorylation and proliferation, although the effects were less pronounced than upon CRAF depletion. More importantly, the concomitant down regulation of both BRAF and CRAF expression strongly inhibited ERK phosphorylation and proliferation. Taken together, these results indicated that

when CRAF is knocked down in NRAS-mutated human melanoma cell lines, BRAF is able to compensate to maintain MAPK activation and proliferation. Accordingly, PLA experiments proved that not only CRAF but also BRAF could form complexes with NRAS in NRAS-mutated human melanoma cell lines (Figure 5C). Therefore, the compensatory effects of RAF kinases is a conserved mechanism between human and murine NRAS-driven melanoma, since neither CRAF, nor BRAF loss alone is sufficient to block melanoma cell proliferation in both species.

Emergence of an ARAF-dependent mechanism of resistance upon concomitant BRAF- and CRAF- depletion in NRAS-mutated melanoma cells

As shown in Figure 2C, 4OHT-induced concomitant loss of BRAF and CRAF completely inhibited cell proliferation. However, at the end of the treatment, we observed the emergence of resistant clones that enabled us to establish double BRAF and CRAF knockout melanoma cultures. These resistant cultures were not due to an escape from the treatment since the total absence of BRAF and CRAF protein expression was stably maintained during passages (Figure 6B). Western blot analyses revealed a reactivation of the MAPK pathway as evidenced by the level of ERK phosphorylation in resistant cells compared to control parental cells. Treatment by U0126 MEK inhibitor (U0) strongly inhibited ERK phosphorylation and cell proliferation of both control and resistant cells (Figures 6A and 6B), indicating that the implemented mechanism of resistance was still dependent of the RAF/MEK/ERK pathway. In addition, western blot and qRT-PCR analyses (Figures 6B and 6C) demonstrated that ARAF expression, the third member of the RAF kinases family, was increased in double BRAF- and CRAF-deficient resistant cultures. We therefore examined whether ARAF could be involved in this resistance by using short hairpin RNA vectors (shRNA) targeting ARAF. We tested three different sequences and identified two shRNAs (shARAF.1 and shARAF.3) that efficiently down regulated ARAF expression in control and resistant cells (Figures 6E and 6G, respectively). ARAF down regulation induced a decrease in ERK phosphorylation in absence of BRAF and CRAF, whereas its depletion had no effect on MAPK activation in control cells. Interestingly, the levels of ARAF expression achieved by the different shRNAs strictly correlated with the levels of ERK phosphorylation. Crystal violet staining of mass cultures at the end of puromycin selection revealed

that ARAF down regulation prevented cell proliferation in resistant cells but not in control parental cells expressing BRAF and CRAF (Figures 6D and 6F). Taken together, these data strongly supported that loss of BRAF and CRAF in NRAS-mutated murine melanoma cells induced resistances involving a compensatory effect of ARAF.

DISCUSSION

Aberrant RAS activation plays causal role in human cancer with an estimated 30% of human tumors harboring somatic oncogenic mutations mainly in KRAS, but also in NRAS and HRAS. NRAS mutations occur in approximately 20% of human cutaneous melanomas, while HRAS and KRAS mutations are rare in this disease². NRAS mutations represent an early event in the oncogenic process since 15-20% of benign common nevi and more than 80% of congenital nevi are found mutated³⁴. In *Tyr::NRAS^{Q61K}/p* transgenic mice, constitutive expression of an activated human *NRAS* allele in melanocytes results in early benign lesions characterized by an hyperpigmented skin and appearance of nevi that can eventually progress to cutaneous melanoma on an *Ink4a*-deficient background^{28,32}. This model enabled us to evaluate the respective contribution of BRAF and/or CRAF from initiation of melanoma to tumor maintenance by using a conditional approach.

Concomitant loss of BRAF and CRAF in melanocytic lineage completely reversed the hyperpigmented phenotype without affecting the normal development of melanocytes and prevented tumor onset. Likewise, once melanoma have developed, tamoxifen-induced deletion of both kinases completely blocked tumor growth *in vivo* and cell proliferation *in vitro*, the latter being associated with a strong impairment in ERK activation and cell cycle arrest. Other RAS downstream signaling pathways such as RAL and RAC1 have been also implicated in NRAS-driven melanoma^{17,33}. The role of the PI3K/AKT pathway is less well characterized. NRAS mutant melanomas rarely harbor either mutations in, or silencing of the negative regulator of the PI3K pathway, phosphatase and tensin homolog (PTEN) and exhibit lower levels of constitutive AKT signaling than those with BRAF mutations³⁵. Whatever the level of contribution of these signaling pathways in RAS-induced melanoma, our results demonstrate that the RAF/MEK/ERK pathway is absolutely required downstream of NRAS^{Q61K} from initiation to tumor maintenance. Interestingly, resistant colonies emerged in the absence of BRAF and CRAF expression following tamoxifen treatment of melanoma cell cultures. These cells displayed normal levels of ERK activation compared to parental culture and their proliferation was dependent on the MAPK-ERK pathway. We demonstrated that ARAF, which had never been involved in melanoma so far, was responsible for MAPK activation and cell proliferation. This mechanism of resistance not only further supports the critical role of RAF signaling

pathway in melanoma, but also highlights its high plasticity in these tumors, which results from the compensatory functions of RAF kinases.

We recently reported similar compensatory effects of RAF kinases in the normal melanocytic lineage homeostasis. Double BRAF and CRAF knockout but not single knockout mice develop a progressive hair graying phenotype because of a defect in melanocyte stem cells self-renewal in the hair follicle²¹. In contrast, BRAF and CRAF were not required for melanocyte lineage development. Interestingly, although concomitant ablation of BRAF and CRAF in NRAS^{Q61K}-expressing mice reverted the hyperpigmented phenotype, these animals developed a normal coat color phenotype during the first three weeks of life and then progressive hair graying. Thus the complete reversion of the NRAS^{Q61K} phenotype was not due to a melanocyte stem cell maintenance defect, since hyperpigmentation phenotype precede the first melanocyte renewal from stem cell pool of the hair follicle. Taken together, these observations confirm that RAF signaling is dispensable for normal early melanocyte development but absolutely required under pathological conditions triggered by oncogenic RAS.

While recent mouse studies reported a critical role for CRAF in the development of RAS-induced tumors^{9,24 26,36}, our models allowing selective and temporal-dependent inactivation of *Raf* genes demonstrated that RAF proteins play both compensatory and specific functions during cutaneous melanoma progression. Indeed, we showed that BRAF but not CRAF plays a critical role during the initiating stages of melanoma formation. Early BRAF depletion resulted in a complete reversion of the hyperpigmented phenotype induced by NRAS. Melanocytes displayed normal skin localization and neither nevi, nor tumors developed from BRAF-deficient animals. CRAF appeared dispensable and could not compensate for BRAF absence since the phenotype of single BRAF knockouts was comparable to that of double BRAF and CRAF knockouts. Single CRAF knockout mice developed, however, a weakly altered hyperpigmented phenotype that could be explained by the fact that BRAF/CRAF heterodimers are more active than BRAF homodimers³⁷. Taken together, our results demonstrate that only BRAF is necessary during the early stages of NRAS-induced melanomagenesis, thereby revealing a specific function for BRAF in tumor initiation that cannot be compensated by ARAF and CRAF. This requirement for BRAF activity is strictly restricted to pathological conditions,

since the single BRAF knockout has otherwise no effect on either development of the melanocyte lineage or melanocyte stem cell self-maintenance²¹.

Using tamoxifen-controlled *Raf* gene recombination, we were also able to analyse the respective contribution of BRAF and CRAF in melanoma growth and maintenance. CreERT2-induced floxed *Braf* allele recombination was efficiently achieved in primary tumors grafted in nude mice or cultured *in vitro*. However, neither slowing down of tumor growth and cell proliferation was evidenced in these experiments. This indicated that BRAF was dispensable after melanoma initiation for tumor growth and maintenance. In grafted tumors and in cell cultures, complete loss of CRAF expression could be achieved and induced a weak but reproducible slowing down of tumor growth and cell proliferation. Altogether, these results suggested that CRAF could take over BRAF to maintain MAPK activity when melanocytic tumors progressed toward malignancy. These observations were in agreement with the existence of a signaling switch from BRAF to CRAF in NRAS-transformed melanocytes⁹. However, the effects of single CRAF deletion were very weak compared to that of the double BRAF/CRAF knockout, and far from sufficient to block tumor growth, clearly indicating a compensatory effect implicating BRAF. At the mechanistic level, BRAF was capable to bind to NRAS in both parental and CRAF KO cells, but its kinase activity was notably increased in absence of CRAF. Importantly, these observations were not restricted to mouse melanoma, since we also found that BRAF and CRAF cooperated to activate ERK and to sustain proliferation in three different NRAS-mutated human melanoma cell lines.

