



MEMBRE DE

**USPC**  
Université Sorbonne  
Paris Cité

UNIVERSITE PARIS 5  
RENE DESCARTES  
FACULTE DE MEDECINE



ECOLE DOCTORALE BioSPC ED562  
Développement, Génétique, Neurobiologie, Reproduction et Vieillessement (DGNRV)

## Thèse de Doctorat

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Juliette BERTRAND

# **Rôle de Dicer dans la pigmentation et sa régulation par les UVB dans le lignage mélanocytaire**

Directeur de Thèse: Lionel LARUE

Laboratoire de développement normal et pathologique des mélanocytes

Institut Curie, CNRS UMR3347, INSERM U1021

Présentée et soutenue publiquement le 20 septembre 2017

### Composition du jury

Président du jury	Dr. Alexandre BENMERAH, DR
Rapportrice	Pr. Marie-Dominique GALIBERT, PU-PH
Rapporteur	Pr. Thierry PASSERON, PU-PH
Examineur	Dr. Thierry DOUKI, chercheur
Examineur	Dr. Mehdi KHALED, CR
Invitée	Dr. Evelyne SAGE, DR
Directeur de thèse	Dr. Lionel LARUE, DR









## REMERCIEMENTS

Je souhaite d'abord remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ma thèse. Merci au Pr. Marie-Dominique GALIBERT et au Pr. Thierry PASSERON d'avoir lu et corrigé mon manuscrit de thèse, merci pour vos commentaires et suggestions. Merci également d'avoir su vous adapter aux courts délais que nous avons dû respecter. Merci au Pr. Marie-Dominique GALIBERT pour les discussions que nous avons pu avoir lors des différents congrès auxquels nous nous sommes rencontrées pendant ma thèse. Merci à mes examinateurs, Dr. Thierry DOUKI et Dr. Mehdi KHALED, d'avoir sans hésitation accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci au Dr. Alexandre BENMERAH d'avoir accepté la responsabilité de présider mon jury de thèse.

Je remercie sincèrement le Dr. Lionel LARUE d'avoir dirigé ma thèse pendant quatre années. Merci de m'avoir accueilli au laboratoire, dans l'équipe de "Développement Normal et Pathologique des Mélanocytes", en stage de M2. Merci d'avoir soutenu ma candidature pour les bourses de thèse et de m'avoir aidé dans le déroulement de ma thèse. La rigueur que tu demandes m'a permis, je pense, de progresser à différents niveaux et de grandir scientifiquement. J'ai bien peur que ton perfectionnisme et tes exigences en terme d'organisation ne laissent des traces dans la suite de ma carrière. Merci pour tes nombreux conseils et d'avoir été à l'écoute quand j'en avais besoin. Je suis également reconnaissante que tu m'aies permis d'encadrer des étudiants, c'est une expérience humaine enrichissante qui a renforcé mon assurance et a consolidé ma confiance envers les autres.

Je voudrais ensuite remercier Valérie d'avoir été présente tout au long de ma thèse. Valérie a suivi mon projet depuis le début de mon stage de M2 où elle m'a encadré sous la direction de Lionel. Valérie, merci pour ta présence au quotidien, le début de ma thèse a vraiment reposé sur tes conseils, et petit à petit j'ai réussi à prendre confiance en moi dans le labo. Nous avons travaillé ensemble sur le projet Dicer- $\beta$ -caténine pendant au moins trois ans, je présente donc certains de tes résultats dans ma thèse. Mis à part le côté scientifique, merci pour ta gentillesse, ta générosité et pour toutes les discussions qu'on a pu avoir. Ma voisine de bureau, la plus ancienne avec Madeleine, parmi les gens du labo, tu es la personne pour laquelle j'éprouve le plus de gratitude.

Je remercie également le Dr. Evelyne SAGE. Outre le fait que vous m'ayez accueillie dans votre bureau pendant la rédaction de ma thèse, merci d'avoir relu mon manuscrit, d'avoir fait partie de mes comités de thèse et merci d'avoir écouté mes questions naïves sur les UV et surtout d'y avoir répondu. Vos conseils ont été précieux et nos discussions toujours intéressantes.

Merci au Dr. Michel COHEN-TANNOUDJI d'avoir participé à mes comités de thèse, merci pour vos conseils et votre écoute.

Merci ensuite aux personnes des plateformes de l'Institut Curie qui nous aident dans nos expériences. Merci d'abord au personnel de l'animalerie, particulièrement Pauline et Jean-Didier qui prenez ou avez pris soin de nos souris avec attention, Adelin, Frédéric, Héléna et Eric, merci pour votre aide. Merci Christophe pour ta bonne humeur. Merci à Sophie en Histologie pour tes conseils. Merci à Charlène au FACS, à Marie-Noëlle et Claire en microscopie.

Mes remerciements les plus sincères maintenant aux gens du labo, présents ou passés, qui ont transformé ces quatre années de thèse en une expérience drôle, musicale, linguistique, enrichissante. La vie au labo est un cycle, d'arrivées et de départs, qui construit des rencontres éphémères ou durables. Un grand merci à Alejandro, Audrey, Camille, Christine, Delphine, Florian, Franck, Ha-Yeon, Irina, Jackie, Jérémy, Laura, Leslie, Madeleine, Maria, Marie, Mélanie, Michael, Ophélie, Pierre, Roselyne, Valérie, Véronique et Zackie. Merci à tous ceux qui ont participé à mon projet de thèse. Merci à mes voisins de paillasse pour nos discussions intenses et nos labyrinthes de fauteuils. Merci aux mamans du labo. Merci à mes compagnes de RER du début. Merci aux spécialistes pour vos conseils avisés. Merci aux filles pour votre motivation au sport, aux soirées et aux voyages. Merci pour votre folie dans le labo. Merci à celles qui me soutiennent depuis le début. Merci aux derniers arrivés qui m'ont retiré mon statut de "petite". Merci à tous pour votre gentillesse et votre aide.

Je remercie aussi mes étudiantes, Morgane et Bilen, d'avoir été patientes et appliquées dans vos stages afin de me permettre d'apprécier ces premières expériences d'encadrement.

Merci à l'ensemble des personnes de l'unité U1021 pour leur sympathie et leur dynamisme. Je remercie en particulier les personnes du club popote, que j'ai rejoint après une mauvaise expérience de courgettes. Nos discussions diverses et variées étaient parfaites pour se changer les idées.

Merci à mes parents et à Geneviève pour la relecture du manuscrit. Et enfin merci à ma famille, à mes amis et à Lucien pour leur soutien et leur compréhension tout au long de ma thèse.

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	5
TABLE DES MATIERES .....	8
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	11
PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	14
RESUME .....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUCTION .....	21
1. La peau et le lignage mélanocytaire.....	21
1.1 Structure et composition de la peau .....	21
1.1.1. Structure de la peau.....	21
1.1.1.1. Hypoderme.....	22
1.1.1.2. Derme.....	22
1.1.1.3. Epiderme .....	23
1.1.2. Composition cellulaire de l'épiderme .....	23
1.1.2.1. Kératinocytes .....	23
1.1.2.2. Cellules de Langerhans .....	24
1.1.2.3. Cellules de Merkel .....	25
1.1.2.4. Mélanocytes .....	25
1.1.3. Lignage mélanocytaire.....	25
1.1.3.1. Le lignage mélanocytaire chez les Vertébrés.....	25
1.1.3.2. Localisations des mélanocytes chez les Mammifères.....	26
1.1.3.2.1. Mélanocytes cutanés .....	26
1.1.3.2.2. Mélanocytes non cutanés .....	28
1.1.3.3. Fonctions.....	28
1.1.3.3.1. Réaction de mélanogenèse.....	28
1.1.3.3.2. Pigmentation cutanée.....	30
1.1.3.3.3. Réponse aux stress .....	31
1.2. Développement normal des mélanocytes.....	32
1.2.1. Des crêtes neurales aux mélanoblastes .....	32
1.2.1.1. Formation des crêtes neurales .....	32
1.2.1.2. Des cellules des crêtes neurales aux mélanoblastes.....	32
1.2.2. Des mélanoblastes aux mélanocytes différenciés .....	33
1.2.3. Homéostasie et renouvellement des mélanocytes adultes .....	34
1.2.4. WNT/ $\beta$ -caténine dans le développement des mélanocytes.....	36
1.3. Développement pathologique des mélanocytes.....	40
1.3.1. Pathologies associées à un dysfonctionnement du lignage mélanocytaire .....	40
1.3.1.1. Défaut de mise en place des mélanocytes.....	40
1.3.1.2. Défaut de fonction des mélanocytes .....	41
1.3.1.3. Défaut du maintien des mélanocytes: exemple du vitiligo .....	42
1.3.2. Pathologies associées à une transformation des mélanocytes: exemple du mélanome cutané .....	43
1.3.2.1. Description clinique du mélanome cutané.....	43
1.3.2.2. Facteurs de risque .....	44
1.3.2.3. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la mélanomagenèse.....	45

2. Le stress induit par les rayonnements ultra-violets.....	49
2.1. Les rayonnements ultra-violets et la peau.....	49
2.1.1. Définition des UV.....	49
2.1.2. Conséquences pathologiques et physiologiques des UV.....	51
2.1.2.1. Inflammation.....	51
2.1.2.2. Pigmentation.....	52
2.1.2.3. Synthèse de vitamine D.....	52
2.1.2.4. Cancers cutanés.....	53
2.1.2.5. Régression du vitiligo par thérapies PUVA ou NB-UVB.....	53
2.2. Effets biochimiques des UV.....	54
2.2.1. Réactions oxydatives.....	54
2.2.2. Dommages de l'ADN.....	55
2.2.3. Mécanismes de réparation des dommages de l'ADN induits par les UVB.....	57
2.3. Effets biologiques des UV dans les mélanocytes.....	60
2.3.1. Réponse aux dommages de l'ADN.....	61
2.3.1.1. Contrôles du cycle cellulaire.....	61
2.3.1.2. Régulation de la réparation des dommages.....	63
2.3.1.3. Apoptose.....	63
2.3.2. Signalisation de réponse aux stress.....	65
2.3.3. Pigmentation et protection contre les UV.....	70
3. La protéine Dicer et les microARN.....	73
3.1. Structure des RNase III et de Dicer.....	73
3.2. Fonctions moléculaires de Dicer.....	76
3.2.1. Fonctions cytoplasmiques.....	76
3.2.2. Fonctions nucléaires.....	78
3.2.2.1. Maturation nucléaire des microARN.....	78
3.2.2.2. Régulation de la transcription.....	78
3.2.2.3. Maturation des ARN ribosomiques.....	78
3.2.2.4. Régulation de la structure de la chromatine.....	79
3.2.2.5. Réparation des dommages de l'ADN.....	80
3.2.2.6. Fonction DNase.....	80
3.3. Régulation de Dicer.....	81
3.3.1. Mécanismes de régulation de Dicer.....	81
3.3.1.1. Mécanismes de régulation de l'ARN Dicer.....	81
3.3.1.2. Mécanismes de régulation de la protéine Dicer.....	82
3.3.2. Régulation de Dicer et des microARN par les stress.....	83
3.3.2.1. Régulation de Dicer par les stress.....	83
3.3.2.1. Régulation des microARN par les UV.....	84
3.4. Rôle de Dicer dans le développement.....	85
3.4.1. Dicer dans le développement normal chez les Mammifères.....	85
3.4.2. Dicer dans le développement du lignage mélanocytaire.....	88
4. Présentation du projet de la thèse.....	91
MATERIELS ET METHODES.....	95

RESULTATS .....	111
1. Rôle de Dicer dans la pigmentation et sa régulation dans le lignage mélanocytaire .....	113
1.1. Rôle de Dicer dans la pigmentation .....	113
1.2. Régulation de Dicer dans le lignage mélanocytaire.....	129
2. Régulation de $\beta$ -caténine et Dicer par les UVB dans le lignage mélanocytaire et leur implication dans la réponse au stress des UV .....	139
2.1. Les UVB répriment la migration des mélanocytes via l'activation de $\beta$ -caténine..	139
2.2. Les UVB répriment l'expression de Dicer via $\beta$ -caténine.....	157
DISCUSSION .....	169
1. Rôle de Dicer en conditions normales et de stress UVB .....	169
1.1. Dicer dans la pigmentation .....	169
1.2. Dicer dans la migration.....	172
1.3. Dicer dans la mélanomagenèse .....	173
1.4. Dicer dans la protection contre les UV .....	174
2. Mécanismes de régulation de Dicer dans le lignage mélanocytaire .....	176
2.1. Voies de régulation de Dicer en condition normale.....	176
2.2. Répression de Dicer par $\beta$ -caténine .....	178
2.3. Répression de Dicer par $\beta$ -caténine et FOXO en condition de stress UVB .....	179
BIBLIOGRAPHIE.....	185
ANNEXE .....	203
Z Aktary*, JU Bertrand*, and L Larue. The WNT-less wonder: WNT-independent $\beta$ -catenin signaling. <i>Pigment Cell Melanoma Res</i> 2016;29:524-540. ....	203

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### INTRODUCTION

Figure 1. Structure de la peau .....	21
Figure 2. Structure et composition de l'épiderme. ....	24
Figure 3. Localisations des mélanocytes chez les Mammifères .....	27
Figure 4. Réaction de synthèse de la mélanine: la mélanogenèse .....	29
Figure 5. Maturation des mélanosomes dans les mélanocytes .....	30
Tableau 1. Phototypes et leur réaction au soleil .....	31
Figure 6. Développement embryonnaire des mélanocytes chez la souris .....	33
Figure 7. Cycle pileux et renouvellement des mélanocytes chez la souris.....	35
Figure 8. Voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine .....	37
Figure 9. Voies de régulation du niveau et de la localisation de $\beta$ -caténine indépendantes de Wnt.....	38
Figure 10. Modèle de progression du mélanome cutané .....	46
Figure 11. Spectre solaire, classification des UV et pénétration dans la peau.....	50
Figure 12 Dommages directs de l'ADN induits par les UVB .....	56
Figure 13. Réparation des dommages par NER.....	58
Figure 14. Voies de signalisation et processus cellulaires régulés par les UV. ....	60
Figure 15. Points de contrôle du cycle cellulaire .....	62
Figure 16. Voies de signalisation PKC, MAPK et PI3K .....	67
Figure 17. Voie dépendante de MC1R .....	71
Figure 18. Domaines caractéristiques des RNase III et structure 3D de Dicer.....	74
Figure 19. Voie de biogenèse et de maturation des microARN et siARN .....	77
Tableau 2. Effet des stress sur l'expression de Dicer .....	83
Figure 20. Mutants murins conditionnels de Dicer dans le lignage mélanocytaire .....	86
Tableau 3. Oligonucléotides utilisés dans les expériences de PCR, qRT-PCR et ChIP .....	105
Tableau 4. Anticorps primaires et secondaires utilisés dans les expériences de western blot (WB), ChIP, immunohistofluorescence (IHF) et immunofluorescence (IF) .....	105
Tableau 5. Plasmides transfectés dans différentes lignées cellulaires .....	106
Tableau 6. SiARN transfectés dans différentes lignées cellulaires.....	106
Tableau 7. Inhibiteurs utilisés, cibles et conditions d'utilisation .....	106

Figure 21. Spectre d'émission de la lampe VL-330 utilisée pour les expériences d'irradiation .....	107
Figure 22. Représentation des allèles sauvage, floxé et défloxe de Dicer1 et amorces utilisées pour les amplifier par PCR .....	114
Figure 23. Hypopigmentation des mutants Tyr::Cre/ <sup>o</sup> ; Dicer F/F .....	115
Figure 24. Effet d'une diminution du niveau de Dicer sur la quantité de mélanine <i>in vitro</i> ..	116
Figure 25. Position de Dicer dans la classification des gènes en fonction de leur niveau d'expression dans les mélanoblastes murins à E15.5 .....	117
Figure 26. Prolifération des cellules du lignage mélanocytaire murin à P1, P2, P3 .....	118
Figure 27. Hypopigmentation des souris de trois semaines C57BL/6 invalidées pour Dicer à la naissance .....	120
Figure 28. Hypopigmentation des souris de dix semaines C57BL/6 invalidées pour Dicer à la naissance .....	122
Figure 29. Pigmentation des poils de souris invalidées pour Dicer à la naissance .....	123
Figure 30. Localisation anormale de mélanocytes chez les souris invalidées pour Dicer à la naissance .....	124
Figure 31. Effet d'une diminution du niveau de Dicer sur la migration et l'invasion <i>in vitro</i> ..	126
Figure 32. Position de Dicer dans la classification des gènes en fonction de leur niveau d'expression dans les cellules MNT-1 .....	130
Figure 33. Régulation du niveau d'ARNm de Dicer par PI3K, RSK et GSK3 $\beta$ mais pas par MEK, PKC et ATM .....	131
Figure 34. Immuno-précipitation de facteurs de transcription sur le promoteur de Dicer ....	133
Figure 35. Activités basales des promoteurs de constructions Dicer::luciférase .....	134
Figure 36. Répression de l'activité des constructions Dicer::luciférase par $\beta$ -caténine .....	135
Figure 37. Deux voies indépendantes de régulation de Dicer .....	137
Figure 38. Répression de Dicer par les UVB dans le lignage mélanocytaire .....	159
Figure 39. Répression de Dicer par les UVB dans des cellules non mélanocytaires .....	160
Figure 40. Répression de l'activité du promoteur de Dicer par les UVB via des sites FOXO et TCF .....	162
Figure 41. Réduction des CPD induits par les UVB après diminution de l'expression de Dicer .....	164
Figure 42. Hypothèse sur le rôle biologique de Dicer dans la réponse aux UVB .....	176



Tableau 1. Phototypes et leur réaction au soleil .....	31
Tableau 2. Effet des stress sur l'expression de Dicer .....	83
Tableau 3. Oligonucléotides utilisés dans les expériences de PCR, qRT-PCR et ChIP .....	105
Tableau 4. Anticorps primaires et secondaires utilisés dans les expériences de western blot (WB), ChIP, immunohistofluorescence (IHF) et immunofluorescence (IF) .....	105
Tableau 5. Plasmides transfectés dans différentes lignées cellulaires .....	106
Tableau 6. SiARN transfectés dans différentes lignées cellulaires.....	106
Tableau 7. Inhibiteurs utilisés, cibles et conditions d'utilisation .....	106

