

Pauline Nicolas, Jonathan Siboni, Emilie Dupré, Tiphaine Delannoy, Agnès Fortun, François Lang, Catherine Rabu.  
Equipe 3 : Immunosurveillance anti-tumorale et immunothérapie

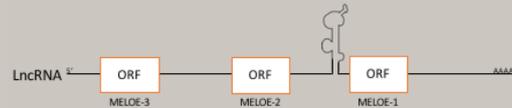
Stage d'initiation à la Recherche – Juin 2018

Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers (U1232), 8 Quai Moncousu 44007 NANTES

## Introduction

Le mélanome est une tumeur agressive, dont le traitement actuel consiste en l'exérèse totale. Actuellement, il n'existe pas de thérapie efficace dans les stades évolués de la maladie. Le mélanome a un fort caractère immunogène, c'est pourquoi il représente un modèle pertinent dans la recherche d'immunothérapie. L'identification de marqueurs spécifiques et de cibles thérapeutiques est très recherchée à ce jour. De précédentes études de notre équipe<sup>1</sup>, ont identifié un nouvel antigène exprimé spécifiquement dans le mélanome : MELOE-1. Ce peptide est codé par un ORF (= Open Reading Frame) du lncRNA (= long non-coding RNA). Cette séquence a une traduction non classique, IRES dépendante<sup>2</sup>, sous l'influence du stress, comme celui induit par l'environnement tumoral. Au sein de cette séquence, on retrouve différents épitopes qui seront ensuite reconnus par des lymphocytes T CD8. Des données de la littérature semblent indiquer que le lncRNA *rmel1* pourrait avoir des caractéristiques communes avec *meloe*<sup>3</sup>.

On cherche à mesurer par qPCR l'expression de *rmel1* et de *meloe* dans 3 lignées de mélanome.



## Matériel et méthodes

### Culot sec

Prélèvement et lavage de 5 millions de cellules tumorales issues des lignées M113, M117, M315



### Extraction ARN et traitement DNase

RNeasy® Mini Kit



Le traitement Dnase est indispensable pour éliminer l'ADN génomique et éviter toute contamination de l'échantillon. Ainsi, nous sommes sûrs qu'il ne sera pas être amplifié par PCR.

Centrifugation - Surnageant X3



On isole les ARN totaux traités DNase -80°C

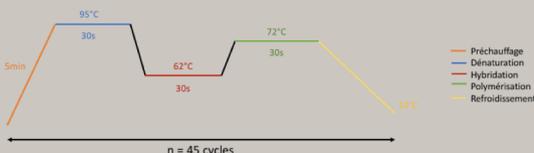
### Retrotranscription – PCR

Thermo Scientific™ - RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (200 U/μL)



**Retrotranscription** : Après leur extraction, les ARN sont recopiés en ADNc. Le milieu contient les brins d'ARN, les amorces, les nucléotides, l'enzyme, des DNases, et le tampon. **PCR** : Les brins d'ADNc sont amplifiés grâce à la GoTaq.

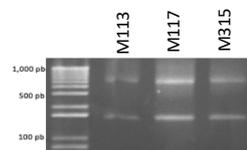
### Conditions optimales choisies pour effectuer la qPCR :



## Conclusion

Les gènes *meloe* et *rmel1* sont détectés dans les lignées de mélanomes M113, M117 et M315. *meloe* est le gène le plus exprimé dans les lignées testées, surtout dans la lignée M315. *rmel1* est également impliqué dans le mélanome mais d'autres études permettront de décrire avec précision la séquence de l'épitope.

## Résultats

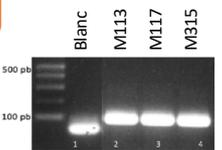


**Figure 1** : Electrophorèse sur un gel non dénaturant d'agarose 1,2% des ARN ribosomiaux extraits des lignées de mélanomes.

Cette électrophorèse nous permet de constater que les brins d'ARN extraits sont intacts, n'ont pas été dégradés, dans les 3 différentes lignées de mélanomes.

### Dosage ARN totaux dans 50 μL au nanodrop

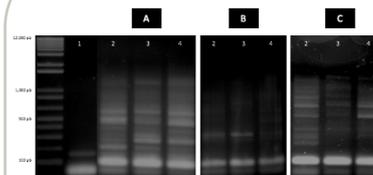
Lignées de mélanomes	Concentration (ng/μL)	Quantité ARN totale (μg)
M113	1048,1	52,405
M117	342,0	17,100
M315	359,7	17,985



**Figure 2** : Electrophorèse sur un gel non dénaturant d'agarose 1,8%. Expression du gène de ménage Rplpo extraits des lignées M113, M117, M315 de mélanomes.

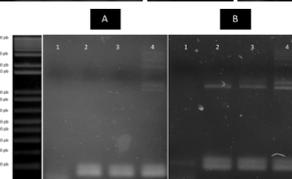
Les gènes de ménages codent principalement pour des protéines essentielles aux fonctions cellulaires de base. On pose l'hypothèse que RPLPO a le même nombre de transcrits dans les 3 lignées. Ainsi il sera utilisé comme référence pour les études suivantes.

### Mise au point de la PCR qualitative



**Figure 4** : Electrophorèse sur un gel non dénaturant d'agarose 2%. Mise au point des conditions de PCR pour étudier l'expression de *Meloe* extrait des lignées M113 (2), M117 (3), M315 (4) de mélanomes. (1)Témoin négatif.

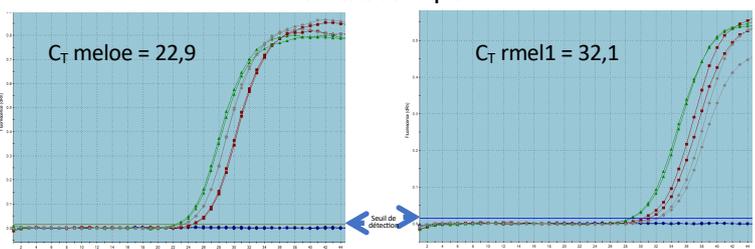
Conditions variables de PCR :  
(A) 50ng de cDNA, 100 pmol de Primers, T°= 60°C  
(B) 25ng de cDNA, 50 pmol de Primers, T°= 60°C  
(C) 25ng de cDNA, 50 pmol de Primers, T°= 62°C



**Figure 5** : Electrophorèse sur un gel non dénaturant d'agarose 2%. Mise au point des conditions de PCR pour étudier l'expression de *Rmel1* extrait des lignées M113 (2), M117 (3), M315 (4) de mélanomes. (1)Témoin négatif.

Conditions variables de PCR :  
(A) 50ng de cDNA, 50 pmol de Primers, T°= 60°C  
(B) 25ng de cDNA, 50 pmol de Primers, T°= 60°C

### Résultats de la qPCR



Le C<sub>T</sub> correspond au nombre de cycles à partir duquel la courbe PCR croise le seuil de détection de l'amplification fluorescente.

Le C<sub>T</sub> de *meloe* est plus faible que celui de *rmel1*, cela signifie qu'il atteint le seuil de détection plus tôt, car il est présent en plus grande quantité.

*meloe* est le gène le plus fortement exprimé dans les lignées.

<sup>1</sup> Godet et al, Journal of Experimental Medicine 2008

<sup>3</sup> F. Sousa et al, Plos one 2010

<sup>2</sup> Carbonnelle et al, Plos one 2013