This work enabled us to propose a model highlighting the respective roles of RAF kinases during NRAS-induced melanoma progression. During the early initiation steps, only BRAF is necessary and neither CRAF, nor ARAF can compensate for BRAF deficiency. After progression to malignancy, both BRAF and CRAF can contribute to tumor maintenance, although BRAF becomes dispensable when CRAF is expressed. Finally, in absence of both BRAF and CRAF, ARAF can eventually be recruited to sustain cell proliferation.

A differential contribution of RAF kinases was also reported in KRAS-driven non-small cell lung carcinoma. BRAF depletion did not affect tumor burden whereas CRAF was required for tumor initiation^{24,26}. Another mouse model of RAS-driven skin carcinogenesis revealed that BRAF or CRAF

ablation in keratinocytes prevented tumoral initiation and maintenance but through different mechanisms, BRAF being necessary for ERK activation and proliferation and CRAF for inhibition of keratinocyte differentiation^{25,36}. It would be therefore interesting to understand why RAF kinases differentially contribute to tumorigenesis in these models. Regarding melanoma, our findings establish that BRAF not only plays an obvious key role in BRAF-mutated tumors, but is also essential for NRAS-induced tumors. Altogether, these studies highlight the addiction to the RAF/MAPK pathway in RAS-induced tumorigenesis and reinforce the notion that future improvement of patient treatments will require the development of potent therapeutic agents targeting the overall pathway.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

Braf^{fl/fl}³⁸, *Craf*^{fl/fl}³⁹, and *Ink4a*^{+/-}⁴⁰ mice in pure SV129 genetic background and *Tyr::NRAS*^{Q61K/0}²⁸, *Tyr::Cre*⁰³⁰, *Tyr::CreERT2*⁰²⁹ and *Dct::LacZ*⁰³¹ mice in pure C57BL6 genetic background were previously described. The strains were interbred to obtain a non-inducible or inducible deletion of BRAF and/or CRAF specifically in the melanocytic lineage. Genotyping was performed as reported^{21,28,29}. As the *Tyr::Cre* transgene is located on the X chromosome, only *Cre*-positive males were used for experimental analyses. Control and wild-type animals refer to *NRAS*-positive and *Cre*-negative or *NRAS*-negative and *Cre*-negative mice, respectively. Every two weeks, mice were analysed macroscopically after shaving for the occurrence of tumors and morbidity signs. Depilation experiments, hematoxylin and eosin staining on paraffin-embedded skin sections or X-Gal staining on frozen skin sections were described previously²¹. Experimental procedures were conducted in accordance with recommendations of the European Union (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848). Animal care and use were approved by the ethics committee of the Curie Institute in compliance with the institutional guidelines.

Tumor transplantation and *in vivo* tamoxifen treatment

The tumor was collected from the donor animal, cut into small pieces (5x5mm) and transplanted subcutaneously in the right flank of two cohorts of seven or eight nude mice (6-week-old Swiss Nu/Nu females, Charles River Laboratories). One week later, mice received daily an intraperitoneal injection of tamoxifen (Sigma T5648, 1 mg per mouse, 10mg/ml in EtOH 95%/corn oil 5%) or vehicle for 10 days. Tumor growth was measured every week for up to 6 weeks. At the end of the experiment, mice were euthanized and tumors were collected. Total lysates were prepared in lysis buffer (Tris 20mM pH7.4, NaCl 100mM, Triton X100 0.5%, protease and phosphatase inhibitors) using Precellys tissue homogenizer.

Cell culture experiments

NRAS-mutated human melanoma cell lines (WM1361, WM852 and Sbc12) were cultured in RPMI 1640 medium (GIBCO) supplemented with 10% FBS, penicillin and streptomycin. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. For growth curves, 5x10⁴ murine or human melanoma cell lines were seeded into 6-well plates and counted after staining with Trypan blue by using a LUNA cell counter (LogoBiosystems). 4-hydroxy-tamoxifen (4OHT) and U0126 MEK inhibitor (Sigma) were used at 500 nM or 10µM, respectively. Cell extracts were prepared in lysis buffer (Tris 20mM pH7.4, NaCl 100mM, Triton X100 0.5%, protease and phosphatase inhibitors). Immunoprecipitation experiments were performed on 5x10⁶ cells with 25µl of anti-NRAS antibody and 20 µl of a 50% slurry of protein A-Sepharose (GE Healthcare). For *in vitro* kinase assay, immunoprecipitated BRAF or CRAF were incubated with 1 µg of purified GST-MEK in 30mM Tris (pH7.5), 0.1mM EDTA, 10mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 5mM NaF, 1mM ATP, 0.3% β-mercaptoethanol for 30 minutes at 30°C. The reaction was analysed by SDS-PAGE with phospho-MEK (Cell Signaling Technology), BRAF or CRAF antibodies.

Establishment of melanoma cell lines from primary tumors

Primary tumor tissue was dissected from melanoma-bearing *Braf^{+/+};Craf^{fl/fl};Tyr::NRAS^{Q61K}/^o;Ink4a^{+/-};Tyr::CreERT2^o*, *Braf^{fl/fl};Craf^{+/+};Tyr::NRAS^{Q61K}/^o;Ink4a^{+/-};Tyr::CreERT2^o* or *Braf^{fl/fl};Craf^{fl/fl};Tyr::NRAS^{Q61K}/^o;Ink4a^{+/-};Tyr::CreERT2^o* mice and cut into small pieces. Samples were treated with 0.25% (w/v) of type I and IV collagenases (Sigma) in PBS at 37°C for 45 min, washed with Wash Buffer (Hank's balanced salt solution (HBSS) with 1mM CaCl₂, 0.005% DNase I (Roche), 20% FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma)) and incubated in Cell Dissociation Buffer (GIBCO/Invitrogen) at 37°C for 10 min. The skin was dissociated by passing through 100µm cell strainer and 18-20 gauge needles. The cells were plated onto 6 wells-plates (1x10⁶ cells/well) and cultured in HAM F-12 Medium (GIBCO/Invitrogen) containing 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2mM L-glutamine (Invitrogen).

Western blotting and antibodies

Western blots were performed as previously described²¹. Membranes were probed with anti-ARAF (sc408, Santa Cruz, 1/500), anti-BRAF (sc5284, Santa Cruz, 1/2000), anti-CRAF (#610151, BD Biosciences, 1/2000), anti-NRAS (sc519, Santa Cruz, 1/2000), anti-pMEK (#9121, Cell signaling, 1/1000), anti-MEK (sc219, Santa Cruz, 1/2000), anti-pERK (M8159, Sigma, 1/2000), anti-ERK (sc93, Santa Cruz, 1/2000) and anti- α -actin (A1978, Sigma, 1/5000) antibodies. Signals were acquired using a CDD camera (G:BOX, Syngene).

Proximity ligation assay

Cells were grown on glass coverslips, fixed with methanol, and permeabilized with acetone. Proximity ligation assay (Duolink) was performed via the manufacturer's (Olink) instructions using above mentioned antibodies to BRAF (1/500) and NRAS (1/50), or CRAF (1/50) and NRAS. Knockout cells for BRAF or CRAF were used as control. Images were captured using a 3D/optigrid Leica fluorescent microscope at 63X magnification. The average number of dots per nuclei was determined by analysing at least 70 different nuclei with the ImageJ software.

Lentiviral production and infection

Lentiviral pLKO vectors encoding shRNA control, targeting murine ARAF (NM_9703, clones TRCN0000287252 for shARAF.1, TRCN0000307404 for shARAF.2, TRCN0000294819 for shARAF.3) were obtained from Sigma (Mission shRNA library). Lentiviruses were produced in 293T cells, by co-transfecting pLKO-derived vectors and the packaging plasmids pS-PAX2 and pMD2-VSVG, using lipofectamine 2000 (Invitrogen). Lentiviral particles were harvested 48h post-transfection. Murine melanoma cell lines were seeded into 6-well plates (10^5 cells per well) and infected with 100 μ l of viral supernatant in 700 μ l of medium. The virus was replaced with fresh medium after 48h and selection (puromycine 1 μ g/ml or neomycin 2mg/ml, respectively) was applied. Stable established cell lines were either passed or stained with crystal violet.