## PRINCIPALES ABREVIATIONS

6-4PP	pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduit
8-oxodGuo	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AKT	Thymoma viral proto-oncogene 1 – Protéine Kinase B
ARN	Acide ribonucléique
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine TriphosPhate
BER	Base Excision Repair – Réparation par excision de bases
BPP	Blastomes PleuroPulmonaires
CCN	Cellule des Crêtes Neurales
CDK	Cyclin-Dependant Kinase
ChIP	Chromatin Immunoprécipitation
CPD	Cyclobutane Pyrimidine Dimer – dimère cyclobutylique de pyrimidine
DCT	Dopachrome Tautomérase
DDRNA	DNA-damage RNA ou Dicer- and Drosha- dependent ARN
DEW	isomère de valence Dewar
DRG	Dorsal Root Gandlion – Ganglions de la racine dorsal
DSB	Double Strand Break – Cassure double brin
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelium-Mesenchymal Transition
ER	Estrogen Receptor
FOXO	Forkhead box O
GFP	Green Fluorescent Protein
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HPLC	High Performance Liquid Chromatography – Chromatographie en phase liquide à haute performance
LEF	Lymphoïd enhancer factor
LINE	Long Interspersed Nuclear Elements – Élément dispersé long
MAPK	Mitogen Activated Kinase-like Protein
MC1R	Melanocortin Receptor 1
McSC	Melanocyte Stem Cell – Cellule souche mélanocytaire
MEK	MAPK/ERK Kinase
miARN	microARN
MITF	Microphthalmia-associated Transcription Factor
MSA	Migration Staging Area – Zone de transit de migration
NB-UVB	Narrow-Band UVB
NER	Nucleotide Excision Repair – Réparation par excision de nucléotides
NLS	Nuclear Localization Signal – Signal de localisation nucléaire
NRAS	Neuroblastoma RAS Oncogene

ORF	Open Reading Frame – Cadre de lecture ouvert
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Protéine Kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PUVA	Psoralen-UVA
UV	Ultra-violet
RBD	RNA Binding Domain – Domaine de fixation à l'ARN
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RITS	RNA-Induced Transcriptional Silencing
ROS	Reactive Oxygen Species - Espèce réactive de l'oxygène
RPE	Retinal Pigment Epithelium - Epithélium pigmentaire rétinien
RSK	Ribosomal S6 Kinase
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
SCF	Stem Cell Factor
SCP	Schwann Cell precursor - Précurseur des cellules de Schwann
SINE	Short Interspersed Nuclear Elements – Élément dispersé court
siARN	Small interfering ARN - Petit ARN interférent
SOX	Sry-like HMG box containing gene
TAC	Transit Amplifying Cell – Cellule d'amplification transitoire
TCF	T-cell factor
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate
TYRP1/2	Tyrosinase-related protein 1/2
TTA	Tyramide-based Tyrosinase Assay
TYR	Tyrosinase
UTR	Untranslated Region – Région non traduite
VDR	Vitamine D Receptor
WNT	Wingless-related MMTV Integration site
WT	Wild-Type - Sauvage

## RESUME

Les mélanocytes, cellules responsables de la pigmentation de la peau et des poils, protègent les cellules des stress environnementaux, en particulier des rayonnements ultra-violet (UV) présents à la surface de la Terre. Les UV induisent des dommages moléculaires et régulent de nombreuses voies de signalisation en aval de MC1R, MAPK, PI3K, ou PKC. A court terme, les UV peuvent induire la mélanogenèse et à long terme participent à la mélanomagenèse. Dicer, protéine clef de la maturation des microARN, est régulée par différents stress. La protéine multifonctionnelle  $\beta$ -caténine est impliquée dans le développement des mélanocytes. Ces deux protéines participent à la régulation fine de l'expression génique. L'objectif de cette thèse est de mettre en évidence le rôle et la régulation de Dicer dans le lignage mélanocytaire dans des conditions normales et de stress (UVB).

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés au rôle de Dicer dans la pigmentation et sa régulation dans le lignage mélanocytaire. Nous avons montré, *in vivo* dans un modèle murin, que Dicer est nécessaire à la fois à la mise en place du lignage mélanocytaire et au fonctionnement de ce lignage chez l'adulte. L'absence de Dicer dans le lignage mélanocytaire affecte la localisation des mélanocytes de la papille dermique du follicule pileux et empêche la pigmentation du poil. *In vitro*, la transcription de Dicer est régulée par différentes voies, en particulier par les protéines PI3K, RSK, GSK3 $\beta$  et  $\beta$ -caténine. L'activité répressive de  $\beta$ -caténine sur la transcription de Dicer est dépendante de sites LEF/TCF.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'implication de Dicer, en relation avec  $\beta$ -caténine, dans la réponse aux UVB. Nous avons mis en évidence *in vivo* et *in vitro* la relocalisation nucléaire et l'activation transcriptionnelle de  $\beta$ -caténine induites par les UV. Tout comme  $\beta$ -caténine, les UVB répriment la migration des mélanocytes *in vitro*. Nous avons montré *in vitro* que les UVB répriment l'expression de Dicer et que cette répression est dépendante de sites de fixation de facteurs de transcription, dont LEF/TCF, présents dans la région promotrice de Dicer. Une diminution de Dicer participe à la protection des mélanocytes contre les UVB.

Ce travail de thèse a donc permis de montrer le rôle de Dicer dans la pigmentation adulte et de mettre en évidence des voies de régulation de l'expression de Dicer dans les mélanocytes non stressés et dans les mélanocytes soumis à un stress UVB.

## ABSTRACT

Melanocytes, cells responsible for pigmentation of the skin and hair, protect cells from environmental stress, especially ultra-violet radiations (UV) present on Earth floor. UV induce molecular damages and regulate many signaling pathways downstream of MC1R, MAPK, PI3K, or PKC. In the short term, UV can increase melanogenesis and in the long term, participate in melanomagenesis. Dicer, a key protein involved in microRNA maturation, is regulated by different types of stress. The multifunctional protein  $\beta$ -catenin is implicated in melanocyte development. These two proteins participate in fine regulation of gene expression. The goal of this thesis is to highlight the role and regulation of Dicer in the melanocyte lineage in normal and UVB stress conditions.

In the first part, we focused on the role of Dicer in pigmentation and its regulation in the melanocyte lineage. We showed that, in a mouse model *in vivo*, Dicer is necessary for both establishment of melanocyte lineage and proper function of this lineage in adults. The lack of Dicer in the melanocyte lineage affects localization of melanocytes in the dermal papilla of hair follicles, preventing hair pigmentation. *In vitro*, Dicer transcription is regulated by different pathways, including PI3K, RSK, GSK3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin. LEF/TCF sites mediate the repressive activity of  $\beta$ -catenin on Dicer transcription.

In the second part, we focused on the implication of Dicer, in connection with  $\beta$ -catenin, in the response to UVB by melanocytes. We showed the nuclear relocalization and transcriptional activation of  $\beta$ -catenin induced by UV both *in vivo* and *in vitro*. Like  $\beta$ -catenin, UVB represses melanocyte migration *in vitro*. We showed *in vitro* that UVB represses Dicer expression and that this repression is dependent on transcription factors binding sites in the Dicer promoter region including LEF/TCF. Decreased level of Dicer participates in protection of melanocytes against UVB.

This thesis work allowed us to show the role of Dicer in adult pigmentation and to highlight signaling pathways implicated in Dicer expression regulation in non-stressed melanocytes and in UVB-stressed melanocytes.



# INTRODUCTION





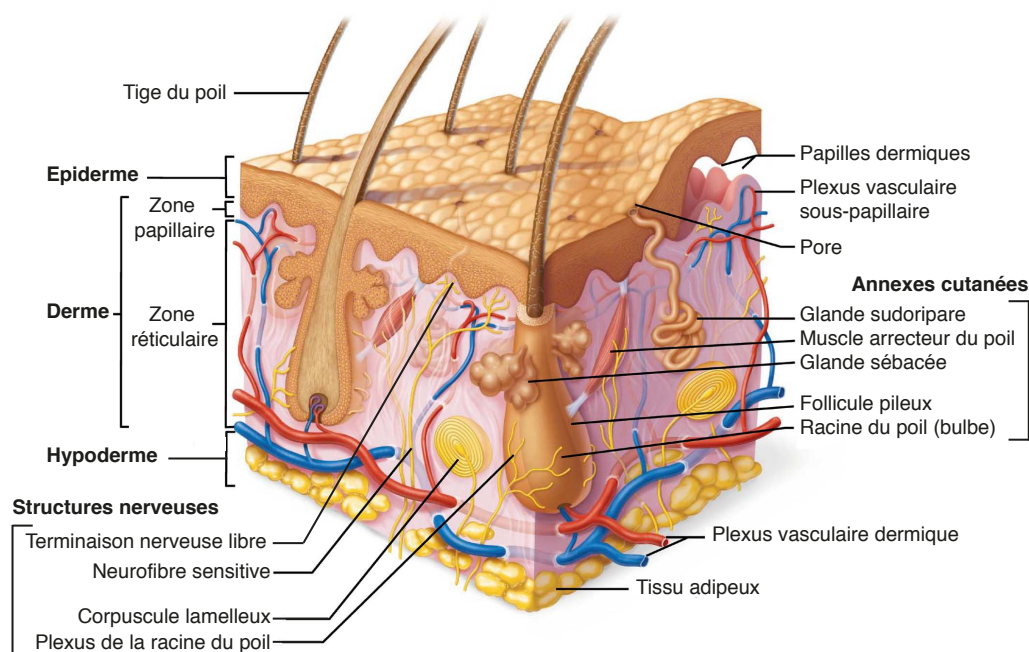
## INTRODUCTION

### 1. La peau et le lignage mélanocytaire

#### 1.1 Structure et composition de la peau

##### 1.1.1. Structure de la peau

La peau, organe le plus externe et le plus vaste de l'organisme, constitue une interface entre le milieu intérieur de l'organisme et l'environnement extérieur. La peau forme, avec ses annexes (phanères incluant poils et ongles, glandes sudoripares et sébacées), un système tégumentaire assurant des fonctions de protection mais également d'échanges avec l'environnement. Elle protège contre les agressions chimiques, physiques et biologiques, et régule les flux de chaleur (thermorégulation) et d'eau. Par la présence de nombreuses cellules nerveuses et immunitaires, elle transmet, aux tissus sous-jacents et à l'organisme, des informations sur l'environnement extérieur et y répond. La peau est divisée en trois couches principales nommées, de la plus interne à la plus externe, l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Figure 1). Sa forme adulte provient du développement de deux feuillets embryonnaires : l'épiderme dérive de l'ectoderme alors que le derme et l'hypoderme proviennent du mésoderme.



© ERPI, tous droits réservés.

**Figure 1. Structure de la peau**

Extrait de (Marieb EN, 2010).

#### 1.1.1.1. Hypoderme

L'hypoderme (ou fascia superficiel) est la couche la plus interne de la peau. L'hypoderme forme un tissu adipeux d'épaisseur variable (jusqu'à 3 cm chez l'Homme), en fonction de sa localisation et des apports de graisse, et se compose principalement d'adipocytes mais également de fibroblastes et de macrophages. L'hypoderme a un rôle de stockage de graisse et de synthèse hormonale, comme tous les tissus adipeux, mais surtout il relie le derme aux structures sous-jacentes tout en lui donnant une structure souple capable d'absorber les chocs. Les fonctions de l'hypoderme sont donc de protection mécanique des structures internes, de réserve d'énergie, de régulation endocrine et de protection et régulation thermique par isolation.

#### 1.1.1.2. Derme

Le derme est la couche intermédiaire de la peau et la plus riche en terme d'hétérogénéité cellulaire (fibroblastes, cellules nerveuses, cellules sanguines et lymphatiques). Le derme, formé d'un tissu conjonctif résistant et flexible de 1 à 2 mm d'épaisseur en moyenne, fournit les nutriments nécessaires aux cellules de l'épiderme. Les fibroblastes, cellules majoritaires du derme, synthétisent une matrice de collagène et de fibres élastiques qui confère au derme sa structure et son rôle de soutien à l'épiderme. Les autres cellules et structures spécialisées sont responsables des nombreuses fonctions du derme.

- Le derme est fortement innervé par différentes structures nerveuses: le plexus de la racine du poil et les corpuscules tactiles capsulés (ou disques de Merkel) situés dans les papilles dermiques servent de récepteurs fins du toucher, alors que les corpuscules lamelleux situés dans les zones profondes du derme sont les récepteurs des fortes pressions, et les terminaisons nerveuses libres proches de la lame basale de l'épiderme sont des récepteurs de la douleur.
- Les vaisseaux sanguins et lymphatiques, présents principalement dans le derme, permettent la vascularisation de la peau et donc la communication avec le reste de l'organisme. La régulation du flux sanguin participe également à la thermorégulation.
- Les glandes sudoripares sécrètent la sueur vers l'extérieur de l'organisme par les pores, participant ainsi à l'élimination de substances toxiques et à la thermorégulation.
- Les glandes sébacées, généralement associées aux follicules pileux, sécrètent une substance lipidique qui lubrifie le poil et la peau, protège du dessèchement et possède une action bactéricide. En fonction de la région de l'organisme, leur nombre peut augmenter (paume des

main, plante de pieds, front) et leur sécrétion peut se spécialiser (glandes cérumineuses ou mammaires).

- La racine du follicule pileux se trouve dans le derme mais provient de la croissance de cellules épidermiques. La base du follicule pileux, appelée bulbe, permet la croissance du poil et la réception de signaux mécaniques par les cellules nerveuses (plexus de la racine du poil) enroulées autour du follicule.

#### 1.1.1.3. Epiderme

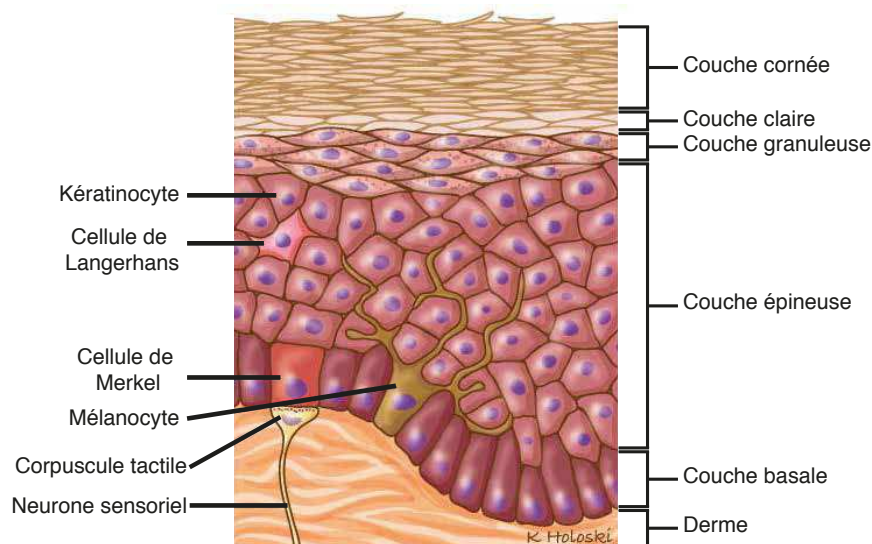
L'épiderme est la couche la plus externe de la peau formant la première barrière de protection contre les agressions physiques, chimiques et biologiques de l'environnement dues à la chaleur, aux rayonnements ultra-violets (UV), aux agents toxiques et pathogènes. L'épiderme est formé d'un épithélium stratifié squameux kératinisé, constitué de quatre types cellulaires: les kératinocytes, les cellules de Langerhans, les cellules de Merkel et les mélanocytes. L'épiderme repose sur le derme par sa couche basale dont les cellules se fixent à une matrice formée principalement de collagène, localisée entre le derme et l'épiderme et appelée la lame basale. L'épiderme n'étant pas vascularisé, la lame basale contrôle le flux de nutriments et de cellules provenant du derme et s'échappant de l'épiderme. L'épaisseur de l'épiderme, en moyenne de 100 µm, varie principalement en fonction de l'épaisseur de la couche cornée superficielle qui lui procure sa fonction protectrice contre les pertes d'eau et l'hyperhydratation.

#### 1.1.2. Composition cellulaire de l'épiderme

##### 1.1.2.1. Kératinocytes

Les kératinocytes, d'origine ectodermique, sont les cellules majoritaires de l'épiderme (90-95%). Les kératinocytes synthétisent les kératines, protéines fibreuses responsables des propriétés protectrices de l'épiderme. Les kératinocytes adhèrent les uns aux autres grâce aux jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions serrées. Les desmosomes relient les réseaux de kératines intracellulaires à une plaque desmosomale extracellulaire dans les couches profondes de l'épiderme (Aktary and Pasdar, 2012) et les jonctions serrées forment une barrière imperméable dans les couches superficielles de l'épiderme. Les cellules souches kératinocytaires sont localisées au niveau de la lame basale de l'épiderme et des annexes cutanées dont le bulge du follicule pileux qui fournira les kératinocytes du poil et du follicule

(Tadeu and Horsley, 2014). Les kératinocytes se différencient en migrant de la strate la plus interne vers la plus externe, formant cinq couches nommées couche basale, couche épineuse, couche granuleuse, couche claire et couche cornée (Figure 2). La couche basale est formée d'une seule couche de cellules, dont les cellules souches kératinocytaires, qui adhèrent à la lame basale par des hémidesmosomes et prolifèrent pour générer les couches supérieures. Au niveau basal, les kératinocytes reçoivent la mélanine contenue dans des vésicules, appelées mélanosomes, qui sont localisées autour du noyau et protègent l'ADN des cellules de l'épiderme contre les rayonnements UV. Lors de leur migration vers les couches externes, les kératinocytes se différencient progressivement: accumulation de mélanine transférée par les mélanocytes, accumulation de kératine, perte du noyau et des autres organites. Dans les couches externes, les kératinocytes forment les cellules kératinisées de la couche cornée avant d'être séparés de l'épiderme par desquamation. L'homéostasie de l'épiderme est assurée par un renouvellement intégral des kératinocytes toutes les 6 à 8 semaines chez l'Homme (Zhang et al., 2015). Les poils sont également constitués de kératinocytes au stade de différenciation finale. Les kératinocytes du poil forment plusieurs couches de cellules kératinisées qui contiennent de la kératine dure, plus solide et plus durable que celle de l'épiderme. L'homéostasie du follicule pileux est assurée par le cycle pileux qui dure, chez l'Homme, 15 à 40 semaines (Saitoh et al., 1970).