***In vitro* siRNA experiments and BrdU labelling**

Cells were seeded at 8×10^4 cells/well in 12-well plates and transfected with 80pmol of BRAF-specific, CRAF-specific, or control scrambled small interfering RNA (siRNA) using LipofectAMINE (Gibco). 24 hours later, cells were either harvested or BrdU-labelled. The siRNA sequences used were as follow : siBRAF1 5' AAGUGGCAUGGUGAUGUGGCA; siBRAF2 5' - AGAAUUGGAUCUGGAUCAU; siCRAF1 5' -GCACGCUUAGAUUGGAAUA; siCRAF2 5' - AAUAGUUCAGCAGUUUGGCUA; scrambled ScrSi 5' - AAGUCCAUGGUGACAGGAGAC^{41,42}. For BrdU labelling, after BrdU incorporation (3 hours, 20 μ M), cells were fixed with 4% formaldehyde, permeabilized and blocked in 0.2% Triton X100, 10% FCS in PBS and stained (1/500 anti-BrdU antibody (Sigma), 0.5 mg/ml DNase I). Donkey anti-mouse Alexa Fluor 594 (Invitrogen) was used for detection. Counterstaining with DAPI was performed to quantify BrdU-positive cells.

Cell cycle analyses by flow cytometry

At day 5 of 4OHT treatment, cells were incubated for 30 minutes with BrdU (final concentration 10 μ M). Cells were labeled for BrdU incorporation with an FITC BrdU flow kit (BD Pharmingen), according to the manufacturer's protocol and resuspended in 300 ml of PBS containing 20 ml of 7-AAD. The signals were detected by FACScalibur cytometer (BD biosciences) and analysed using FlowJo software (Tree Star).

Real time RT-PCR

Total RNAs were extracted using RNeasy Plus mini kit (Qiagen) and reversely transcribed with the Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Quantitative real-time PCR assays were conducted using SYBR Green real-time PCR Master Mix and real-time PCR amplification equipment (Applied Biosystem) (forward primer, 5'-gaagacaagccaagatgga; reverse prime, 5'-ctcagccccactaacaggag).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information includes four Supplemental Figures.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.D., A.E. and S.D. conceived the study, designed and analysed the experiments. C.D., C.B., M.L., A.G., J.L. and S.D. performed the experiments. F.B., M.B. and L.L. provided mice and critically revised the article. C.P., A.E., and S.D. wrote the manuscript and supervised the research.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. Reyes-Gomez and N. Dumaz for helpful advice and comments, M. Herlyn for human melanoma cell lines, S. Leboucher for her assistance in histological analyses, F. Bertrand and F. Ruelle at the Institut Curie mouse facilities and D. Zaharia and M.N. Soler from the PICT-IBiSA imaging facility of Institut Curie . This work was funded by grants from Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée), Fondation de France, Fondation ARC (grant number 3186), Institut National du Cancer (grant numbers 2007-1-PL7-CURIE and 2013-1-MEL-01-ICR-1), and Association Vaincre le mélanome. C.D. was supported by the Cancéropôle Ile de France and Ligue Nationale Contre le Cancer.

REFERENCES

1. Miller, A. J. & Mihm, M. C. Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **355**, 51–65 (2006).
2. Fedorenko, I. V., Gibney, G. T. & Smalley, K. S. M. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene* **32**, 3009–3018 (2013).
3. Garnett, M. J. & Marais, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* **6**, 313–319 (2004).
4. Chapman, P. B. *et al.* Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2507–2516 (2011).
5. Hauschild, A. *et al.* Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **380**, 358–365 (2012).
6. Lito, P., Rosen, N. & Solit, D. B. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat. Med.* **19**, 1401–1409 (2013).
7. Hatzivassiliou, G. *et al.* RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* **464**, 431–435 (2010).
8. Heidorn, S. J. *et al.* Kinase-Dead BRAF and Oncogenic RAS Cooperate to Drive Tumor Progression through CRAF. *Cell* **140**, 209–221 (2010).
9. Dumaz, N. *et al.* In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res.* **66**, 9483–9491 (2006).

10. Kannengiesser, C. *et al.* Gene expression signature associated with BRAF mutations in human primary cutaneous melanomas. *Mol. Oncol.* **1**, 425–430 (2008).
11. Solit, D. B. *et al.* BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* **439**, 358–362 (2006).
12. Albino, A. P., Le Strange, R., Oliff, A. I., Furth, M. E. & Old, L. J. Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity? *Nature* **308**, 69–72 (1984).
13. Milagre, C. *et al.* A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS. *Cancer Res.* **70**, 5549–5557 (2010).
14. Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C. & Marais, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **445**, 851–857 (2007).
15. Jaiswal, B. S. *et al.* Combined targeting of BRAF and CRAF or BRAF and PI3K effector pathways is required for efficacy in NRAS mutant tumors. *PLoS One* **4**, e5717 (2009).
16. Krauthammer, M. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* **44**, 1006–1014 (2012).
17. Mishra, P. J. *et al.* Dissection of RAS downstream pathways in melanomagenesis: a role for Ral in transformation. *Oncogene* **29**, 2449–2456 (2010).
18. Kos, L. *et al.* Hepatocyte growth factor/scatter factor-MET signaling in neural crest-derived melanocyte development. *Pigment Cell Res.* **12**, 13–21 (1999).
19. Wu, M. *et al.* c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev.* **14**, 301–312 (2000).
20. Peyssonnaud, C. & Eychène, A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol. Cell* **93**, 53–62 (2001).
21. Valluet, A. *et al.* B-Raf and C-Raf are required for melanocyte stem cell self-maintenance. *Cell Rep.* **2**, 774–780 (2012).
22. Holderfield, M. *et al.* RAF inhibitors activate the MAPK pathway by relieving inhibitory autophosphorylation. *Cancer Cell* **23**, 594–602 (2013).
23. Poulikakos, P. I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K. M. & Rosen, N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* **464**, 427–430 (2010).
24. Blasco, R. B. *et al.* c-Raf, but not B-Raf, is essential for development of K-Ras oncogene-driven non-small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* **19**, 652–663 (2011).
25. Ehrenreiter, K. *et al.* Raf-1 addiction in Ras-induced skin carcinogenesis. *Cancer Cell* **16**, 149–160 (2009).
26. Karreth, F. A., Frese, K. K., DeNicola, G. M., Baccharini, M. & Tuveson, D. A. C-Raf is required for the initiation of lung cancer by K-Ras(G12D). *Cancer Discov.* **1**, 128–136 (2011).
27. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–954 (2002).
28. Ackermann, J. *et al.* Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* **65**, 4005–4011 (2005).
29. Yajima, I. *et al.* Spatiotemporal gene control by the Cre-ERT2 system in melanocytes. *Genesis* **44**, 34–43 (2006).

30. Delmas, V., Martinozzi, S., Bourgeois, Y., Holzenberger, M. & Larue, L. Cre-mediated recombination in the skin melanocyte lineage. *Genesis* **36**, 73–80 (2003).
31. Mackenzie, M. A., Jordan, S. A., Budd, P. S. & Jackson, I. J. Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev. Biol.* **192**, 99–107 (1997).
32. Campagne, C. *et al.* Histopathological atlas and proposed classification for melanocytic lesions in Tyr::NRas(Q61K); Cdkn2a(-/-) transgenic mice. *Pigment Cell Melanoma Res.* **26**, 735–742 (2013).
33. Li, A. *et al.* Activated mutant NRas(Q61K) drives aberrant melanocyte signaling, survival, and invasiveness via a Rac1-dependent mechanism. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 2610–2621 (2012).
34. Bauer, J., Curtin, J. A., Pinkel, D. & Bastian, B. C. Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 179–182 (2007).
35. Davies, M. A. *et al.* Integrated Molecular and Clinical Analysis of AKT Activation in Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **15**, 7538–7546 (2009).
36. Kern, F., Doma, E., Rupp, C., Niaux, T. & Baccarini, M. Essential, non-redundant roles of B-Raf and Raf-1 in Ras-driven skin tumorigenesis. *Oncogene* **32**, 2483–2492 (2013).
37. Rushworth, L. K., Hindley, A. D., O'Neill, E. & Kolch, W. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2262–2272 (2006).
38. Chen, A. P. *et al.* Forebrain-specific knockout of B-raf kinase leads to deficits in hippocampal long-term potentiation, learning, and memory. *J. Neurosci. Res.* **83**, 28–38 (2006).
39. Jesenberger, V. *et al.* Protective role of Raf-1 in Salmonella-induced macrophage apoptosis. *J. Exp. Med.* **193**, 353–364 (2001).
40. Serrano, M. *et al.* Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85**, 27–37 (1996).
41. Rebocho, A. P. & Marais, R. ARAF acts as a scaffold to stabilize BRAF:CRAF heterodimers. *Oncogene* **32**, 3207–3212 (2013).
42. Wellbrock, C. *et al.* V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res.* **64**, 2338–2342 (2004).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effect of early deletion of BRAF and/or CRAF on hyperpigmentation and melanoma formation induced by NRAS^{Q61K}. (A) Representative pictures of depilated back skin from 6 months old mice with the indicated genotypes compared to control NRAS (*Tyr::NRAS^{Q61K/0};Ink4a^{+/-}*) and wild-type mice showing the effect of CRAF, BRAF or BRAF/CRAF loss on hyperpigmented phenotype. (B) High magnification pictures of bottom part of depilated back skin. Skin lesions are indicated by white arrows. (C) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of representative back skin histological sections from 6 months old control, mutant and wild-type mice. Typical melanin deposits and melanocytes clusters are shown in the papillary dermis (black arrowheads) and in the subcutaneous fat layer (arrows). Scale bar, 100 μ m. (D) X-gal staining of representative skin sections from 10 days old mice. Melanocytes are observed in papillary dermis (arrow) and in the shaft and the bulb of the hair follicule (black and open arrowheads respectively). Scale bar, 100 μ m. (E) Number of pigmented spots per cm² on bottom back skin of 6 months old mice (panel B). (F) Number of dermal melanocytes per microscopic field (X10 objective) in skin sections from 10 days old mice (panel D). (G) Kaplan-Meier curves of melanoma incidence. 21% of CRAF deficient mice (7 of 33) develop melanoma with a latency of 15.7 \pm 1.8 months compared to 53.5 % of control mice (31 of 58) in 10.8 \pm 2.7 months. No melanoma was observed in BRAF-deficient or BRAF/CRAF-deficient mice (17 and 21 mice respectively per cohort). **p-value<0.01 compared by Student s test. ns, not significant.

Figure 2: RAF signaling is required for cell proliferation and tumor growth in NRAS^{Q61K}-induced murine melanoma. (A) A melanoma from an untreated *Braf^{fl/fl};Craf^{fl/fl};Tyr::NRAS^{Q61K/0};Ink4a^{+/-};Tyr::CreERT2⁰* mouse was cut into small pieces and subcutaneously grafted into two groups of nude mice that were treated either with tamoxifen or vehicle for 2 weeks. The effect on tumor growth was assessed by measuring tumor volume over a 6-week period. Tumor volumes are plotted relative to the initial volume at the start of treatment. This experiment is representative of three independent experiments. (B) Western blot analysis of BRAF and CRAF protein levels and MEK and ERK activation levels (pMEK and pERK respectively) in protein lysates from culture in (C) at day 4 and 7 of 4OHT treatment compared to DMSO-treated culture.

Total MEK, total ERK and β -actin are shown as a loading control. (C) Growth curve analysis of melanoma cell culture established from an untreated *Braf^{fl/f};Craf^{fl/f};Tyr::NRAS^{Q61K}/^o;Ink4a^{+/-};Tyr::CreERT2^o* primary mouse tumor in response to 4OHT or DMSO for 9 days. Cell number is plotted relative to the initial number of cells at the start of treatment. Data are representative of three independent experiments. (D) Cell cycle analysis by FACS from culture in (C) at day 5 of 4OHT treatment compared to DMSO-treated culture. Data are the mean value of three independent experiments. *p-value<0.05 and **p-value<0.01 compared by Student's test. ns, not significant.

Figure 3: Compensatory functions of BRAF and CRAF for cell proliferation and tumor growth in NRAS^{Q61K}-induced murine melanoma. (A, E) A melanoma from an untreated *Braf^{fl/f};Craf^{+/+};Tyr::NRAS^{Q61K}/^o;Ink4a^{+/-};Tyr::CreERT2^o* or *Braf^{+/+};Craf^{fl/f};Tyr::NRAS^{Q61K}/^o;Ink4a^{+/-};Tyr::CreERT2^o* mouse (panels A and E, respectively) was cut into small pieces and subcutaneously grafted into two groups of nude mice and experimented as in Figure 2A. (B, F) Western blot analysis for BRAF and CRAF expression at the end of treatment by tamoxifen or vehicle in three individual and representative tumors from panels A and E respectively. β -actin is used as a loading control. (C, G) Growth curve analysis of melanoma cell culture established from an untreated *Braf^{fl/f};Craf^{+/+};Tyr::NRAS^{Q61K}/^o;Ink4a^{+/-};Tyr::CreERT2^o* or *Braf^{+/+};Craf^{fl/f};Tyr::NRAS^{Q61K}/^o;Ink4a^{+/-};Tyr::CreERT2^o* primary mouse tumor (panels C and G, respectively) in response to 4OHT or DMSO for 9 days as in Figure 2C. (D, H) Western blot analysis of BRAF and CRAF protein levels and MEK and ERK activation levels in protein lysates from culture in panels C and G respectively as in Figure 2B.

Figure 4: NRAS-binding and kinase activity of BRAF and CRAF in NRAS-induced melanoma. (A,B) Proximity ligation assay (PLA) showing NRAS/BRAF and NRAS/CRAF complexes in *BRAF^{Δ/Δ}* and *CRAF^{Δ/Δ}* murine melanoma cultures compared to the parental cultures (panels A and B, respectively). NRAS/BRAF and NRAS/CRAF interactions in cultures established from panels Figure 3C or 3G were visualized as red dots by using a fluorescent microscope. Cell nuclei were stained with DAPI. Box plots represent the average number of dots per nuclei. Lower, median, and upper quartiles are shown, with whiskers extending to the lowest and highest values. (C,D) BRAF and CRAF *in vitro*

kinase assays in BRAF^{Δ/Δ} or CRAF^{Δ/Δ} cultures compared to parental control cultures (panels C and D, respectively). BRAF or CRAF were immunoprecipitated and their intrinsic kinase activity against kinase-inactive MEK was determined by western blotting using anti-pMEK antibody. Immune complexes and total extracts were immunoblotted with anti-BRAF and anti-CRAF antibodies. β-actin was used as a loading control. BRAF^{Δ/Δ} and CRAF^{Δ/Δ} refer to *Braf^{F/F};Craf^{F/+};Tyr::NRAS^{Q61K/0};Ink4a^{+/-};Tyr::CreERT2⁰* and *Braf^{F/+};Craf^{F/F};Tyr::NRAS^{Q61K/0}; Ink4a^{+/-}; Tyr::CreERT2⁰*, respectively and control to the corresponding parental cultures.

Figure 5: NRAS-mutated human melanoma cells require both BRAF and CRAF for ERK activation and proliferation. (A) Western blot analysis of BRAF and CRAF protein expression and pERK activation in NRAS mutated human melanoma cell lines (WM1361, WM852 and Sbc12) transfected with the scrambled control (-) or short interfering RNA to BRAF and/or CRAF (siBRAF1 and siCRAF1). Total ERK and β-actin are used as a loading control. (B) Proliferation rate in WM1361, WM852 and Sbc12 cells transfected with scrambled control (scr), BRAF siRNA (B1), CRAF siRNA (C1) or BRAFsiRNA/CRAFsiRNA (B1C1) was measured after BrdU incorporation during 3 hours. **p-value<0.01 and ***p-value<0.001 compared by Student s test. (C) Proximity ligation assay (PLA) showing NRAS/BRAF and NRAS/CRAF complexes in WM1361, WM852 and Sbc12 cells. Numbers in white indicate the average number of dots per nuclei. Numbers between brackets represent standard deviations.