**Figure 2. Structure et composition de l'épiderme.**

D'après <http://www.headandneckcancerguide.org/>.

### 1.1.2.2. Cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans ou macrophages épidermiques, d'origine mésodermique, sont des cellules dendritiques immatures présentatrices d'antigènes. Les cellules de Langerhans

représentent 2 à 4% des cellules de l'épiderme et sont localisées majoritairement dans les couches supra-basales. En tant que macrophages, les cellules de Langerhans participent aux réponses immunitaires innées et adaptatives. Les cellules de Langerhans sont activées par capture et digestion des pathogènes et corps apoptotiques ou par des facteurs tels que les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par d'autres cellules de l'épiderme (Caux et al., 1992). Les cellules de Langerhans activées traversent la lame basale, entrent dans le système lymphatique et migrent vers les ganglions, où elles activent les lymphocytes T et induisent la réponse immunitaire adaptative.

#### 1.1.2.3. Cellules de Merkel

Les cellules de Merkel sont des mécano-senseurs présents dans la couche basale de l'épiderme. La proportion de cellules de Merkel dans l'épiderme varie entre 0,5% dans les régions peu sensibles et 5% dans les régions sensibles au toucher comme l'extrémité des doigts. Leur origine embryonnaire est la crête neurale. Les cellules de Merkel communiquent avec les fibres lentes des disques de Merkel du derme par des synapses pour former les récepteurs fins du toucher. Les cellules de Merkel transduisent activement un stimulus mécanique par des canaux cationiques (Piezo2) et induisent une réponse adaptée des signaux afférents tactiles (Maksimovic et al., 2014, Woo et al., 2014).

#### 1.1.2.4. Mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques qui synthétisent la mélanine responsable de la couleur de la peau, des poils et des cheveux. Les mélanocytes sont également responsables de la couleur des yeux car présents dans l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) de l'uvée. Les mélanocytes cutanés dérivent de la crête neurale et représentent environ 5% des cellules de l'épiderme. Ils sont localisés principalement dans la couche basale et dans le follicule pileux, où un mélanocyte interagit avec 36 kératinocytes en moyenne formant une unité épidermique de mélanisation (Figure 2).

### 1.1.3. Lignage mélanocytaire

#### 1.1.3.1. Le lignage mélanocytaire chez les Vertébrés

D'abord définie en 1966 par la présence de mélanosomes dans son cytoplasme (Levine et al., 1966), la cellule pigmentaire est actuellement définie chez les Chordés comme "une cellule

majoritairement pigmentée qui génère activement des organelles associées à la membrane afin de transmettre de la couleur par le biais de substances ou structures chromophores contenues dans ces organelles, ainsi que les précurseurs non pigmentés spécifiques de ce lignage qui se développeront en ces cellules pigmentaires et les dérivés pathologiques de ce lignage pigmentaire" (Schartl et al., 2016). Parmi les cellules pigmentaires, les mélanocytes sont donc définis par le pigment, la mélanine, qu'ils synthétisent et peuvent transmettre aux cellules environnantes grâce aux mélanosomes afin de leur donner la couleur brun/jaune. Les mélanoblastes dont ils dérivent et les cellules de mélanomes qu'ils développent de façon pathologique sont également des cellules pigmentaires. Les mélanocytes sont présents spécifiquement chez les Vertébrés et dans la majorité des espèces de ce groupe et sont le seul type de cellules pigmentaires présents chez les Mammifères (Schartl et al., 2016). Cette spécificité est expliquée par l'origine embryonnaire du lignage mélanocytaire qui se développe en majorité à partir des crêtes neurales, et minoritairement à partir du neuro-épithélium optique pour former l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE). Cependant, bien que les cellules pigmentaires semblent toutes trouver leur origine embryonnaire dans les bordures de la plaque neurale spécifique des Vertébrés, chez les Invertébrés, le Tunicate semble développer des cellules pigmentaires, appelées Otolith et Ocellus, provenant d'une structure assimilée à une crête neurale rudimentaire et exprimant le facteur de transcription Mitf, caractéristique des mélanocytes (Abitua et al., 2012). Cette observation conforte l'idée que, dans l'évolution, les mélanocytes dérivent de cellules pigmentaires primitives, contrôlées par un réseau de gènes ancestraux proche de celui des Vertébrés qui a favorisé l'expansion des dérivés des crêtes neurales chez les Vertébrés précoces (Green et al., 2015). Les mélanocytes des différentes familles de Vertébrés ont acquis des spécificités propres relatives à leur fonction, en particulier dans le type de pigment produit, et à leur localisation.

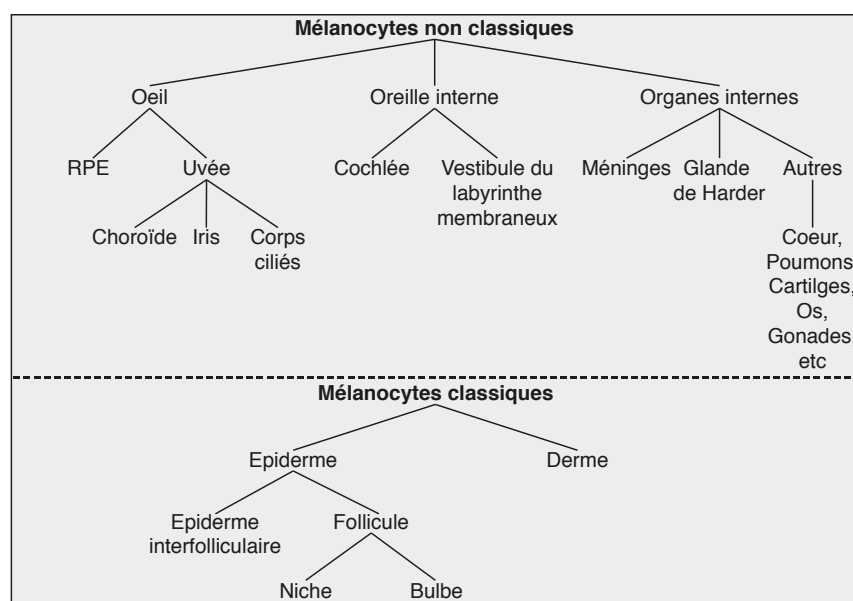
### 1.1.3.2. Localisations des mélanocytes chez les Mammifères

#### 1.1.3.2.1. Mélanocytes cutanés

Les mélanocytes classiques sont localisés dans l'épiderme et le derme de la peau où ils jouent principalement un rôle de protection contre les rayonnements ultra-violets (UV) (Colombo et al., 2011).

Dans l'épiderme, on distingue les mélanocytes inter-folliculaires localisés dans la couche basale et les mélanocytes folliculaires localisés dans le follicule pileux. Chez

l'Homme, les mélanocytes épidermiques sont majoritairement dans la couche basale de l'épiderme (Figure 2) donnant sa couleur à la peau, et dans les follicules pileux où ils donnent leur couleur aux poils. Chez les animaux à fourrure, dont les rongeurs, les mélanocytes épidermiques sont majoritairement folliculaires, et peu localisés dans la couche basale de l'épiderme ce qui explique l'absence de pigmentation de leur peau. Chez les rongeurs, des mélanocytes inter-folliculaires se trouvent dans les régions glabres (queue, oreille, museau, pattes). Dans les follicules pileux, les mélanocytes différenciés se situent au niveau de la base du follicule, ou bulbe, alors que les cellules souches mélanocytaires (McSC) sont localisées dans le bulge. Entre les McSC et les mélanocytes différenciés, des cellules progénitrices appelées TAC (Transient Amplifying Cells) peuvent se localiser le long du follicule pileux entre le bulge et le bulbe dans des états de différenciation et de pigmentation variables.



**Figure 3. Localisations des mélanocytes chez les Mammifères**

D'après (Colombo et al., 2011).

Dans le derme, les mélanocytes produisent la mélanine et interagissent non pas avec les kératinocytes mais avec les fibroblastes. Ils participent à la pigmentation de la peau mais ne transfèrent pas la mélanine aux cellules environnantes. Les fibroblastes stimulent la synthèse de mélanine et la survie des mélanocytes *in vitro* après irradiations UV de peaux reconstituées (Archambault et al., 1995). Plusieurs études ont mis en évidence l'existence de réservoirs de McSC dans le derme. Dans le derme de peaux glabres humaines, des cellules, exprimant les marqueurs de cellules souches NGFRp75 et OCT4, sont capables de former des sphères en culture et de se différencier en cellules neurales, des muscles lisses, chondrocytes, adipocytes et mélanocytes *in vitro* (Li et al., 2010). Dans un modèle de peaux reconstituées,



ces cellules souches dermiques colonisent la lame basale de l'épiderme et se différencient en mélanocytes. Dans le derme de peaux acrales murines, des mélanoblastes de l'épiderme colonisent, à la naissance, la portion sécrétrice de la glande sudoripare, et forment une population de cellules quiescentes capables de se différencier, à l'âge adulte, en mélanocytes migrant vers l'épiderme (Okamoto et al., 2014). La fréquence basale de différenciation de ces McSC en mélanocytes est faible, mais augmente avec l'âge ou suite à un stress génotoxique, tel qu'une irradiation ionisante.

#### 1.1.3.2.2. Mélanocytes non cutanés

Les mélanocytes ont également été observés dans l'œil, l'oreille, le cœur et le cerveau (Colombo et al., 2011). Dans l'œil, les mélanocytes sont localisés dans le RPE et dans l'uvée. Les mélanocytes du RPE sont différents des autres mélanocytes puisqu'ils dérivent du neuro-épithélium optique et ne semblent pas se renouveler ni synthétiser de mélanine chez l'adulte. La mélanine et les mélanocytes du RPE sont nécessaires au développement de la rétine (Jeffery et al., 1997) et à sa protection des dommages oxydatifs générés, en partie, par les rayonnements solaires. Les mélanocytes de l'uvée donnent à l'œil sa couleur, participent au contrôle de l'ouverture de la pupille et peuvent former un mélanome uvéal. Dans l'oreille les mélanocytes sont localisés dans la cochlée, où ils sont nécessaires à l'audition, et dans le labyrinthe du vestibule membraneux, où ils jouent un rôle dans l'équilibre. Les mélanocytes de la cochlée participent à la régulation de la concentration ionique de l'endolymphe nécessaire à la transduction du signal sonore par les cellules ciliées en régulant le flux des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{K}^{+}$ . Dans le cœur, les mélanocytes ont été observés dans les valves et septa (Yajima and Larue, 2008). Dans le cerveau, les mélanocytes ont été observés dans les méninges autour du bulbe olfactif et autour d'une artère de la fosse ptérigo-palatine (Gudjohnsen et al., 2015). Dans le cerveau, comme dans le cœur, la fonction des mélanocytes n'est pas encore connue.

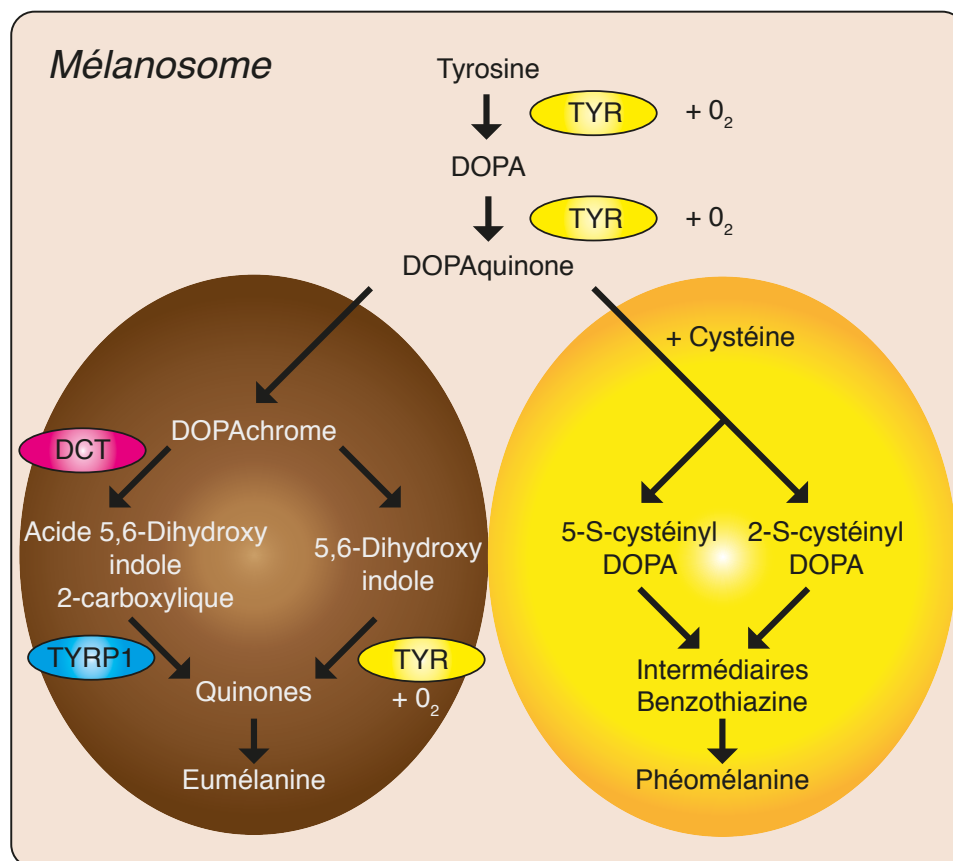
#### 1.1.3.3. Fonctions

##### 1.1.3.3.1. Réaction de mélanogenèse

La réaction de synthèse de la mélanine se produit dans les mélanocytes et conduit à la synthèse de deux pigments: l'eumélanine de couleur brun/noir et la phéomélanine de couleur rouge/jaune (Figure 4). Chez certains Vertébrés, dont les poissons, la phéomélanine n'a pas



été observée (Kottler et al., 2015, Panzella et al., 2014). L'importance relative de l'une ou l'autre des voies de synthèse est régulée par l'hormone de stimulation des mélanocytes ( $\alpha$ -MSH) via le récepteur à la mélanocortine 1 (MC1R) (Millington, 2006). La mélanogenèse est finement régulée par modulation du niveau d'expression et d'activité des enzymes nécessaires aux réactions. L'expression de TYR est activée par le facteur de transcription USF1 après un stress UV (Galibert et al., 2001) et la stabilité de la protéine TYR serait régulée par TYRP1 (Kobayashi et al., 1998, Manga et al., 2001). M-MITF (microphthalmia associated factor) est le facteur de transcription clef qui régule à la fois la transcription des trois enzymes TYR, DCT et TYRP1 (Hsiao and Fisher, 2014). L'expression de MITF est également régulée par de nombreuses voies de signalisation dont WNT/ $\beta$ -caténine, SCF/c-KIT et  $\alpha$ -MSH/MC1R (Eichhoff et al., 2011, Lin and Fisher, 2007, Saito et al., 2002).

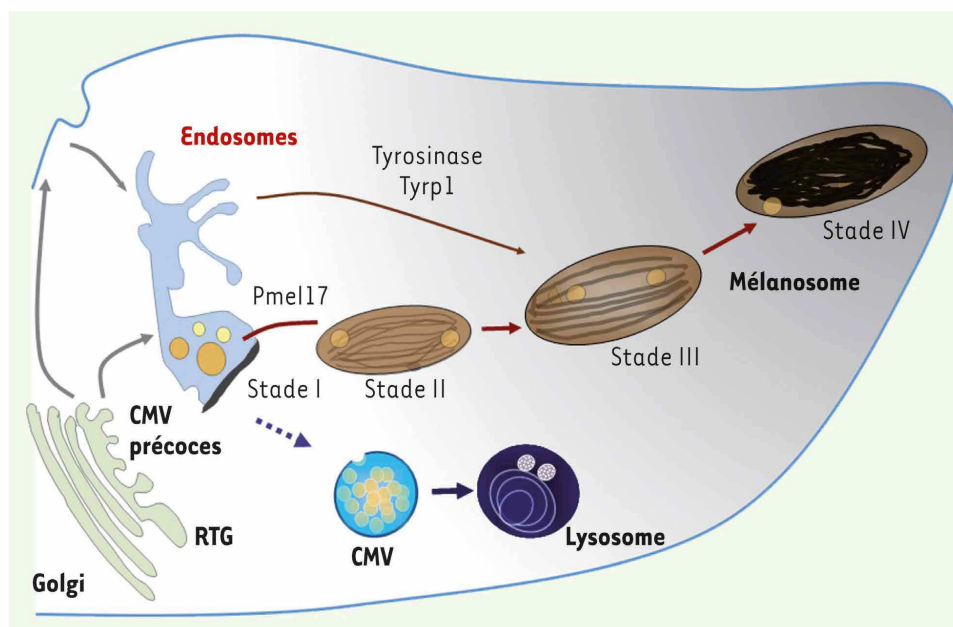


**Figure 4. Réaction de synthèse de la mélanine: la mélanogenèse**

Deux types de mélanine, l'eumélanine et la phéomélanine, sont synthétisées dans les mélanosomes grâce à l'activité de trois enzymes. La première enzyme, la tyrosinase (TYR), est commune à la synthèse des deux mélanines: elle hydroxyle la tyrosine en DOPA puis en DOPAquinone. La Dopachrome Tautomérase (DCT ou TYRP2) et la protéine apparentée à la Tyrosinase 1 (TYRP1) régulent finement la production d'eumélanine à partir de la DOPAquinone. La production de phéomélanine à partir de dopaquinone est dépendante de la cystéine. Inspiré de (Hearing, 2011, Videira et al., 2013).

#### 1.1.3.3.2. Pigmentation cutanée

La réaction de mélanogénèse se déroule dans les mélanocytes dans des organelles spécialisées dérivées des lysosomes: les mélanosomes. Les mélanosomes immatures non pigmentés (pré-mélanosomes de stade I et II) se forment à partir de l'endosome et deviennent pigmentés au cours de leur maturation grâce à l'activité des enzymes de la mélanogénèse (stades III et IV) (Figure 5) (Delevoye et al., 2011). Les mélanosomes matures sont transférés aux kératinocytes suivant quatre modèles construits à partir d'expériences *in vitro*: l'exocytose, la cytophagocytose (de dendrites ou filopodes), la formation d'un nanotube tunnel par fusion des membranes, le transfert vésiculaire (petite ou grande vésicule) (Tadokoro and Takahashi, 2017). Pour la pigmentation de l'épiderme, un mélanocyte transfère ses mélanosomes à environ 36 kératinocytes, formant une unité de mélanisation. Pour la pigmentation du poil, dans le bulbe, les mélanocytes transfèrent leurs mélanosomes aux kératinocytes qui se différencieront pour former le poil pigmenté.