Figure 6: ARAF is required for the survival NRAS^{Q61K}-induced murine melanoma cell lines in absence of BRAF and CRAF. (A) Growth curve analysis of resistant double knockout murine melanoma cell culture BRAF/CRAF^{Δ/Δ} (circles) compared to its parental control culture (triangles) for 6 days in presence of 10μM U0126 (U0) or DMSO. Cell number is plotted relative to the initial number of cells at the start of treatment. Data are representative of three independent experiments. (B) Western blot analysis of ARAF, BRAF and CRAF protein expression and pERK activation in BRAF/CRAF^{Δ/Δ} and parental control cultures after treatment by 10μM U0 or DMSO. Total ERK and β-actin are used as a loading control. (C) qRT-PCR analysis of ARAF expression in BRAF/CRAF^{Δ/Δ} and parental control cultures. ***p-value<0.001 compared by Student s test. (D,F) Parental control

and BRAF/CRAF^{Δ/Δ} cultures (panels D and F, respectively) were infected by lentiviruses encoding control shRNA or targeting ARAF (shARAF.1; shARAF.2; shARAF.3). After puromycin selection, cells were stained with crystal violet. (E,G) Western blot analysis of ARAF, BRAF and CRAF protein expression levels and pERK activation in parental control and BRAF/CRAF^{Δ/Δ} cultures (panels E and G, respectively) after infection by control or ARAF shRNA encoding viruses and selection. Total ERK and β-actin are used as a loading control. Control refers to *Braf*^{F/F}; *Craf*^{F/F}; *Tyr::NRAS*^{Q61K/0}; *Ink4a*^{+/-}; *Tyr::CreERT2*⁰ parental culture and BRAF/CRAF^{Δ/Δ} refers to *Braf*^{F/F}; *Craf*^{F/F}; *Tyr::NRAS*^{Q61K/0}; *Ink4a*^{+/-}; *Tyr::CreERT2*⁰ double knockout culture.

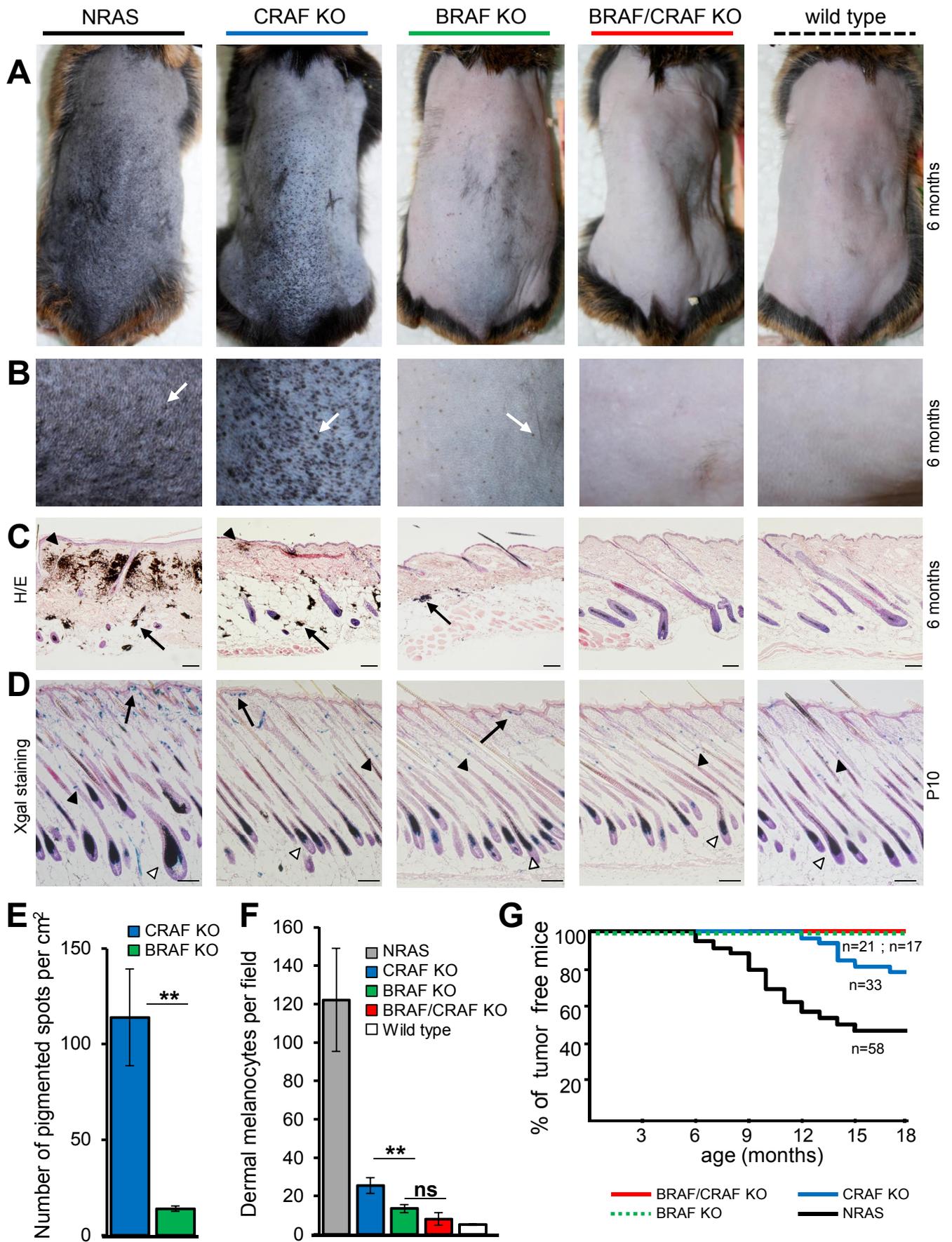


Figure 1 Dorard et al.

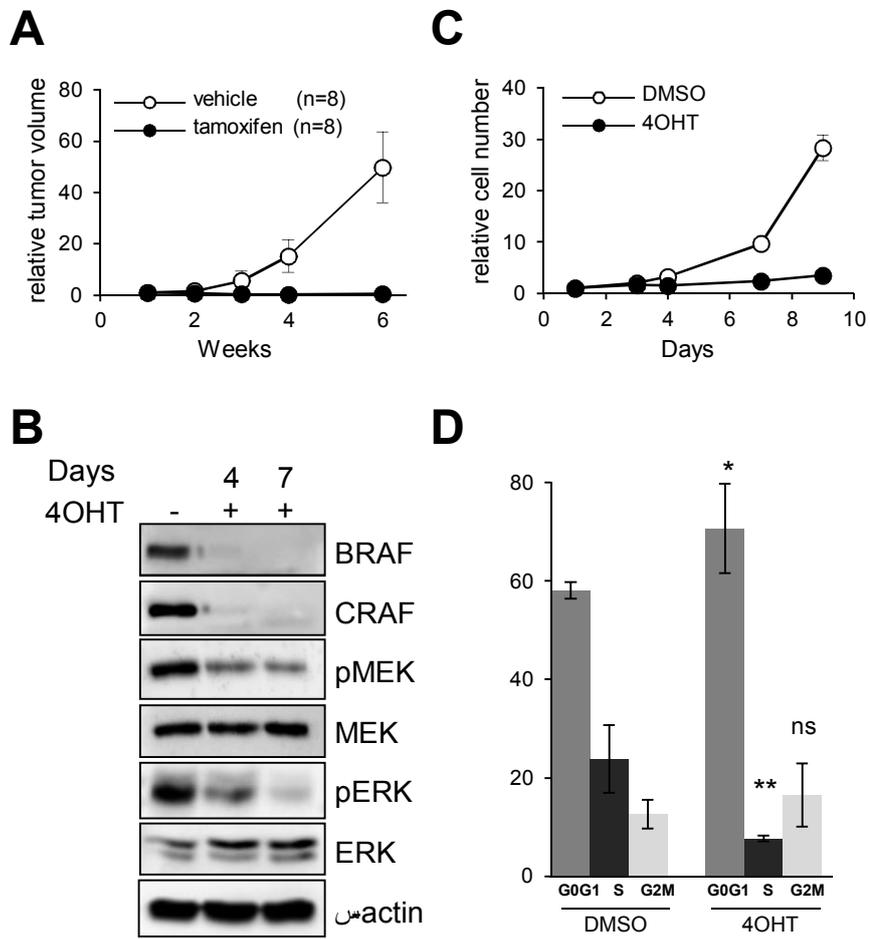


Figure 2 Dorard et al.

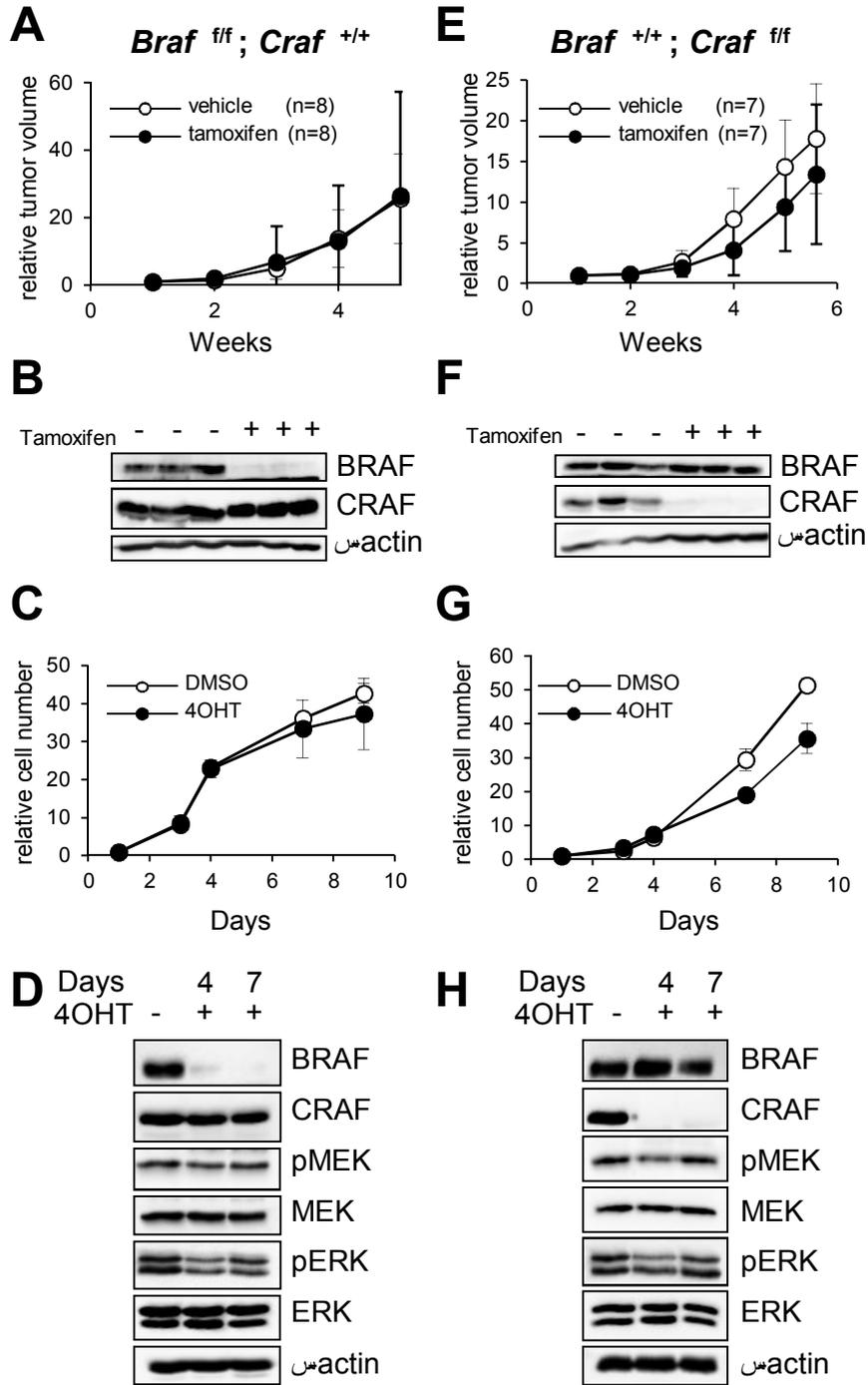


Figure 3 Dorard et al.

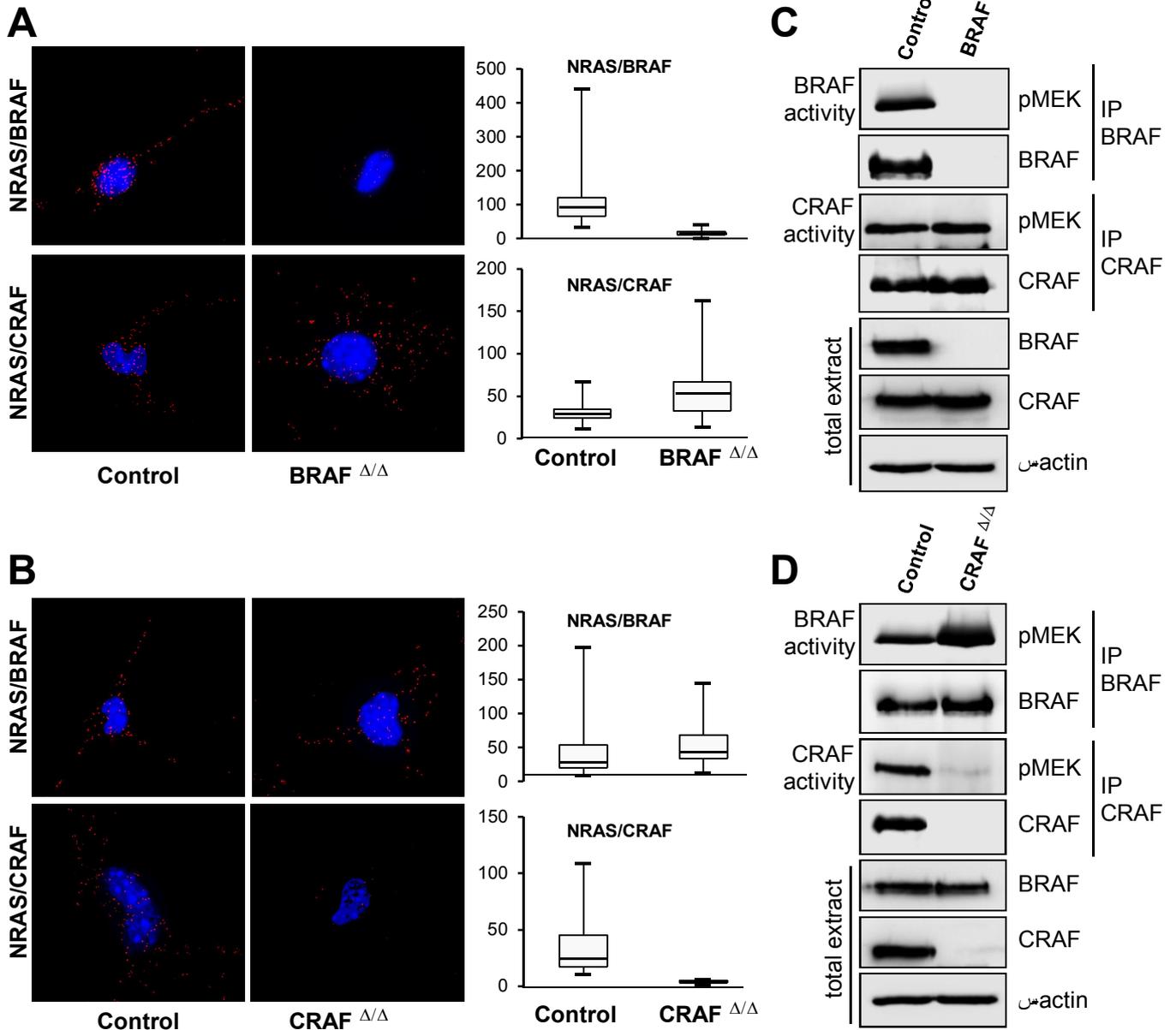


Figure 4 Dorard et al.