**Figure 5. Maturation des mélanosomes dans les mélanocytes**

D'après (Delevoye et al., 2011).

Si une mutation dans l'un des gènes impliqués dans ces mécanismes entraîne une anomalie de pigmentation (partie 1.3.1.2), les variations fines de pigmentations entre individus sont dues, non pas au nombre de mélanocytes, mais à la quantité de mélanine synthétisée et au rapport eumélanine/phéomélanine, tous deux liés à une régulation fine de l'expression et de l'activité des enzymes de mélanogénèse. Ces variations sont classées en six phototypes en fonction de la couleur de la peau, des yeux, des cheveux et de la réponse aux

rayonnements solaires (Tableau 1). La pigmentation est donc dépendante de nombreux mécanismes, chacun dépendant de nombreuses protéines: la réaction de mélanogénèse, la formation, la maturation, le transport et le transfert des mélanosomes.

CLASSIFICATION		
	CARACTÉRISTIQUES	RÉACTION AU SOLEIL
 <b>Phototype 1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Peau très blanche</li> <li>● Cheveux roux ou blonds</li> <li>● Yeux bleus/verts</li> <li>● Souvent des taches de rousseur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Coups de soleil systématiques</li> <li>● Ne bronze jamais, rougit toujours</li> </ul>
 <b>Phototype 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Peau claire</li> <li>● Cheveux blonds-roux à châains</li> <li>● Yeux clairs à bruns</li> <li>● Parfois apparition de taches de rousseur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Coups de soleil fréquents</li> <li>● Bronze à peine ou très lentement</li> </ul>
 <b>Phototype 3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Peau intermédiaire</li> <li>● Cheveux châains à bruns</li> <li>● Yeux bruns</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Coups de soleil occasionnels</li> <li>● Bronze graduellement</li> </ul>
 <b>Phototype 4</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Peau mate</li> <li>● Cheveux bruns/noirs</li> <li>● Yeux bruns/noirs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Coups de soleil occasionnels lors d'expositions intenses</li> <li>● Bronze bien</li> </ul>
 <b>Phototype 5</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Peau brun foncé</li> <li>● Cheveux noirs</li> <li>● Yeux noirs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Coups de soleil rares</li> <li>● Bronze beaucoup</li> </ul>
 <b>Phototype 6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Peau noire</li> <li>● Cheveux noirs</li> <li>● Yeux noirs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Coups de soleil très exceptionnels</li> </ul>

Source: Vigie cancer, votre peau est en danger (Réseau Mélanome Ouest)

**Tableau 1. Phototypes et leur réaction au soleil**

#### 1.1.3.3.3. Réponse aux stress

La principale fonction des mélanocytes est la synthèse de mélanine et la pigmentation de la peau. Le rôle de la pigmentation est principalement de protéger les cellules épidermiques, mélanocytes et surtout kératinocytes, mais également les tissus sous-jacents, contre les rayonnements UV, qui induisent des dommages de l'ADN et un stress cellulaire. La mélanine protège également les cellules des substances toxiques en captant et accumulant par exemple les métaux et les drogues. Plus généralement, la mélanine protège les cellules contre les ROS et les dommages oxydatifs, ce qui expliquerait la présence de mélanocytes dans des organes qui ne sont pas exposés à la lumière mais sont soumis à des stress importants, comme la cochlée (ElObeid et al., 2016, Tada et al., 2010).

De plus, la synthèse de mélanine est induite par l'inflammation, en particulier après une exposition au soleil, résultant en une hyperpigmentation à long terme. Les mélanocytes sont également impliqués dans la réponse inflammatoire par leur fonction phagocytaire. Ils sont impliqués dans la réponse immunitaire adaptative car capables de présenter ou traiter des

antigènes *in vitro* (Le Poole et al., 1993) ou d'interagir avec les cellules de Langerhans (Nordlund et al., 1998). Enfin les mélanocytes ont une fonction autocrine liée principalement à la synthèse de l' $\alpha$ -MSH en réponse aux UV qui induit la mélanogenèse et participe ainsi à la réponse au stress.

## 1.2. Développement normal des mélanocytes

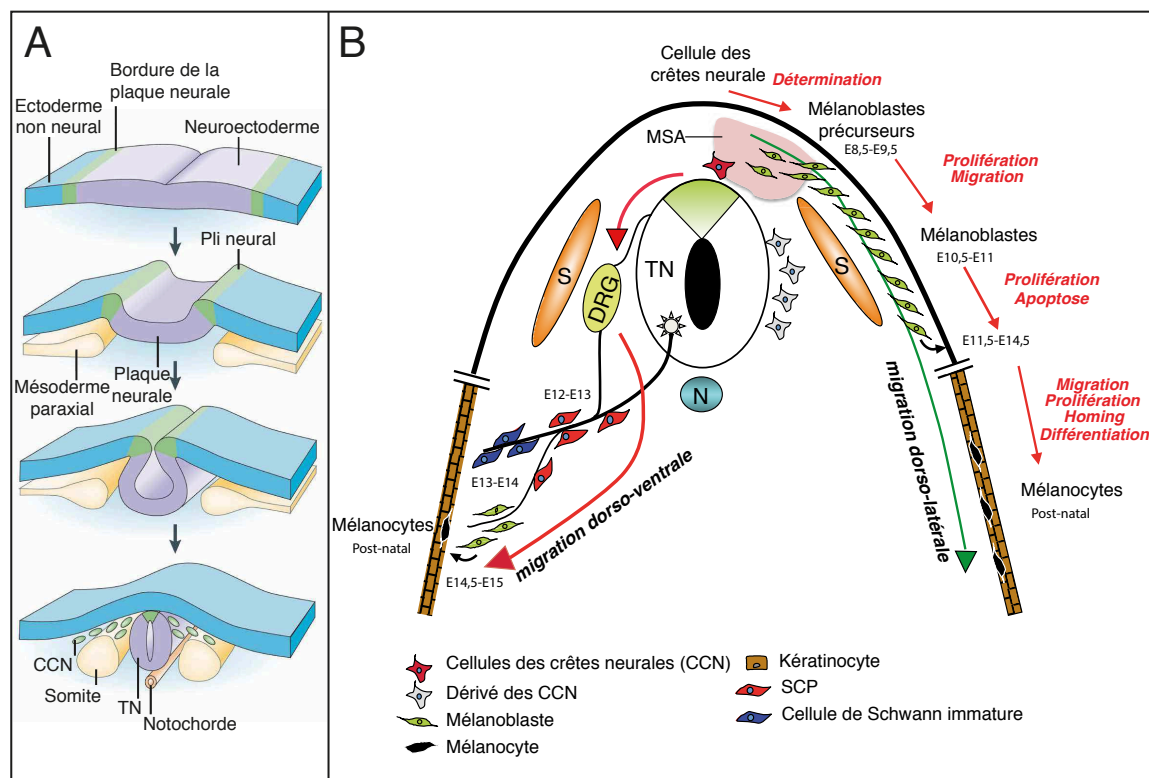
### 1.2.1. Des crêtes neurales aux mélanoblastes

#### 1.2.1.1. Formation des crêtes neurales

L'ectoderme est prédéterminé en ectoderme non neural et plaque neurale séparés par deux régions de bordures (Figure 6A). Les mélanocytes ont pour origine embryonnaire les bordures de la plaque neurale, qui donnent les crêtes neurales, à l'exception des mélanocytes du RPE, qui viennent du neuroectoderme. La détermination des cellules des crêtes neurales (CCN) est finement contrôlée spatio-temporellement par les facteurs WNT, BMP et NOTCH, qui régulent l'expression de facteurs de transcription tels que FOXD3 (Dottori et al., 2001), SOX10 (McKeown et al., 2005), SLUG/SNAIL (del Barrio and Nieto, 2002) participant au contrôle de la migration, de l'EMT et du caractère multipotent des CCN.

#### 1.2.1.2. Des cellules des crêtes neurales aux mélanoblastes

Les CCN forment une population de cellules multipotentes et transitoires qui engendrera de nombreux dérivés cellulaires caractéristiques des Vertébrés dont les mélanocytes, les neurones, les cellules gliales, les chondroblastes et les ostéoblastes (Green et al., 2015). Les CCN migrent suivant deux voies (Bonaventure et al., 2013, Ernfors, 2010) : la première voie de migration dorso-latérale ne générera que des mélanocytes, la deuxième voie de migration dorso-ventrale générera des précurseurs neuronaux, des précurseurs de fibroblastes endoneuronaux, ainsi que des précurseurs gliaux bipotents qui peuvent se différencier en cellules de Schwann et en mélanocytes (Adameyko et al., 2009) (Figure 6B). Les mélanocytes issus de la deuxième voie participent à la pigmentation de l'extrémité des membres et du ventre (Ernfors, 2010).



**Figure 6. Développement embryonnaire des mélanocytes chez la souris**

(A) L'invagination de l'ectoderme entraîne la formation de trois structures. (i) La plaque neurale invaginée se ferme pour former le tube neural au stade E8 chez la souris. (ii) Les bordures de la plaque neurale forment d'abord un pli neural dont les cellules se détachent du tube neural par transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) pour donner les cellules des crêtes neurales (CCN). (iii) L'ectoderme non neural donnera l'épiderme. (B) Les deux vagues du développement des mélanocytes chez la souris. Suivant la voie dorso-latérale, au stade E8.5, les CCN migrent, entre les somites 8 et 28, dans une région de transit (MSA) située entre la partie dorsale du tube neural et l'ectoderme. C'est dans cette MSA que les premiers mélanoblastes précurseurs commencent à se différencier et à proliférer. Les mélanoblastes migrent et prolifèrent dans le derme en développement de E10.5 à E15.5. Une partie des mélanoblastes traverse la lame basale et colonise l'épiderme entre E11.5 et E14.5 pour former les mélanocytes épidermiques alors que l'autre partie forme les mélanocytes dermiques. Suivant la voie dorso-ventrale, les CCN migrent entre les somites et le tube neural pour donner les précurseurs des cellules de Schwann (SCP) localisés sur les nerfs. Ces SCP forment des cellules de Schwann et des mélanoblastes qui migrent plus tardivement (E14-E15) dans l'épiderme. CCN cellules des crêtes neurales; TN tube neural; N notochorde; S somites; MSA migration staging area (région de transit); DRG ganglions de la racine dorsale; SCP précurseurs des cellules de Schwann. Adapté de (Bonaventure et al., 2013, Gammill and Bronner-Fraser, 2003, Luciani et al., 2011).

### 1.2.2. Des mélanoblastes aux mélanocytes différenciés

A partir de E15.5 chez la souris, des cellules dermiques (kératinocytes et mélanocytes) se spécialisent, se regroupent en petits amas sous l'épiderme et généreront par croissance bidirectionnelle le follicule pileux (Alonso and Fuchs, 2006). Les mélanoblastes migrent vers le futur follicule pileux en formation et donnent deux populations: le stock de cellules souches mélanocytaires (McSC) et les mélanocytes du premier cycle pileux. Les gènes *Tyr* et

*Tyrp1*, caractéristiques de la différenciation finale des mélanocytes, commencent à être exprimés au stade E15.5.

Une partie des mélanoblastes, qui ont colonisé le futur follicule pileux, va former le "*pool*" de McSC, localisé dans le bulge, structure caractérisée par un renflement sous la glande sébacée à la base du muscle érecteur du poil. Dans cette structure sont également localisées les cellules souches kératinocytaires du follicule pileux. A chaque cycle pileux, les McSC se divisent pour se différencier en mélanocytes et permettre la pigmentation du poil, tout en maintenant le *pool* de cellules souches intact (Nishimura et al., 2002).

L'autre partie des mélanoblastes du futur follicule pileux se différencie directement en mélanocytes matures pour permettre la pigmentation du premier poil. L'expression de Sox10, probablement induite par Mitf et réciproquement, est nécessaire à la pigmentation du premier poil, alors que l'absence d'expression de Sox10 est requise pour la mise en place des McSC dans le bulge (Harris et al., 2010). SOX9, un autre facteur de la famille SOXE, induit la différenciation des cellules des crêtes neurales de poulet au stade E10-11 et favorise la détermination des cellules des crêtes neurales après délamination en cellules gliales ou mélanocytes (Cheung and Briscoe, 2003). Le premier cycle pileux est différent des suivants car il provient des mélanoblastes embryonnaires et non pas des McSC du bulge, c'est pourquoi il peut être appelé cycle pileux embryonnaire. Il permet la morphogenèse de la portion permanente du follicule pileux. Aucun autre follicule ne sera formé à l'âge adulte. L'origine dermique ou épidermique et les propriétés fonctionnelles, dont la prolifération, des mélanocytes du cycle pileux embryonnaire sont peu connues.

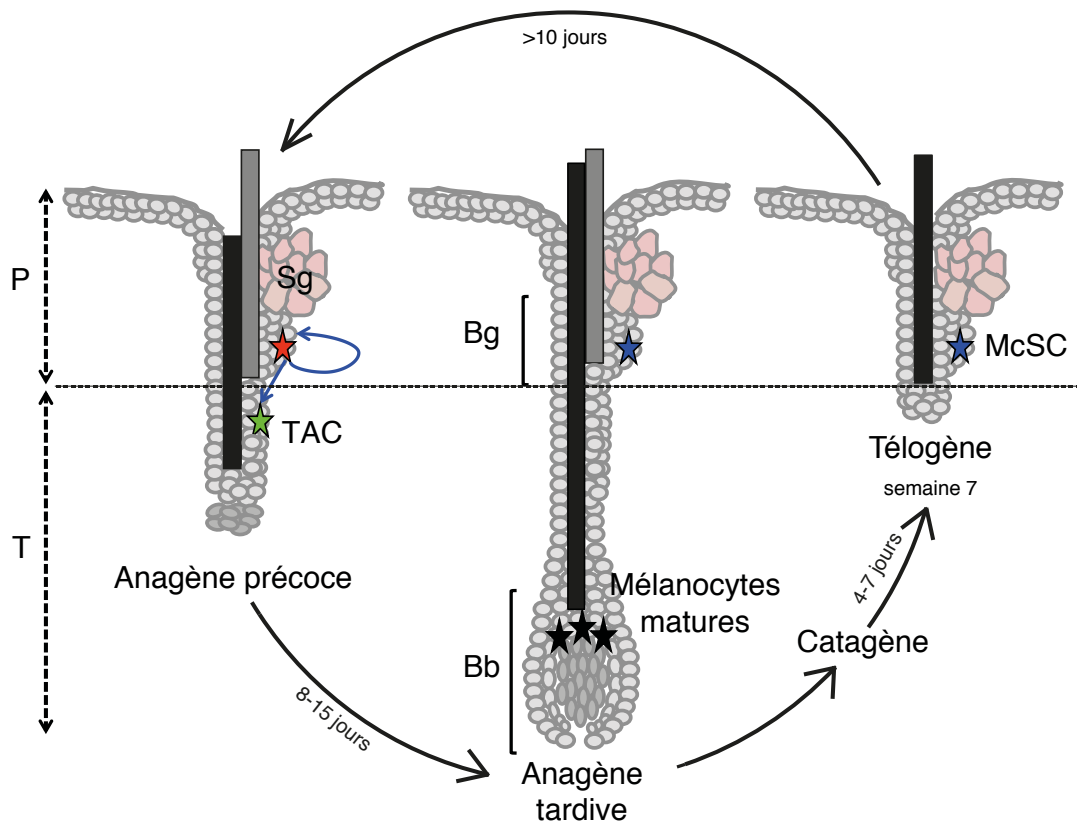
### 1.2.3. Homéostasie et renouvellement des mélanocytes adultes

Chez l'adulte, les mélanocytes se renouvellent à partir de McSC unipotentes situées dans le bulge du follicule pileux (Tadeu and Horsley, 2014). Des McSC ont également été caractérisées dans le derme humain de peaux glabres (Li et al., 2010) et au niveau des glandes sudoripares (Okamoto et al., 2014). Le cycle pileux, qui conduit à la formation d'un poil, est associé au cycle du follicule pileux et dure environ 3 semaines chez la souris et 15 à 40 semaines chez l'Homme (Saitoh et al., 1970). Les études sur des modèles murins ont permis de distinguer trois principales phases de développement du poil et du follicule pileux: l'anagène (8 à 10 jours chez la souris) est la phase de croissance active du poil, la catagène (4 à 7 jours) est une phase de régression et la télogène est une phase de repos d'une durée



variable (plus de 10 jours) (Figure 7). Le cycle pileux peut être interrompu par arrachage du poil (épilation), ce qui active un nouveau cycle pileux.

En anagène, les McSC sortent de quiescence et entrent en prolifération dans le bulge. Afin de maintenir un *pool* de McSC intact, chaque McSC proliférative doit fournir au moins une McSC par division symétrique ou asymétrique suivant un mécanisme encore inconnu. Les McSC en division génèrent également des cellules progénitrices ou TAC (Transient Amplifying Cell) probablement par division asymétrique. Les TAC prolifèrent, migrent en même temps que le follicule croit vers l'intérieur du derme et se différencient en mélanocytes exprimant les enzymes de la mélanogénèse. Les mélanocytes matures du bulbe transfèrent la mélanine aux kératinocytes environnants qui forment le poil en croissance.



**Figure 7. Cycle pileux et renouvellement des mélanocytes chez la souris**

Les différentes phases du cycle pileux sont communes aux Mammifères mais la durée de ces phases est variable entre espèces et entre individus. L'indication temporelle est une estimation chez la souris. P portion permanente ; T portion transitoire ; Bb bulbe ; Bg bulge ; Sg Glande sébacée ; McSC cellule souche mélanocytaire quiescente (bleu) ou non-quiescente (rouge) ; TAC cellule d'amplification transitoire (vert) ; mélanocyte (noir).