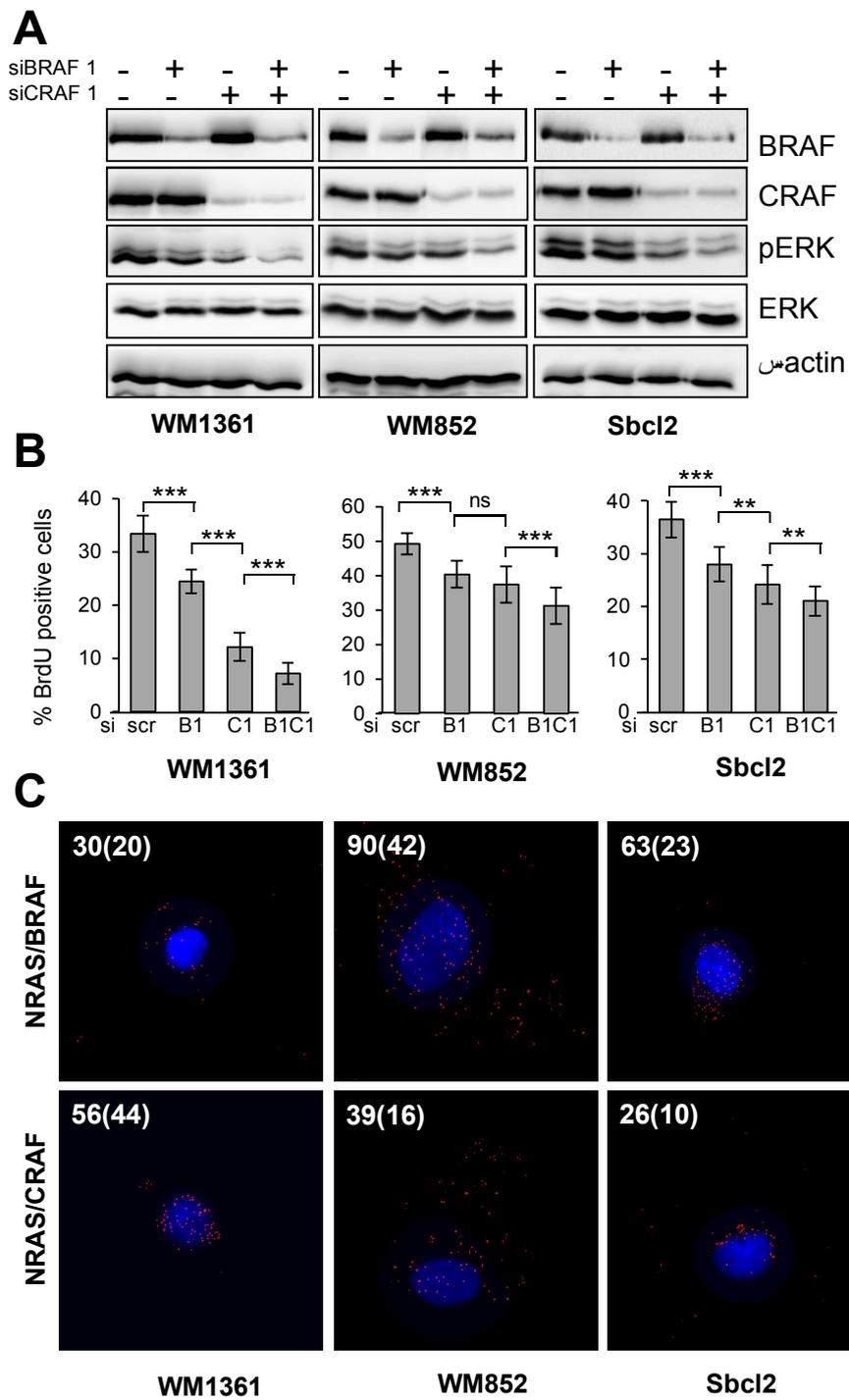


Figure 5 Dorard et al.

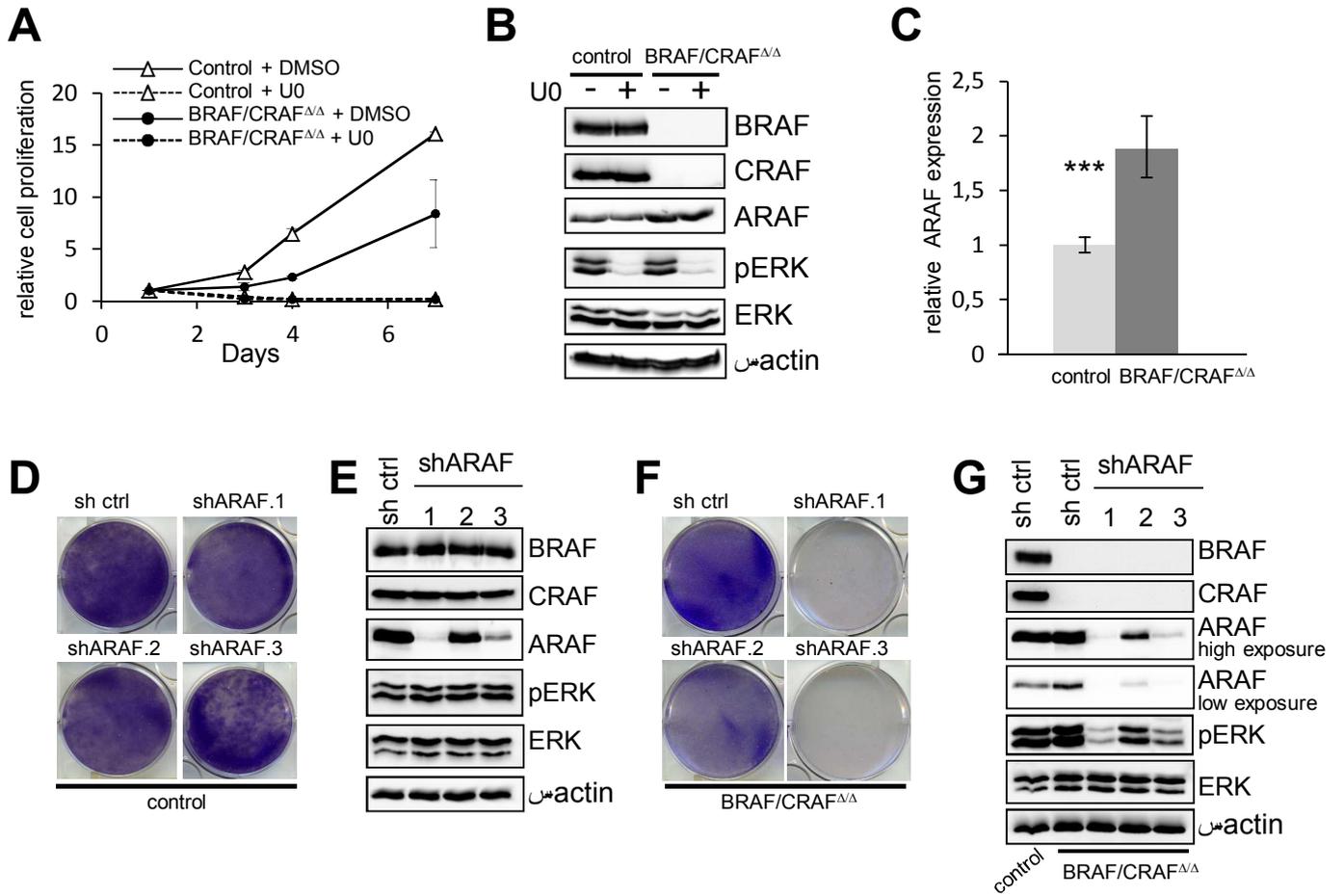


Figure 6 Dorard et al.

RAF proteins exert both specific and compensatory functions during tumor progression of NRAS-driven melanoma

Coralie Dorard^{1,2,3,4,5}, Céline Barbotin^{1,2,3,4,5}, Magalie Larcher^{1,2,3,4,5}, Alexandra Garancher^{1,2,3,4}, Jessy Leloup^{1,2,3,4,5}, Friedrich Beermann⁶, Manuela Baccarini⁷, Celio Pouponnot^{1,2,3,4}, Lionel Larue^{1,2,3,4,5}, Alain Eychène^{1,2,3,4,5*} and Sabine Druillennec^{1,2,3,4,5*}

SUPPLEMENTAL INFORMATION

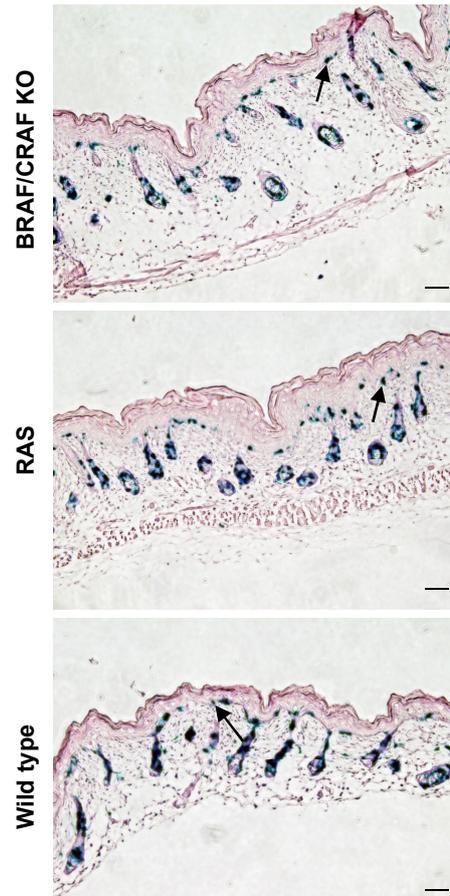


Figure S1 (Related to Figure 1): X-gal staining of dorsal skin sections from double BRAF/CRAF knockout, RAS control and wild type newborn mice at P0.5. Dermal melanocytes are black arrowed. Scale bar, 500 μ m.

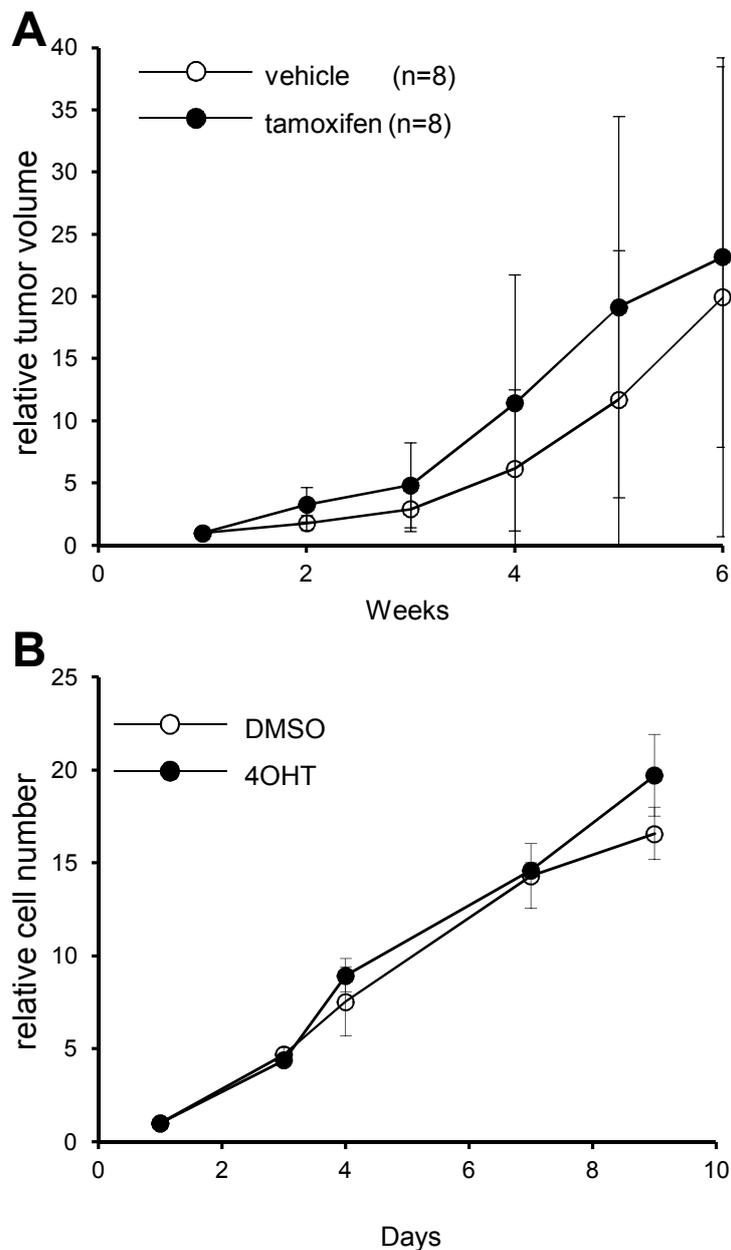


Figure S2 (Related to Figure 2): Control tumors or melanoma cell lines showing the absence of side effects of treatment on tumor growth or cell proliferation. (A) A melanoma from an untreated *Braf^{fl/fl};Craf^{fl/fl};Tyr::NRAS^{Q61K/o};Ink4a^{+/-}* mouse was subcutaneously grafted nude mice that were treated either with tamoxifen or vehicle for 2 weeks. The effect on tumor growth was assessed by measuring tumor volume over a 6-week period. (B) Growth curve analysis of melanoma cell culture established from an untreated *Braf^{fl/fl};Craf^{fl/fl};Tyr::NRAS^{Q61K/o};Ink4a^{+/-}* primary mouse tumor in response to 4OHT or DMSO for 9 days.

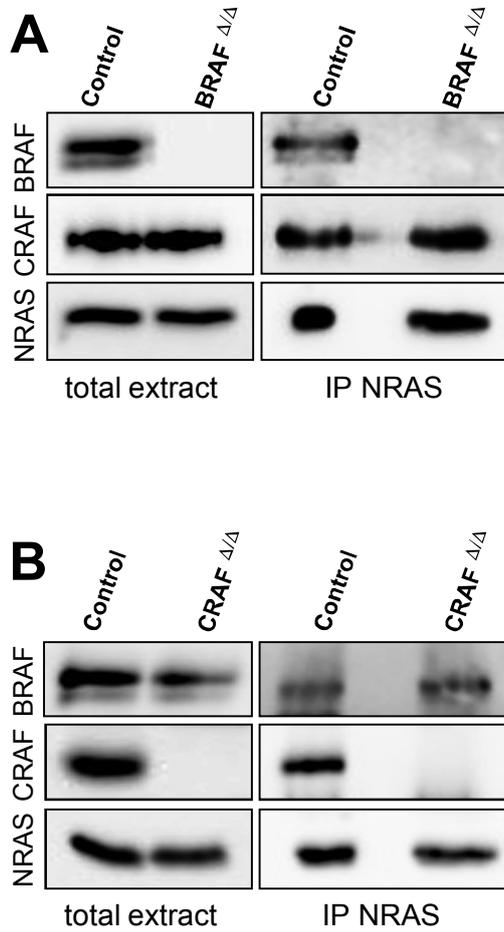


Figure S3 (Related to Figure 4): Co-immunoprecipitations showing NRAS/BRAF and NRAS/CRAF complexes in BRAF^{Δ/Δ} or CRAF^{Δ/Δ} compared to control parental cultures (panels A and B, respectively). Cell extracts were immunoprecipitated with anti-NRAS antibody, and immune complexes were immunoblotted with anti-NRAS, anti-BRAF and anti-CRAF antibodies.

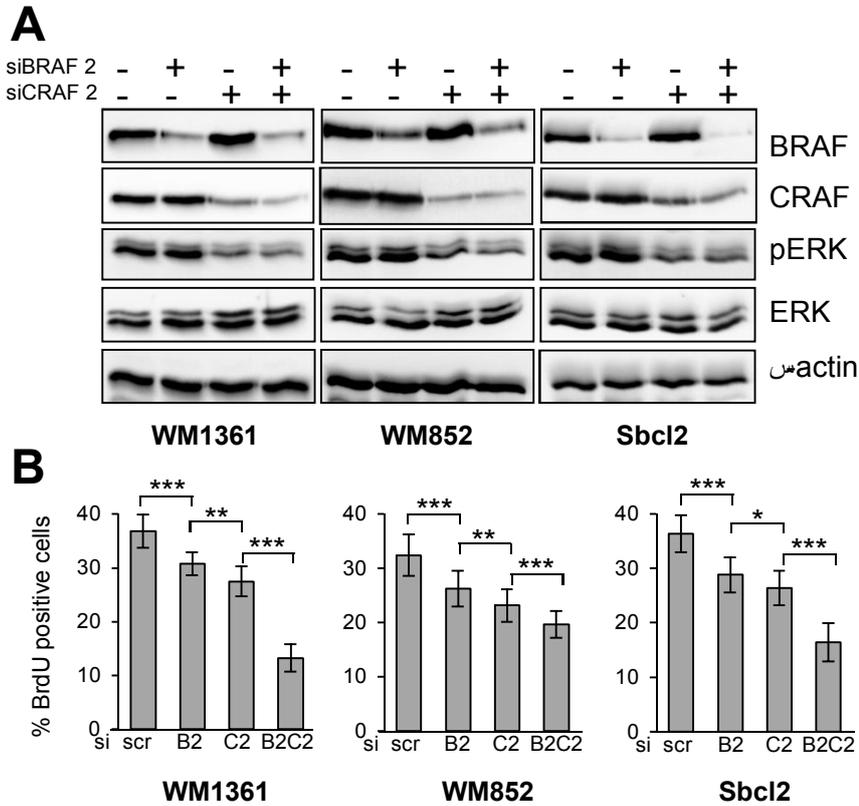


Figure S4 (Related to Figure 5): Validation of siRNA experiments on human melanoma cell lines by using a second siBRAF2/siCRAF2 couple. (A) Western blot analysis of BRAF and CRAF protein expression levels and pERK activation in three different NRAS mutated human melanoma cell lines (WM1361, WM852 and Sbc12) transfected with the scrambled control (-) or short interfering RNA to BRAF and/or CRAF (siBRAF2/siCRAF2). (B) BrdU incorporation in WM1361, WM852 and Sbc12 transfected with control, BRAF, CRAF or BRAF/CRAF siRNA (scr, B2, C2, B2C2 respectively). *p-value < 0.05, **p-value < 0.01 and ***p-value < 0.001 compared by Student's t test.