La catagène est une phase d'importante mort cellulaire par apoptose des cellules du bulbe dont les mélanocytes. La disparition des mélanocytes à ce stade explique la nécessité

de recoloniser le bulbe à chaque cycle pileux. La fin d'anagène/début de catagène est déclenchée par des signaux dont des facteurs de croissance (FGF5, EGF), des neutrophines (BDNF) et des facteurs de la famille TGF $\beta$ .

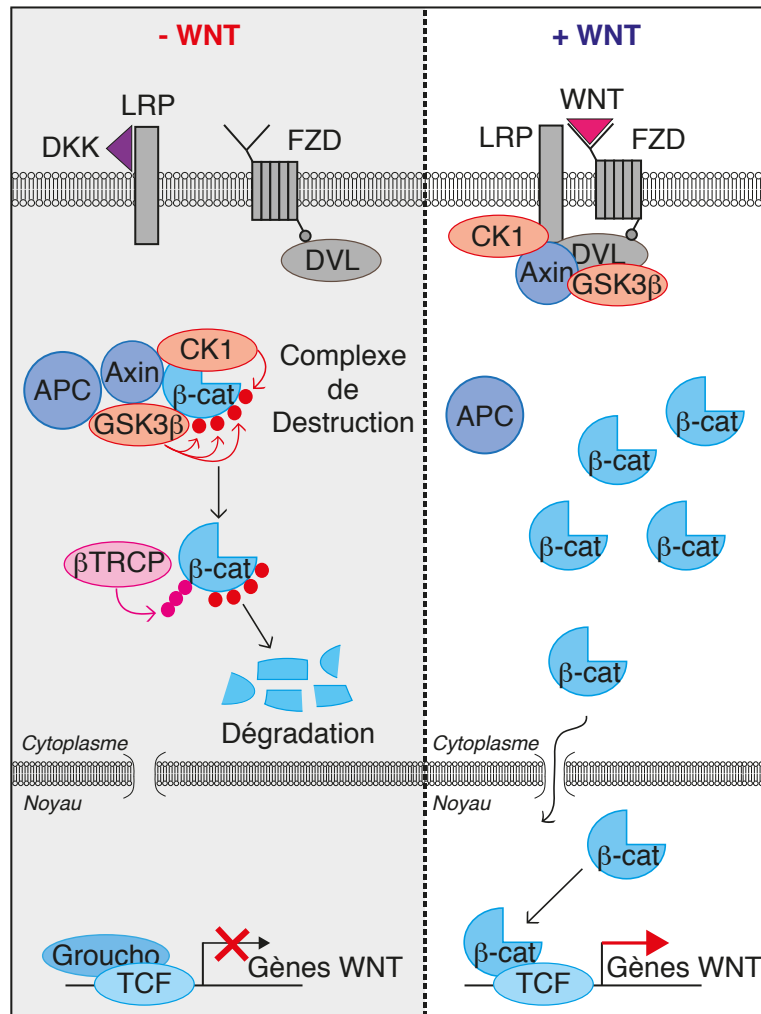
La télogène est une phase de repos où seule la portion permanente du poil est maintenue. Dans le bulge en quiescence, TGF $\beta$  inhibe l'expression des gènes de différenciation et induit l'arrêt du cycle cellulaire (Nishimura, 2011). Cette phase peut s'allonger et s'arrête avec l'entrée dans l'anagène du cycle suivant, après induction des signaux SHH, WNTs ou activation de  $\beta$ -caténine (Lowry et al., 2005, St-Jacques et al., 1998, Van Mater et al., 2003). La voie Notch est également impliquée dans le contrôle de la différenciation des mélanocytes: l'invalidation de Notch dans le lignage mélanocytaire murin induit une différenciation précoce des McSC dans le bulge et une localisation ectopique de mélanocytes pigmentés dans le derme (Aubin-Houzelstein et al., 2008). Les signaux BMPs sont impliqués dans la formation des poils (Kulesa et al., 2000).

#### 1.2.4. WNT/ $\beta$ -caténine dans le développement des mélanocytes

La protéine  $\beta$ -caténine fait partie de la famille *Armadillo*, caractérisée par la répétition de domaines fonctionnels *Armadillo*, qui interagissent avec de nombreux partenaires dont les cadhérines. La protéine  $\beta$ -caténine, encodée par le gène *CTNNB1*, est conservée chez les métazoaires jusqu'aux cnidaires, chez qui un homologue de  $\beta$ -caténine est présent (Zhao et al., 2011). La protéine  $\beta$ -caténine possède 12 domaines *Armadillo* entourés de deux domaines N- et C- terminaux. L'interaction de ces domaines *Armadillo* avec les protéines des jonctions adhérentes, avec des protéines de dégradation, de rétention, d'export nucléaire, avec des facteurs de transcription, des facteurs co-activateurs ou co-répresseurs, confère à  $\beta$ -caténine ses fonctions moléculaires dans l'adhésion cellule-cellule, la signalisation cellulaire et la régulation de l'expression génique (Valenta et al., 2012).

$\beta$ -caténine est une protéine multifonctionnelle possédant trois localisations cellulaires associées à trois fonctions. La régulation de la localisation de  $\beta$ -caténine par les facteurs WNTs est bien connue (Figure 8) mais la localisation de  $\beta$ -caténine est également soumise à d'autres facteurs comme EGF (Epidermal Growth Factor) et d'autres protéines comme CAV1 ou  $\gamma$ -caténine (ou plakoglobine, PG) (Figure 9). La régulation de  $\beta$ -caténine, "indépendante de WNT", ainsi que ses rôles dans le lignage mélanocytaire, sont abordés dans la revue en annexe (Aktary et al., 2016).





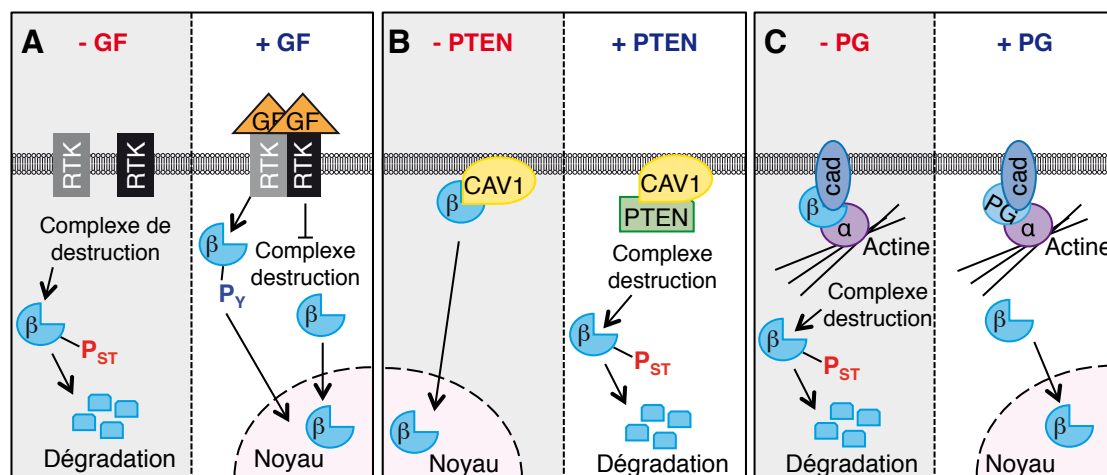
**Figure 8. Voie canonique Wnt/β-caténine**

En absence de ligand Wnt, ou en présence d'un inhibiteur tel que DKK1 (Dickkopf), β-caténine interagit avec le complexe de destruction composé de APC, AXIN1, CK1 et GSK3β. β-caténine est phosphorylée par les kinases CK1 (Ser45) et GSK3β (Thr41, Ser37, Ser33) induisant son ubiquitination par β-TRCP et sa dégradation par le protéasome. Dans le noyau, les facteurs de transcription LEF/TCF, en interaction avec Groucho, répriment la transcription de gènes cibles. En présence de Wnt, le récepteur Frizzled (FZD) interagit avec le corécepteur LRP5/6. L'activation de Frizzled entraîne l'activation de Dishevelled (DVL), le recrutement de CK1 et GSK3β qui phosphorylent LRP5/6 entraînant le recrutement de AXIN et la libération de β-caténine du complexe de destruction. β-caténine peut alors transloquer dans le noyau et interagir avec la machinerie de transcription dont les facteurs de transcription de la famille LEF/TCF pour activer ou inhiber la transcription de gènes cibles. Adapté de (Staal et al., 2008).

A la membrane, β-caténine, couplée aux cadhérines de types I (dont E-cadhérine) et II, interagit avec l'α-caténine et l'actine et participe ainsi à l'adhérence des cellules. La présence de β-caténine dans ce complexe est soumise à la compétition avec γ-caténine, une autre protéine de la famille *Armado* (Figure 9C), et à son interaction avec CAV1, une protéine de la famille des *caveolae* participant au trafic vésiculaire (Figure 9B). Dans des cellules de mélanome, la perte de PTEN augmente l'interaction entre CAV1 et β-caténine,

diminue l'interaction entre E-cadhérine et  $\beta$ -caténine et augmente l'activité transcriptionnelle de  $\beta$ -caténine (Conde-Perez et al., 2015).

Dans le cytoplasme,  $\beta$ -caténine interagit avec un complexe multiprotéique et participe à la voie WNT (Figure 8). En absence de WNT, la phosphorylation de  $\beta$ -caténine sur la sérine 45 par CK1, sur la thréonine 41 et les sérines 37 et 33 par GSK3 $\beta$  (Liu et al., 2002) induit sa dégradation. Après stimulation par un facteur WNT, le complexe de destruction est dissocié et  $\beta$ -caténine stabilisée. Les facteurs de croissance, tels que EGF, régulent également la stabilité de  $\beta$ -caténine (Figure 9A). L'activation de EGFR entraîne la phosphorylation des tyrosines 86, 33 ou 654, réduit l'interaction avec la E-cadhérine et augmente l'activité transcriptionnelle de  $\beta$ -caténine (Miravet et al., 2003, Valenta et al., 2012, Yang et al., 2011). D'autres récepteurs tyrosine-kinase (RTK), tels que IGFR, VEGFR ou FGFR, sont également impliqués dans la remobilisation du *pool* de  $\beta$ -caténine membranaire ou cytoplasmique vers le noyau.



**Figure 9. Voies de régulation du niveau et de la localisation de  $\beta$ -caténine indépendantes de Wnt**

(A) La fixation de différents facteurs de croissance (GF; ex: EGF, IGF) à leurs récepteurs (RTK; ex: EGFR, IGFR) induit à la fois la phosphorylation activatrice de tyrosines de  $\beta$ -caténine et l'inhibition de GSK3 $\beta$ , permettant l'accumulation de  $\beta$ -caténine et sa translocation vers le noyau. En absence de facteurs de croissance, on considère que le complexe de destruction est actif. (B) En absence de PTEN,  $\beta$ -caténine interagit avec CAV1 qui permet la translocation nucléaire de  $\beta$ -caténine et son activité co-transcriptionnelle. En présence de PTEN, l'interaction entre  $\beta$ -caténine et CAV1 est réduite et  $\beta$ -caténine est dégradée par le complexe de destruction. (C) Lorsque le niveau de  $\gamma$ -caténine (ou plakoglobine PG) est faible,  $\beta$ -caténine interagit avec les cadhérines et  $\alpha$ -caténine à la membrane alors que le niveau cytoplasmique de  $\beta$ -caténine est contrôlé par le complexe de destruction. Lorsque le niveau de PG est élevé, PG remplace  $\beta$ -caténine à la membrane et interagit avec le complexe de destruction entraînant une accumulation de  $\beta$ -caténine et sa translocation nucléaire. D'après (Aktary et al., 2016).

Dans le noyau,  $\beta$ -caténine s'associe à des cofacteurs et régule l'expression génique (Larue et al., 2003). L'interaction de  $\beta$ -caténine avec les facteurs de transcription LEF/TCF, induite par WNT, a été montrée dans de nombreux types cellulaires (Schepsky et al., 2006). Le complexe LEF/TCF- $\beta$ -caténine interagit également avec des activateurs transcriptionnels tels que p300/CBP. La voie canonique WNT veut qu'en absence de  $\beta$ -caténine nucléaire, TCF réprime la transcription, alors qu'en présence de  $\beta$ -caténine, TCF induit la transcription (Figure 8). Or plusieurs études ont montré que  $\beta$ -caténine peut activement réprimer la transcription, par exemple des gènes *p16<sup>Ink4a</sup>* (Delmas et al., 2007) et *Cldn5* (Taddei et al., 2008). Cette observation peut s'expliquer par la présence d'autres facteurs de transcription ou de facteurs répresseurs dans le complexe TCF- $\beta$ -caténine. Dans différents types cellulaires,  $\beta$ -caténine forme un immunocomplexe avec des facteurs de transcription des familles FOXO, SOX, OCT, SMAD, HIF et ER $\alpha$  (Aktary et al., 2016). De plus, l'état acétylé ou méthylé de la lysine 49 de  $\beta$ -caténine régule son potentiel activateur ou inhibiteur. L'interaction de Ezh2 avec  $\beta$ -caténine, dans le noyau de cellules ES, induit la triméthylation de la lysine 49, associée à la répression des gènes *Sox1* et *Sox3*. L'acétylation de la lysine 49 de  $\beta$ -caténine par CBP rejoint la voie canonique et active l'expression du gène *t-bra* (Hoffmeyer et al., 2017).

Les nombreuses cibles transcriptionnelles de  $\beta$ -caténine sont associées à différentes fonctions cellulaires. Dans les mélanocytes, la protéine  $\beta$ -caténine induit l'expression de Cycline D1, Myc et Mitf et régule ainsi la prolifération cellulaire, alors qu'elle réprime l'expression de p16 et induit l'immortalisation des mélanocytes primaires en culture (Delmas et al., 2007). La protéine  $\beta$ -caténine induit l'expression des facteurs anti-migratoires Csk (Gallagher et al., 2013) et Nedd9 (Domingues et al., 2014) *in vitro* et réprime la migration des mélanocytes *in vitro* et des mélanoblastes *in vivo* (Gallagher et al., 2013). Dans les cellules de mélanome, *in vitro*,  $\beta$ -caténine induit l'expression de Brn2 (Goodall et al., 2004) qui est associée à un phénotype pro-invasif des cellules de mélanome, et favorise la formation de métastases chez un modèle murin NRAS<sup>Q61K</sup> *in vivo* (Gallagher et al., 2013).

Lors du développement,  $\beta$ -caténine participe à la mise en place des mélanocytes. Les facteurs WNTs et la protéine  $\beta$ -caténine sont nécessaires au développement normal des mélanoblastes. L'invalidation des gènes codant les ligands Wnt1 et Wnt3a chez la souris entraîne l'absence de plusieurs dérivés des CCN dont les mélanocytes (Ikeya et al., 1997). Plus tardivement, la surexpression de Wnt1 ou de  $\beta$ -caténine exogènes dans les cellules exprimant Dct augmente le nombre de mélanocytes, leur expansion et leur différenciation

(Dunn et al., 2000). Le rôle de  $\beta$ -caténine dans le développement des mélanoblastes est subtil puisqu'à la fois l'invalidation du gène *Ctnnb1*, codant la  $\beta$ -caténine, et l'expression d'une forme stabilisée de  $\beta$ -caténine, induisent une hypopigmentation (Luciani et al., 2011). Plus précisément, l'invalidation de  $\beta$ -caténine a été réalisée en supprimant les exons 2 à 6 du gène *Ctnnb1* ( $\Delta$ bcat) (Brault et al., 2001) dans les cellules exprimant tyrosinase. Les souris générées présentent une absence de pigmentation des poils et de la peau due au rôle de  $\beta$ -caténine dans la prolifération des mélanoblastes déterminés. L'expression d'une forme stabilisée de  $\beta$ -caténine a été réalisée en mutant les résidus de  $\beta$ -caténine phosphorylés par CK1 et GSK3 $\beta$  et responsables de sa dégradation (bcat\*)(Delmas et al., 2007). Les souris générées ont un pelage gris, associé à une faible pigmentation, et un nombre réduit de mélanocytes, dû à une prolifération réduite des mélanoblastes. Ces souris présentent également un pelage ventral blanc associé à un défaut de migration des mélanoblastes (Gallagher et al., 2013).  $\beta$ -caténine joue donc un rôle crucial dans l'établissement du lignage mélanocytaire, d'abord dans la formation des crêtes neurales, en lien avec la voie WNT, puis dans la prolifération et la migration des mélanoblastes déterminés, en lien avec son rôle dans la régulation du facteur de transcription MITF.

### 1.3. Développement pathologique des mélanocytes

Le niveau basal de pigmentation est variable entre les individus, et dépendant de la régulation fine des facteurs impliqués dans le développement et la différenciation des mélanocytes. Une anomalie de pigmentation pathologique se caractérise par une hypopigmentation ou une hyperpigmentation, éventuellement associée à des symptômes non-pigmentaires, et généralement causée par des altérations génétiques ou épigénétiques des gènes évoqués dans la partie 1.2. Ces pathologies peuvent être dues à un défaut dans le développement embryonnaire des mélanocytes, dans leur fonction, dans leur maintien ou à leur transformation tumorale chez l'adulte.

#### 1.3.1. Pathologies associées à un dysfonctionnement du lignage mélanocytaire

##### 1.3.1.1. Défaut de mise en place des mélanocytes

Les pathologies liées au développement embryonnaire des mélanocytes entraînent généralement une hypopigmentation de la peau et/ou des cheveux, pouvant s'accompagner

d'une surdité et de troubles cognitifs. Ces pathologies sont dues à des mutations dans les gènes clés de mise en place du lignage mélanocytaire.

Le syndrome de Waardenburg (WS) est caractérisé par des troubles de la pigmentation et de l'audition plus ou moins importants, accompagnés éventuellement d'anomalies du développement de la face et des membres. L'ensemble de ces symptômes est associé à des défauts dans la migration et la prolifération des mélanoblastes embryonnaires, et éventuellement d'autres cellules issues des crêtes neurales. Ce syndrome peut être dû à des mutations dans les gènes MITF et SNAI2 (WS II), responsables des phénotypes pigmentaires et auditifs, dans le gène PAX3 (WS I et WS III), affectant le développement des crêtes neurales et conduisant à des anomalies morphologiques, ou dans les gènes EDNB3, EDNRB, et SOX10 (WS IV), affectant le développement des cellules nerveuses du gros intestin.

Le piébalisme est caractérisé par l'hypopigmentation de certaines régions de la peau dès la naissance. Ce syndrome est dû à des mutations dans le gène codant le récepteur KIT et dans le gène codant son ligand SCF.

#### 1.3.1.2. Défaut de fonction des mélanocytes

Les pathologies de fonctionnement des mélanocytes sont caractérisées par une hypopigmentation de la peau et/ou des yeux, due à des défauts dans les mécanismes évoqués dans la partie 1.1.3.3, comme la mélanogénèse, le transport ou le transfert des mélanosomes, et sont regroupées sous le terme albinisme occulo-cutané (OCA). Les études génétiques, ayant conduit à la découverte des gènes associés à ces défauts de pigmentation, ont mis en évidence le rôle clef des enzymes impliquées dans la mélanogénèse et la biologie des mélanosomes avant même de connaître ces processus. Les quatre principaux types d'albinisme sont associés à des mutations dans les gènes TYR (OCA1), OCA2, codant une protéine membranaire qui serait impliquée dans le transport des enzymes de la mélanogénèse vers le mélanosome (Manga et al., 2001), TYRP1 (OCA3), et OCA4 (ou SLC45A2), codant une protéine membranaire impliquée dans le transport de tyrosinase vers le mélanosome (Bin et al., 2015). D'autres types d'albinisme moins fréquents ont été caractérisés génétiquement et sont associés à des mutations dans des gènes impliqués dans la maturation ou le transport des mélanosomes, et le trafic des lysosomes (Montoliu et al., 2014). Dans ce dernier cas, l'albinisme représente souvent un des symptômes caractéristiques de syndromes plus sévères, tels que le Syndrome Hermansky–Pudlak (HPS) ou le syndrome Chediak–Higashi (CHS). Le

terme albinisme, chez la souris, n'est utilisé que pour caractériser le phénotype associé à une mutation inactivatrice du gène *Tyr*.

#### 1.3.1.3. Défaut du maintien des mélanocytes: exemple du vitiligo

Le vitiligo est caractérisé par une dépigmentation chronique acquise de la peau due à la disparition des mélanocytes de l'épiderme. Cette pathologie est la plus fréquente des maladies qui induisent une dépigmentation partielle, voire totale, de la peau et des poils. Sa prévalence est située entre 0,5 et 1% de la population mondiale, soit environ 70 millions de personnes, sans différence en fonction du sexe, de l'âge ou de l'origine ethnique (Ezzedine et al., 2015).

L'apparition de macules blanches de tailles variables suggère l'apparition d'un vitiligo, qui peut être classé en deux catégories: le vitiligo segmentaire et le vitiligo non-segmentaire. Le vitiligo non-segmentaire est bilatéral avec une distribution symétrique sur l'ensemble du corps et une évolution variable dans le temps. Le vitiligo segmentaire, moins fréquent (5-16% des cas de vitiligo), est unilatéral, se développe par bandes de dépigmentation sans localisation particulière et se stabilise rapidement.

Les causes d'apparition et les mécanismes d'évolution des deux types de vitiligo sont encore peu compris. Il semble que le vitiligo ait une origine multifactorielle liée à des facteurs environnementaux, psychologiques, auto-immuns et génétiques. Quelques cas familiaux de vitiligo ont mis en évidence le rôle de gènes de la réponse immunitaire (90%) et associés à la fonction et la survie des mélanocytes (10%) dans la formation du vitiligo (Spritz, 2013).

(i) La théorie intégrative, ou convergente, suggère que la disparition des mélanocytes est due à des facteurs environnementaux (stress physique, chimique, biologique ou psychologique) liés à des prédispositions génétiques.

(ii) La théorie auto-immune suggère que les mélanocytes sont détruits par les cellules du système immunitaire. Le vitiligo est fréquemment développé par des patients atteints de maladies auto-immunes, et des anticorps dirigés contre les mélanocytes ont été observés chez 30% des patients atteints de vitiligo (Farrokhi et al., 2005).

(iii) La théorie toxique suggère que la balance oxydative des mélanocytes est dérégulée à cause des ROS produits lors de la synthèse de mélanine et ceux transmis par les kératinocytes (Pelle et al., 2005), induisant un environnement oxydatif délétère et une possible activation du système immunitaire.

(iv) La théorie de la mélanocytorrhagie propose qu'un défaut d'adhésion à la lame basale, associé à un stress, induit le détachement des mélanocytes et leur migration vers les couches externes de l'épiderme. En effet, la molécule d'adhésion E-cadhérine est peu ou pas exprimée dans les mélanocytes de la peau pigmentée de patients atteints de vitiligo (Wagner et al., 2015). L'absence de E-cadhérine, dans les mélanocytes interfolliculaires de peau de souris soumises à un stress mécanique ou oxydatif, induit le détachement des mélanocytes de la lame basale. Dans une autre étude, une réduction de la transcription induite par la voie WNT a été observée dans les régions dépigmentées des patients atteints de vitiligo (Regazzetti et al., 2015). Le traitement de peaux reconstituées *ex-vivo* avec des activateurs de la voie WNT ou des inhibiteurs de GSK3 $\beta$  induit l'expression de DCT et PAX3 dans des cellules qui pourraient être des pré-mélanocytes. La protéine  $\beta$ -caténine étant activée par la voie WNT et interagissant avec la protéine E-cadhérine, ces deux résultats sont cohérents et suggèrent que  $\beta$ -caténine pourrait également être impliquée dans le vitiligo.

### 1.3.2. Pathologies associées à une transformation des mélanocytes: exemple du mélanome cutané

#### 1.3.2.1. Description clinique du mélanome cutané

Le mélanome est issu de la transformation des mélanocytes en cellules cancéreuses et peut être localisé dans la peau, l'œil, et d'autres organes présentant une population de mélanocytes. Alors que le mélanome uvéal est le cancer de l'œil le plus fréquent (500 à 600 nouveaux cas en France chaque année), le mélanome cutané est le cancer cutané le moins fréquent (4%) derrière les carcinomes basocellulaires et les carcinomes spinocellulaires. Cependant le mélanome cutané reste le cancer cutané le plus agressif et son incidence continue d'augmenter, contrairement à la plupart des autres cancers, avec 132 000 nouveaux cas dans le monde chaque année d'après l'OMS, 14 325 nouveaux cas et près de 1 773 décès projetés en France en 2015 d'après l'INCa.

La détection d'un mélanome cutané par le clinicien se fait suivant la règle ABCDE (Asymétrie, Bords irréguliers, Couleur non homogène, Diamètre supérieur à 6mm, Evolution). Mais le diagnostic est réalisé par analyse anatomopathologique du mélanome entièrement excisé. Les mélanomes cutanés sont classés selon des critères cliniques et histologiques en mélanome superficiel extensif, lentigo malin et mélanome nodulaire (Duncan, 2009) et caractérisés selon leur stade de progression (Shain and Bastian, 2016) qui

sera important dans le traitement administré. Le stade auquel est diagnostiqué le mélanome est directement associé à la survie du patient; dans les années 2000, la survie à cinq ans des patients diagnostiqués pour un mélanome *in situ* avant l'apparition de métastases était proche de 100% alors que celle des patients diagnostiqués pour un mélanome de stade IV était d'environ 20%.

Grâce à l'étude à grande échelle du consortium The Cancer Genome Atlas (Cancer Genome Atlas, 2015), les données cliniques, génomiques, méthylomiques, transcriptomiques et protéomiques sur 333 mélanomes primaires (67) ou métastatiques (266) ont permis de proposer une nouvelle classification génomique en quatre groupes: BRAF, RAS, NF1 et triple sauvage (triple WT). Le groupe BRAF représente 50% des mélanomes analysés et se caractérise par des mutations activatrices de BRAF majoritairement au résidu V600 (E 75%, K 11% ou R 2%) et K601 (3%). Le groupe RAS représente 28% des mélanomes analysés et se caractérise par des mutations activatrices des protéines RAS, majoritairement sur le résidu Q61 de NRAS. Le groupe NF1 représente 8% des mélanomes analysés et se caractérise par des mutations, probablement perte-de-fonction, de NF1 et un taux de mutations élevé sur l'ensemble du génome. Le groupe triple WT représente 14% des mélanomes analysés et se caractérise par l'absence de mutation dans les trois gènes cités précédemment. Ce dernier groupe présente une faible signature UV sur l'ensemble du génome (30%) contrairement aux trois autres groupes dont les mutations sont majoritairement (plus de 90%) associées aux UV.

Le mélanome étant un cancer radorésistant, les premiers traitements utilisaient la chimiothérapie par Dacarbazine, avec une très faible efficacité, maintenant les chances de survie à 20% jusqu'aux années 2010. Le développement des thérapies ciblées, principalement chez les patients mutés BRAF (inhibiteur Vemurafenib), a donné les premiers résultats de régression totale de mélanomes de stades avancés mais avec l'apparition rapide de résistance au traitement (Wagle et al., 2011). Les récentes immunothérapies utilisant des anticorps bloquant CTLA4 ou PD-1 permettent de réactiver la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses et ainsi de bloquer la progression du mélanome. L'immunothérapie semble la plus prometteuse et a permis d'augmenter à plus de 50% les chances de survie à 1 an (Ugurel et al., 2016).

#### 1.3.2.2. Facteurs de risque

Le mélanome est une pathologie complexe avec des origines diverses impliquant des facteurs environnementaux et génétiques.






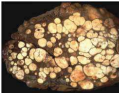


Parmi les facteurs de risque environnementaux, les rayonnements UV, naturels et artificiels, sont la première cause extérieure associée au développement de cancers de la peau dont les mélanomes. De nombreuses études épidémiologiques montrent que la durée et l'âge d'exposition aux UV sont corrélés avec l'apparition d'un mélanome: l'exposition intermittente plutôt que chronique, la forte exposition pendant l'enfance et l'exposition sous des lampes UV artificielles sont des facteurs de risque majeurs du mélanome (Gandini et al., 2011, Whiteman et al., 2001). Contrairement à ce qui était publié jusqu'aux années 2000, les UVA et les UVB favorisent la formation de mélanomes (Noonan et al., 2012). Le mélanome est également l'un des cancers avec le plus de mutations somatiques et dont la majorité ont une signature UV, autrement dit une transition C→T (Lawrence et al., 2013). Chez un mutant murin BRAF<sup>V600E</sup>, les UV accélère l'apparition de mélanomes, caractérisés par un nombre élevé de mutations, une signature UV et des mutations dans le gène codant p53 (Viros et al., 2014). La surconsommation d'alcool est également associée à un risque accru de mélanome (Kubo et al., 2014).

Parmi les facteurs de risque internes, le phototype I est associé à un risque plus élevé de développer un mélanome en partie en lien avec la faible protection contre les UV. Mais les personnes de phototype I, qui ont un ratio phéomélanine/eumélanine plus élevé que les autres, ont également plus de chances de développer un mélanome indépendamment des UV à cause du potentiel pro-oxydatif de la phéomélanine (Panzella et al., 2014). Le nombre élevé de nævi, la présence d'un syndrome de nævus dysplasique ou d'un nævus géant congénital sont associés à un risque accru de mélanomes (Grulich et al., 1996). Les antécédents familiaux de mélanomes et les mutations dans des gènes tels que CDK4, CDKN2A, MC1R, sont associés à des risques de mélanomes.

### 1.3.2.3. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la mélanomagenèse

Le mécanisme de carcinogenèse est décrit comme un processus multi-étapes: à partir d'une cellule sauvage, l'accumulation de modifications génétiques, épigénétiques ou allogénétiques modifient les propriétés propres à cette cellule et/ou à celles de son environnement lui conférant les capacités de croissance en absence de signaux de croissance, de prolifération illimitée, de résistance aux signaux antiprolifératifs, d'échappement à l'apoptose, de maintien de l'angiogenèse, d'invasion et de formation de métastases (Hanahan and Weinberg, 2000). Suivant ce même principe, le processus de mélanomagenèse est décrit de façon simplifiée selon le modèle de Clark (Clark et al., 1984) (Figure 10). Une première étape de prolifération

Peau normale	Naevus bénin	Naevus dysplasique	Phase de croissance horizontale	Phase de croissance verticale	Mélanome métastatique
<p>↑</p> <p>Epiderme</p> <p>↓</p> <p>Membrane basale</p> <p>↑</p> <p>Derme</p> <p>↓</p>					
					
Initiation			Progression		

Adapté de (Miller and Mihm, 2006, Shain and Bastian, 2016, Zbytek et al., 2008)

46

avec des pénétrances de 100% et 29% respectivement. L'activation de BRAF chez un modèle murin par expression d'une forme mutée BRAF<sup>V599E</sup> (correspondant à la mutation humaine BRAF<sup>V600E</sup>) induit une hyperpigmentation, la formation de nævi et la formation de mélanomes non pigmentés avec une pénétrance de 60-70% (Dhomen et al., 2009).

(ii-iii) Plusieurs protéines sont impliquées dans l'échappement à la sénescence observée dans l'étape d'initiation du mélanome, en particulier PTEN, p16 et  $\beta$ -caténine. L'activation de la voie PI3K/AKT (voir partie 2.3.2) est observée dans 49% des mélanomes primaires (Dai et al., 2005) soit par activation de RTK (récepteur tyrosine kinase) en amont de PI3K, soit par mutation inactivatrice de PTEN. L'inactivation de PTEN accélère et aggrave l'apparition des mélanomes sur des fonds NRAS muté (Conde-Perez et al., 2015) ou BRAF muté (Dankort et al., 2009), alors que l'inactivation de PTEN seule n'induit pas la formation de mélanomes. Le gène CDKN2A, codant p16 et p19, est muté dans 13% des mélanomes. L'inactivation de p16 accélère l'apparition des mélanomes sur des fonds NRAS (Ackermann et al., 2005) ou BRAF (Dhomen et al., 2009) mutés. La protéine  $\beta$ -caténine est activée dans environ 30% des mélanomes où elle est localisée dans le noyau des cellules (Rimm et al., 1999). L'activation de  $\beta$ -caténine sur un fond génétique NRAS muté accélère la formation de mélanomes et augmente la pénétrance des mélanomes avec 85% des doubles mutants développant des mélanomes (Delmas et al., 2007).  $\beta$ -caténine participe à l'échappement à la sénescence en réprimant la transcription de p16.

(iv) Plusieurs voies sont impliquées dans la migration des cellules de mélanomes pendant la phase de progression. L'un des facteurs clefs est la perte d'expression de la E-cadhérine qui induit une perte d'adhésion des cellules (Danen et al., 1996).

(v) L'activation de  $\beta$ -caténine sur un fond NRAS muté augmente le nombre et la taille des métastases, en particulier dans les poumons (Gallagher et al., 2013).



## 2. Le stress induit par les rayonnements ultra-violets

Le stress peut être défini, pour un individu adapté à son environnement, comme un changement de l'environnement affectant la valeur adaptative (*fitness*) de cet individu. Ces variations des facteurs environnementaux sont à l'origine de pressions sélectives sur les individus d'une population, conduisant à l'apparition et/ou l'expansion de caractères procurant aux individus une meilleure valeur adaptative. De plus, le stress, souvent source de mutations des molécules codant ces caractères, accélère l'apparition de nouveaux caractères. Le stress a donc deux rôles évolutifs complémentaires: l'apparition de nouveaux caractères et la pression de sélection qui conduira à leur maintien ou leur suppression. La capacité de réception et de réponse aux stress permet ainsi aux êtres vivants de s'adapter à leur environnement (Bijlsma and Loeschcke, 2005).

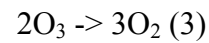
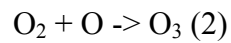
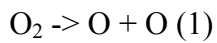
La peau, par sa position externe et son rôle d'interface, est soumise à de nombreux stress environnementaux. Ces stress peuvent être divisés en stress physiques (ex: rayonnement solaire, variations thermiques, pressions mécaniques), chimiques (ex: pesticides, métaux lourds), et biologiques (ex: virus, bactéries, champignons). Les mélanocytes en particulier jouent un rôle dans la réponse aux stress physiques, chimiques et biologiques, comme décrit précédemment (1.1.3.3.3). La synthèse de mélanine, fonction principale des mélanocytes, procure une barrière contre les rayonnements ultra-violets (UV).

### 2.1. Les rayonnements ultra-violets et la peau

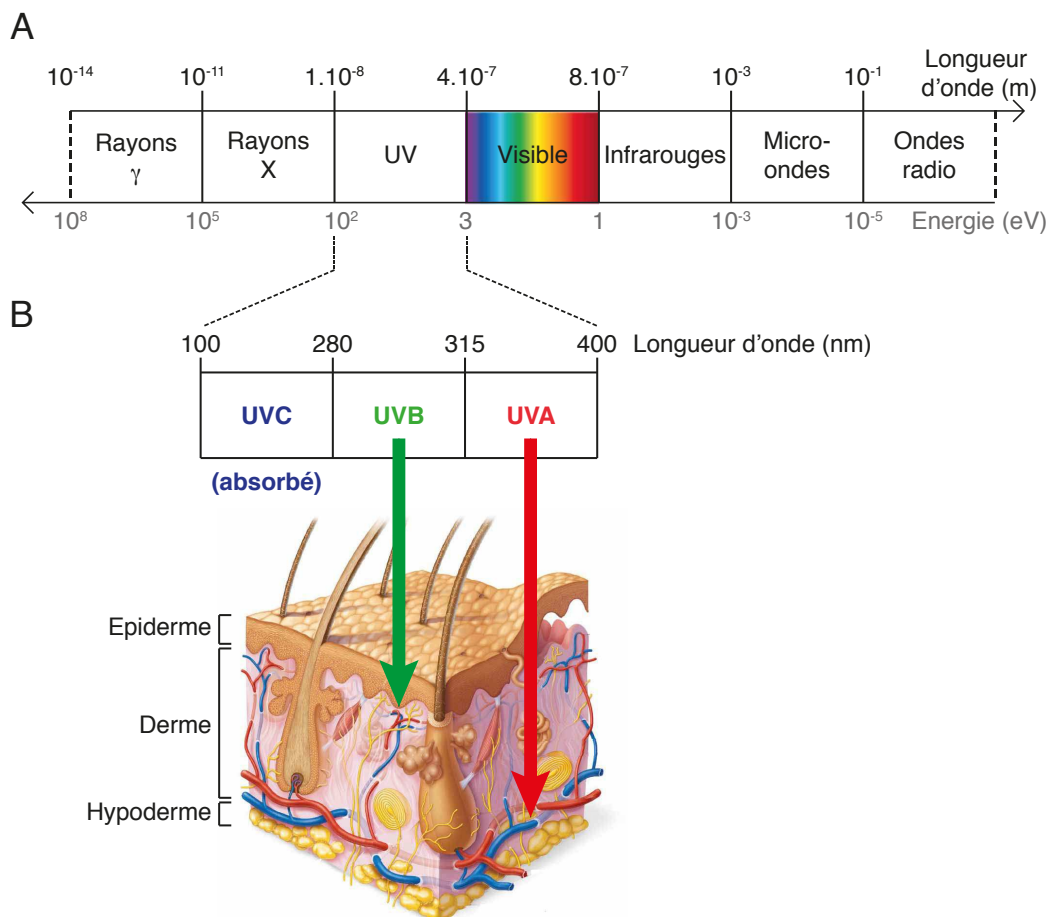
#### 2.1.1. Définition des UV

Le rayonnement solaire est la principale source de rayonnements UV naturels à la surface de la Terre. Le spectre solaire est l'ensemble des ondes électromagnétiques émises par le soleil. Elles sont arbitrairement divisées en catégories qui reflètent certaines de leurs caractéristiques relatives à l'Homme (Figure 11A): les rayons  $\gamma$ , les rayons X, les ultra-violets, la lumière visible, les infrarouges, les micro-ondes et les ondes radio. L'énergie portée par un rayonnement est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. Plus son énergie est grande, plus le rayonnement a un effet destructeur. La partie la plus énergétique ( $\lambda < 290\text{nm}$ ) du rayonnement solaire est normalement absorbée par l'atmosphère et n'atteint pas la surface de la Terre. La couche d'ozone joue en particulier un rôle important dans l'absorption des rayonnements UV entre 100 et 300 nm. Paradoxalement, la couche d'ozone existe grâce aux

rayonnements UV: les UV transfèrent leur énergie aux molécules de dioxygène  $O_2$ , libérant deux atomes d'oxygène  $O$  (1) qui réagissent avec le dioxygène pour former l'ozone  $O_3$  (2). L'ozone est instable puisque l'énergie des UV le scinde à nouveau en dioxygènes (3).



La couche d'ozone repose sur un équilibre entre le rayonnement UV, la quantité de dioxygène, la quantité d'ozone et la présence de radicaux libres ( $NO\bullet$ ,  $OH\bullet$ ,  $Cl\bullet$ ,  $Br\bullet$ ) capables de réagir avec l'oxygène. L'augmentation de la libération de  $Cl$  et  $Br$  par les activités humaines (ex: hydrocarbures halogénés tels que les chlorofluorocarbones, ou CFC, dans les aérosols) affecte cet équilibre et réduit la quantité d'ozone dans l'atmosphère. Cette réduction de la couche d'ozone permet le passage d'une partie des UV les plus énergétiques (100-300nm) à travers l'atmosphère.



**Figure 11. Spectre solaire, classification des UV et pénétration dans la peau**

(A) Le spectre solaire comporte, du plus énergétique au moins énergétique, les rayons  $\gamma$ , les rayons X, les ultra-violet, la lumière visible, les infrarouges, les micro-ondes et les ondes radio. L'énergie portée par les photons est inversement proportionnelle à leur longueur d'onde ( $E=hc/\lambda$ ,  $c$  vitesse de la lumière dans le vide,  $h$  constante de Planck). (B) Les UV, divisés en trois catégories A, B et C, pénètrent d'autant plus dans la peau que leur énergie est faible. Les UVC, étant absorbés dans l'atmosphère, uniquement les UVA et B sont présents à la surface de la Terre.

Lors du Deuxième Congrès International sur la Lumière (Coblentz, 1932), les UV ont été arbitrairement divisés en trois catégories définies par trois filtres : les UVC (100-280nm) définis par le filtre Pyrex, les UVB (280-315nm) définis par les filtres Barium-flint et Pyrex et les UVA (315-400nm) définis par les filtres Noviol-A et Barium-flint. Les UVC, de plus haute énergie, sont absorbés par l'atmosphère et n'atteignent pas la surface de la Terre. De nombreuses études utilisent des lampes UVC pour étudier les dommages de l'ADN puisque le pic d'absorption de l'ADN se trouve à 260 nm. Les UVC induisent donc directement un fort taux de dommages de l'ADN (Diffey, 2002). Les UVB, partiellement absorbés par l'atmosphère, représentent environ 5% des rayonnements UV à la surface de la Terre. Une partie de ces UVB est capable de pénétrer dans l'épiderme à une profondeur variable après absorption par la couche cornée. Les UVB ne sont pas transmis par le verre et le plastique. Les UVA représentent environ 95% des rayonnements UV à la surface de la Terre. Ils sont capables de pénétrer à travers l'épiderme et jusque dans le derme avec une absorption progressive (Figure 11B).

### 2.1.2. Conséquences pathologiques et physiologiques des UV

Par irradiation de la peau, les UV entraînent chez l'Homme des conséquences physiologiques telles que l'inflammation, la pigmentation et la synthèse de vitamine D, pathologiques telles que la formation de cancers cutanés, et thérapeutiques telles que la régression du vitiligo.

#### 2.1.2.1. Inflammation

L'exposition aux UV induit une réponse inflammatoire observable par l'apparition d'un érythème. Cette rougeur est due à la vasodilatation des vaisseaux sanguins induite par la sécrétion de multiples facteurs dont la prostaglandine, l'histamine et l'oxyde nitrique (Clydesdale et al., 2001). Les UV induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) et de facteurs de croissance par les cellules de la peau, puis l'activation du complément, l'activation des cellules immunitaires du derme et de l'épiderme et l'infiltration de cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages) du système lymphatique. Après l'irradiation, la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) réduit la réponse immunitaire et entraîne l'apparition de lymphocytes Treg spécifiques d'antigènes présents dans les cellules irradiées (Bennett et al., 2008). Une étude sur un modèle murin de mélanome cutané a montré que l'inflammation induite par l'irradiation d'un mélanome

primaire avec des UVB stimule l'angiotropisme et la migration des cellules tumorales vers les cellules endothéliales favorisant la formation de métastases (Bald et al., 2014).

#### 2.1.2.2. Pigmentation

Les UV induisent chez l'Homme une augmentation de la pigmentation en deux phases: la phase immédiate, avec un pic 1h après l'exposition, dure jusqu'à 24h, et la phase tardive, avec un pic 3 semaines après exposition, dure jusqu'à dix mois (Costin and Hearing, 2007). La pigmentation immédiate est due à la polymérisation de la mélanine par les enzymes mélanogéniques présentes avant l'irradiation (Natarajan et al., 2014), à l'augmentation du nombre de dendrites des mélanocytes et du transfert des mélanosomes (Singh et al., 2010). La pigmentation tardive est due à l'augmentation du nombre des mélanocytes, à l'augmentation du nombre et du transfert des mélanosomes, et à l'augmentation de la mélanogenèse (Costin and Hearing, 2007). A plus long terme, aucune variation significative de l'expression des enzymes mélanogéniques, des facteurs de croissance, des protéines d'adhésion et de contrôle du cycle n'est observée 1 à 4 ans après des irradiations répétées (Brenner et al., 2009). La réponse pigmentaire aux UV est liée au phototype et dépend du polymorphisme de MC1R (Lin and Fisher, 2007). En effet, MC1R, récepteur spécifique des mélanocytes impliqué dans la réponse aux UV, induit l'expression de MITF par une voie dépendante de l'AMPc qui sera décrite dans la partie 2.3.3. La pigmentation constitue alors une protection accrue contre les rayonnements UV, mettant en place un rétrocontrôle négatif de l'effet des UV.

Dans le spectre solaire, les UV ne sont pas les seules longueurs d'onde à induire une pigmentation. La lumière visible (400-700 nm) induit une pigmentation chez les personnes de type IV à VI, mais pas chez les personnes de type II (Mahmoud et al., 2010). Cette pigmentation persiste au cours des deux semaines de l'étude alors que la pigmentation induite par des UVA disparaît rapidement. Plus précisément, une autre étude a montré que la lumière bleue-violet (415 nm), mais pas la lumière rouge (630 nm), induit une pigmentation chez les personnes de type III et IV avec une persistance d'au moins trois mois (Duteil et al., 2014).

#### 2.1.2.3. Synthèse de vitamine D

Les UV participent à la synthèse de la vitamine D: dans la peau, le 7-déhydrocholesterol, dérivé du cholestérol, est photolysé en prévitamine D3 par action des UVB/C (270-300nm), naturellement par les UVB solaires, puis forme lentement un isomère de vitamine D3 inactive; dans le foie, la vitamine D3 est métabolisée en 25-hydroxy-vitamine D3



transformée, dans le rein, en 1 $\alpha$ ,25-hydroxy-vitamine D3 active (DeLuca, 2004). La vitamine D active est une hormone qui se fixe à un récepteur nucléaire (VDR) et participe à la régulation de la transcription. La vitamine D induit l'expression de la E-cadhérine et la translocation de  $\beta$ -caténine et  $\gamma$ -caténine vers la membrane cytoplasmique suivant un mécanisme réprimé par SNAIL1 dans des lignées cellulaires de cancer du colon (Larriba et al., 2007, Palmer et al., 2001). La vitamine D a un effet anti-prolifératif, pro-différenciation et pro-apoptotique *in vitro*, qui a conduit à tester son utilisation en tant qu'adjuvant dans les traitements anti-cancéreux. L'association entre le haut niveau de 1 $\alpha$ ,25-hydroxy-vitamine D3 et la diminution du risque de cancers a été observée dans le cancer colorectal mais ne l'est pas dans les cancers du sein et de la prostate. Par contre des polymorphismes du VDR pourraient modifier le risque de cancers de la peau (Gandini et al., 2011). L'inactivation du VDR chez un modèle murin est associée à une augmentation de l'expression de longs ARN non codants (lncARN) oncogéniques, à une diminution de l'expression de lncARN suppresseurs de tumeur (Jiang and Bikle, 2014) et à une augmentation de la sensibilité des souris à développer des tumeurs après exposition aux UVB (Ellison et al., 2008).

#### 2.1.2.4. Cancers cutanés

Les rayonnements solaires sont un facteur de risque de développement des cancers de la peau à cause des rayonnements UV qu'ils contiennent (El Ghissassi et al., 2009). Les cancers de la peau les plus fréquents proviennent d'une transformation maligne des kératinocytes formant des carcinomes basocellulaires et spinocellulaires. Des études ont associé l'utilisation des bancs d'UV artificiels à un risque accru de développer des carcinomes spinocellulaires, mais aucun risque significatif n'a été observé pour les carcinomes basocellulaires (International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet and skin, 2007). L'utilisation des bancs d'UV artificiels est également associée à un risque accru de développer des mélanomes cutanés (Boniol et al., 2012, Dore and Chignol, 2012, Gandini et al., 2011, International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet and skin, 2007); ce risque augmente lorsque l'âge de la première utilisation des bancs UV diminue.

#### 2.1.2.5. Régression du vitiligo par thérapies PUVA ou NB-UVB

Les UV sont utilisés dans un but thérapeutique dans le traitement du vitiligo, soit par thérapie PUVA (Psoralen-UVA), soit NB-UVB (Narrow-Band UVB) (Taieb et al., 2013). La thérapie

PUVA associe une chimiothérapie par un photo-sensibilisateur, le Psoralène, à une irradiation aux UVA (320-340nm). Elle augmente l'expression de la tyrosinase, la synthèse de la mélanine, la maturation des mélanosomes et leur transfert, et la prolifération des mélanocytes, avec une efficacité de repigmentation partielle de 70-80% et totale de 20%. La thérapie NB-UVB consiste uniquement en une irradiation avec des UVB à 311 nm. Elle est utilisée préférentiellement pour les vitiligo très étendus et présente une meilleure efficacité que la thérapie PUVA. Le mécanisme de repigmentation induit par les UVB est actuellement étudié afin d'améliorer l'efficacité du traitement. *In vitro*, une irradiation NB-UVB induit la prolifération et la migration des mélanocytes (Wu et al., 2004). *In vivo*, dans des peaux de souris ou des explants de peau humaine, une irradiation UVB ou une blessure induirait la migration des McSC du follicule pileux vers l'épiderme, par un mécanisme dépendant de MC1R (Chou et al., 2013).

## 2.2. Effets biochimiques des UV

Les dommages induits par les UV sur les cellules sont dus à certaines molécules ayant la capacité d'absorber la lumière, appelées chromophores, comme la mélanine, l'ADN, les cytochromes ou les porphyrines. Lorsque les UV atteignent ces molécules, l'énergie d'un photon est transmise à un électron qui va entrer dans un état excité de plus haute énergie. La molécule, dans un état instable, va perdre cette énergie par émission de chaleur, de lumière ou par transmission à une autre molécule, avec ou sans perte de l'électron excité. Ce dernier processus résulte en la modification des molécules, protéines, lipides ou ADN de la cellule et génère directement des dommages oxydatifs ainsi que des dommages de l'ADN.

### 2.2.1. Réactions oxydatives

Les UV induisent l'oxydation de l'ADN et de nombreux dommages oxydatifs avec la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) incluant  $O_2^\bullet$ ,  $H_2O_2$ , et  $^\bullet OH$ . L'oxydation de l'ADN sera développée dans la partie 2.2.2. La génération de ROS provient de deux mécanismes: l'oxydation précoce directement médiée par des photosensibilisateurs excités par les UV, ou l'oxydation tardive indirectement médiée par la réponse biologique cellulaire. L'oxydation tardive découle de l'augmentation d'expression et/ou de l'activation, par les UVA ou B, d'enzymes catalysant des réactions oxydatives au sein

des cellules, telles que les catalase, cyclo-oxygenase et NADPH oxydase (Cadet et al., 2015). Nous nous intéressons dans cette partie uniquement aux dommages oxydatifs précoces.

Les réactions oxydatives photosensibles nécessitent l'excitation de photosensibilisateurs tels que les cytochromes, les flavines, les hèmes, et les porphyrines. Dans un premier mécanisme, le photosensibilisateur entre dans un état excité et transfère l'énergie reçue des UV à une molécule cible adjacente, généralement en captant un électron de la cible, entraînant la formation de deux radicaux chargés. La cible peut alors être neutralisée par déprotonation ou par hydratation et réagir avec l'oxygène  $O_2$  ou  $O_2^\bullet$  pour former des radicaux peroxy ou hydroperoxyde. Le photosensibilisateur réagit généralement avec l'oxygène  $O_2$  pour retrouver son état initial, libérant un ROS ( $O_2^\bullet$ ). Dans un deuxième mécanisme, le photosensibilisateur excité transfère directement son énergie à l'oxygène  $O_2$ , libérant un oxygène singulet ( $^1O_2$ ) qui réagit spécifiquement avec des cibles possédant des doubles liaisons riches en électrons (Cadet et al., 2015). Suivant l'un ou l'autre des mécanismes, les cibles les plus fréquentes sont la guanine, le tryptophane et la tyrosine; leur oxydation est responsable des changements biologiques de la cellule dont la réponse oxydative tardive et la régulation de nombreuses voies de signalisation qui seront développées dans la partie 2.3.

La mélanine est également un photosensibilisateur excité par les UVB. Alors que la mélanine synthétique est capable de réagir avec les ROS (Sarna et al., 1986) et de les séquestrer (Tada et al., 2010), l'excitation de la mélanine de peau de souris *in vivo* par les UVB entraîne sa réaction avec l'oxygène d'après le deuxième mécanisme décrit précédemment, la formation de ROS, l'augmentation des dommages de l'ADN et de l'apoptose des cellules (Takeuchi et al., 2004).

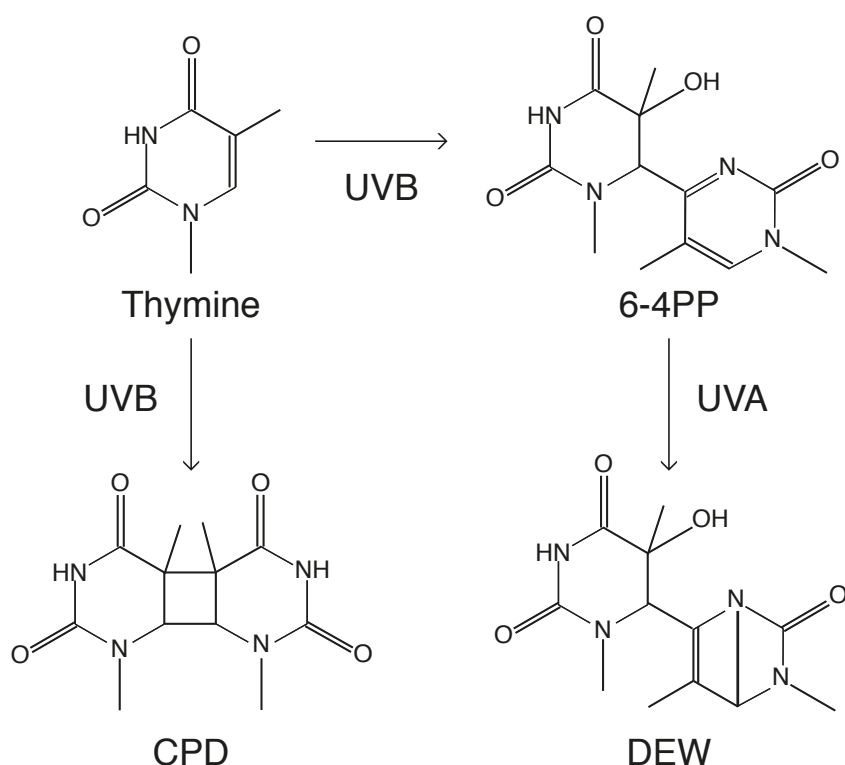
### 2.2.2. Dommages de l'ADN

Les dommages de l'ADN induits par les UV proviennent de plusieurs mécanismes; on peut distinguer les dommages directs résultant de l'absorption par l'ADN de l'énergie des UV (180 - 330 nm avec un pic à 260 nm) et les dommages indirects provenant de l'interaction de l'ADN avec des molécules excitées ou instables résultant des réactions induites par les UV (ex: ROS).

Les dommages directs, induits en quelques picosecondes par les UV, sont des dimères de pyrimidines: les dimères cyclobutyliques de pyrimidine (CPD), les pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduits (6-4PP) et les isomères de valence Dewar (DEW) (Figure 12). La

conversion des 6-4PP en DEW, plus lente, a un rendement maximal à 320 nm, ce qui explique qu'elle soit peu fréquente en condition d'irradiation UVB seuls et principalement observée lors d'irradiations par des simulateurs solaires ou par combinaison UVB et/puis UVA (Cadet et al., 2012, Douki et al., 2003, Douki and Sage, 2016, Perdiz et al., 2000). En absence de réparation de ces dommages, des mutations C→T apparaissent par mésappariement lors de la réplication. Ces mutations sont regroupées sous le terme "signature UV".

Les dommages indirects, dus aux ROS générés par les dommages oxydatifs, sont majoritairement les 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) et, très minoritaires dans le cas des UV, l'oxydation des bases autres que la guanine, les sites abasiques, l'uracile et la cassure simple brin (Douki et al., 1999, Hoeijmakers, 2001).



**Figure 12 Dommages directs de l'ADN induits par les UVB**

Les CPD résultent de la formation de deux liaisons entre les carbones C5 et C6 de deux bases pyrimidines, d'où quatre possibilités: TT, TC, CT et CC (du plus fréquent au moins fréquent). Les 6-4PP résultent de la formation d'une liaison entre le carbone C6 d'une pyrimidine et le groupe carbonyle C4 d'une autre pyrimidine, avec quatre dimères possibles: TC, TT, CT et CC (du plus fréquent au moins fréquent). Ces 6-4PP peuvent être convertis en d'autres photoproduits, dont l'isomère de valence Dewar à partir des 6-4PP.

Les UVA et UVB induisent les mêmes types de dommages (CPD, 6-4PP, DEW et 8-oxodGuo); seule la proportion de chacun de ces dommages varie puisque, l'ADN n'absorbant pas les UVA, la proportion de 8-oxodGuo induite par les UVA est plus importante que celle

induite par les UVB. La comparaison du rapport de chacun des dommages induits par les différents types d'UV a été mesurée grâce à des anticorps spécifiques de chacun des dommages ou à une purification HPLC et identification par spectrométrie de masse. Les UVA induisent environ 75% de CPD et 25% de 8-oxodGuo, les UVB induisent environ 85% de CPD, 10% de 6-4PP, 5% de DEW et moins de 1% de 8-oxodGuo alors qu'un simulateur solaire induit environ 80% de CPD, 10% de 6-4PP, 5% de DEW et moins de 5% de 8-oxodGuo (Douki et al., 1999, Perdiz et al., 2000). Contrairement à ce que l'on pensait jusqu'aux années 2000, les CPD sont les dommages majoritaires induits à la fois par les UVB et les UVA (Douki et al., 2003, Perdiz et al., 2000).

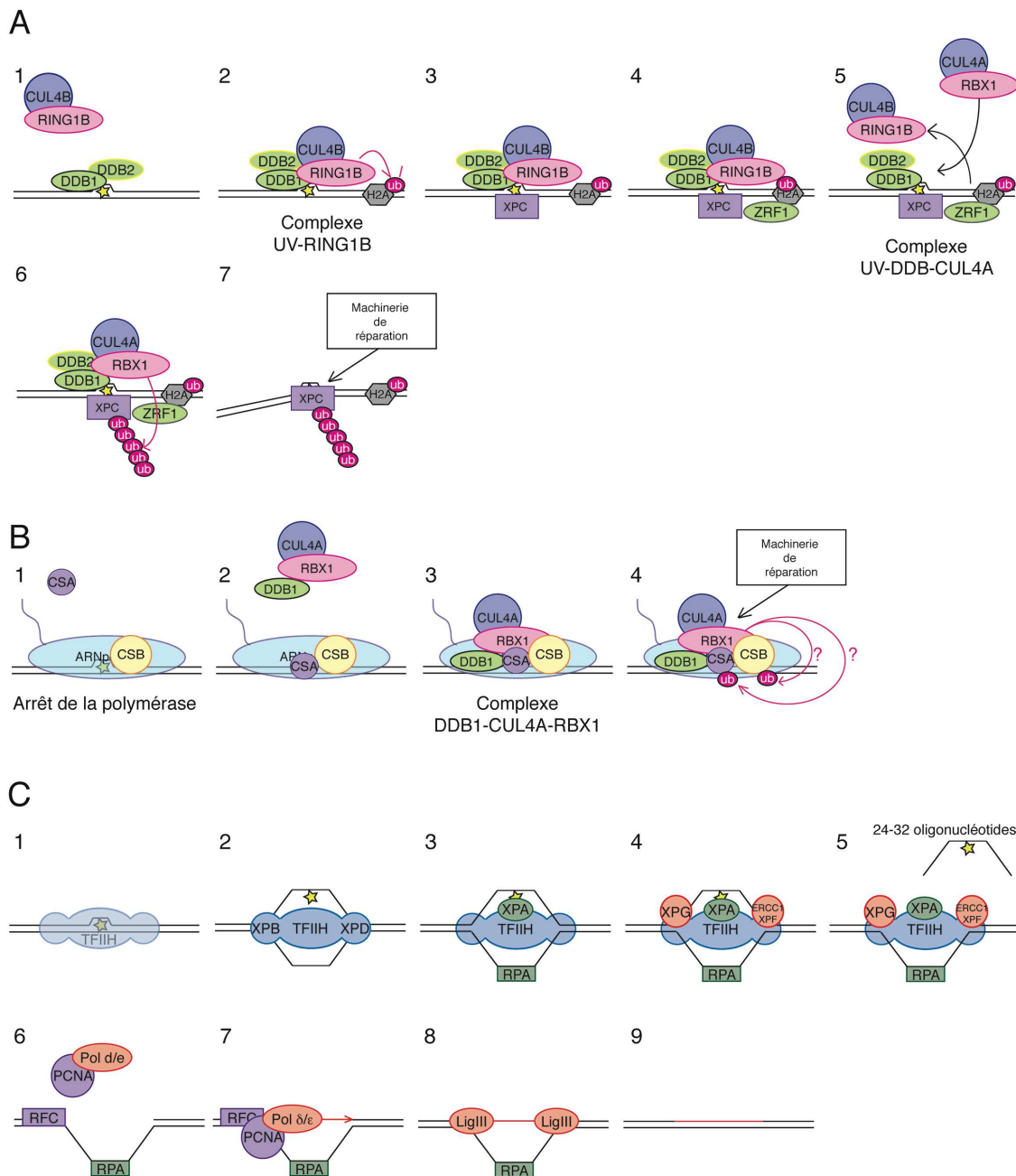
Les dimères de pyrimidines peuvent également être formés par un mécanisme indirect. Une étude récente a révélé la formation de CPD (dark CPD) après la fin de l'irradiation. Dans les mélanocytes pigmentés de souris irradiés par des UVA et B, le niveau de CPD continue d'augmenter pendant 3h après l'irradiation. Ce phénomène, absent dans les mélanocytes non pigmentés (albinos), est accru dans les peaux de souris exprimant fortement la phéomélanine (mutant MC1R). Les auteurs ont montré que les UVA induisent, via les ROS, la formation de peroxynitrites qui dégradent et excitent la mélanine. Les produits de dégradation de la mélanine excitée passent dans le noyau et transfèrent l'énergie à l'ADN entraînant la formation de CPD (Premi et al., 2015).

### 2.2.3. Mécanismes de réparation des dommages de l'ADN induits par les UVB

Plusieurs mécanismes de réparation des dommages de l'ADN sont conservés chez les eucaryotes. Les CPD, 6-4PP et DEW sont réparés par les mêmes mécanismes de Nucleotide Excision Repair (NER) alors que les 8-oxodGuo sont réparés par Base Excision Repair (BER). Le mécanisme de réparation impliqué dans la réparation des dommages aux UVB est donc le NER, et minoritairement le BER. Ces deux mécanismes sont basés sur une première étape de reconnaissance des dommages de l'ADN et une deuxième étape de réparation par excision-synthèse-liaison.

Pour réparer les 8-oxodGuo, le BER implique entre autres les protéines OGG1 et APE1 dans le clivage de la base endommagée et du squelette phosphodiester, l'ADN polymérase  $\beta$  dans le remplacement de la base excisée et le complexe XRCC1-ligase3 dans la liaison de la base ajoutée (Lindahl, 2016). La photoréactivation, mécanisme de réparation absent chez l'Homme mais important chez les plantes, est basée sur l'activation d'une

photolyase par la lumière bleue, qui entraîne le clivage et la réparation rapide et efficace des CPD et 6-4PP (Sancar, 2016).



**Figure 13. Réparation des dommages par NER**

(A,B) Reconnaissance des dommages par Global Genome NER (GG-NER) ou Transcription-Coupled NER (TC-NER). (A) *GG-NER*. (1) Le couple DDB1 (fixation) - DDB2 (reconnaissance) se fixe au niveau de la lésion et permet le recrutement de l'E3 ligase RING1B par la protéine chaperone CUL4B. (2) Ces quatre protéines forment un complexe stable à activité E3 ligase appelé UV-RING1B (DDB1-DDB2-CUL4B-RING1B) qui induit la mono-ubiquitination de l'histone H2A. (3) XPC est recruté au niveau de la lésion de façon dépendante (CPD) ou indépendante (6-4PP) des protéines DDB1 et DDB2 et (4) permet la fixation de ZRF1 sur l'histone H2A mono-ubiquitinée. (5) ZRF1 induit une modification de la conformation du complexe UV-RING1B et permet en particulier la formation d'un autre complexe à activité E3 ligase UV-DDB-CUL4A (DDB1-DDB2-CUL4A-RBX1) qui (6) catalyse

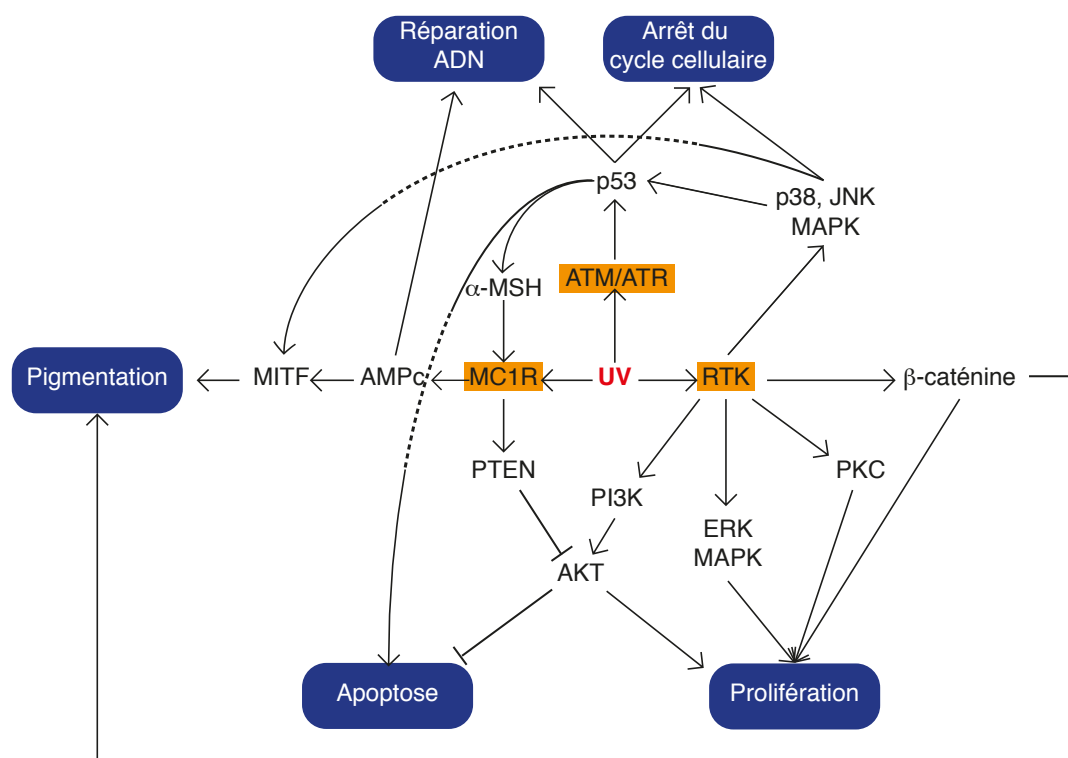
la poly-ubiquitination de XPC et sa stabilisation. (7) La fixation de XPC au site de lésion modifie la conformation de l'ADN autour de la lésion et permet le recrutement de la machinerie de réparation et la dissociation du complexe de reconnaissance. (B) *TC-NER*. (1) Après arrêt de l'ARN polymérase II, l'interaction de CSA avec l'ARN polymérase II est stabilisée et (2) la protéine CSA est recrutée. (3) DDB1 se fixe à CSA avec le complexe DDB1-CUL4A-RBX1. (4) Ce complexe catalyse l'ubiquitination de CSA ou CSB pour permettre le recrutement de la machinerie de réparation et la dissociation du complexe de reconnaissance. (C) *Clivage* - (1) L'étape de réparation du dommage commence par la fixation d'un complexe formé de plusieurs sous-unités appelé Facteur de Transcription IIH (TFIIH). En condition normale, ce complexe participe à l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II, mais en cas de dommages de l'ADN, il participe au NER et à la régulation du cycle cellulaire. (2) Parmi les sous-unités de TFIIH, les hélicases XPB et XPD catalysent l'ouverture de la double hélice d'ADN autour de la lésion. (3) XPA et RPA sont recrutées et forment un complexe de pré-incision. (4) Les endonucléases XPG et ERCC1-XPF sont recrutées et (5) clivent le brin d'ADN endommagé en 3' et 5' respectivement générant un fragment de 24 à 32 oligonucléotides. *Synthèse* - (6) La protéine RFC recrute le facteur PCNA couplé aux ADN polymérases  $\delta$  ou  $\epsilon$  au site d'ADN simple brin précédemment clivé. (7) L'ADN polymérase recrutée synthétise le brin d'ADN complémentaire manquant. *Liaison* - (8) Le brin néo-formé est lié à l'ADN pré-existant par une DNA ligase. Les ligases I et III sont impliquées dans la finalisation de la réparation des dommages de l'ADN, mais la ligase III semble plus active et agit avec la protéine XRCC1. Inspiré de (Gracheva et al., 2016, Papadopoulou and Richly, 2016, Rastogi et al., 2010).

Comme tous les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN, le Nucleotide Excision Repair (NER) est composé d'une étape de reconnaissance des dommages, dont les mécanismes sont de mieux en mieux compris, et d'une étape de réparation, qui a été étudiée dans de nombreux modèles eucaryotes et dont les mécanismes sont globalement bien connus (Gracheva et al., 2016, Papadopoulou and Richly, 2016, Rastogi et al., 2010). La reconnaissance de la lésion par fixation d'un complexe de reconnaissance spécifique suit deux mécanismes distincts: le Global Genome NER (90%), qui peut se produire à n'importe quelle phase du cycle cellulaire, et le Transcription-Coupled NER (10%), qui se produit uniquement aux sites actifs de transcription et dépend de l'arrêt de l'ARN polymérase II aux sites de lésion de l'ADN (Figure 13). Les 6-4PP et les DEW, qui induisent une distorsion plus forte de la double hélice d'ADN, sont reconnus et réparés plus rapidement et plus efficacement que les CPD qui peuvent persister 24h après irradiation (Courdavault et al., 2005, Douki and Sage, 2016, Perdiz et al., 2000).

Des mutations récessives dans les gènes humains impliqués dans la réparation sont associées au syndrome *Xeroderma Pigmentosum* (XP) pour les mutations dans les gènes XPB et avec le syndrome Cockayne (CS) pour les mutations dans les gènes CSA et CSB. Ces syndromes sont caractérisés par une hypersensibilité au soleil et un retard mental; mais le premier syndrome est associé à une forte prédisposition aux cancers, en particulier cutanés, liée à l'accumulation de mutations dérivant de dommages non réparés; alors que le deuxième syndrome est associé à un vieillissement précoce. Dans les follicules pileux humains, une

diminution du niveau d'ARN des protéines de la machinerie de réparation du NER (protéines ERCC) est associée à des follicules non pigmentés par rapport aux follicules pigmentés. La réduction du niveau de ERCC3 par siARN, dans des mélanocytes humains en culture, réduit le niveau d'ARN et l'activité de Tyrosinase suggérant un lien entre la réparation des dommages de l'ADN et la pigmentation (Yu et al., 2012). Chez la souris, les protéines XPE (DDB1 et DDB2) étant inactives, les CPD sont peu réparés par NER. Cependant, des mutants pour tous les gènes impliqués dans le NER ont permis de modéliser les syndromes XP et CS avec un retard développemental, la formation de tumeurs et/ou une atteinte neurologique (Niedernhofer, 2008). Seul le mutant de XPD présente un phénotype pigmentaire avec un blanchiment précoce du pelage associé à un vieillissement précoce de l'ensemble de l'organisme (de Boer et al., 2002).

### 2.3. Effets biologiques des UV dans les mélanocytes



**Figure 14. Voies de signalisation et processus cellulaires régulés par les UV.**

Adapté de (Cao et al., 2013, Jhappan et al., 2003, Lopez-Camarillo et al., 2012, Yamada et al., 2013)

Les UV induisent différents processus cellulaires qui découlent de la régulation de multiples voies de signalisation, certaines communes à tous les types cellulaires, d'autres spécifiques des mélanocytes. Trois types de voies peuvent être distinguées: (i) les dommages de l'ADN activent directement des voies de réponse aux stress qui régulent l'arrêt du cycle cellulaire, la



réparation des dommages et l'apoptose; (ii) l'énergie des UV favorise la dimérisation et l'activation de récepteurs membranaires tyrosine kinase (RTK) qui régulent la signalisation de réponse aux stress, l'activité de facteurs de transcription et le profil d'expression de la cellule, affectant des processus cellulaires variés tels que la prolifération, l'apoptose et la différenciation; (iii) spécifiquement dans les mélanocytes, les UV activent les voies de pigmentation qui peuvent également influencer les autres processus cellulaires (Figure 14).

### 2.3.1. Réponse aux dommages de l'ADN

La présence de dommages dans l'ADN de la cellule mère présente un risque d'apparition de mutations lors de la réplication de l'ADN, et de transmission de ces mutations aux cellules filles lors de la division. En effet, lorsque l'ADN polymérase rencontre un dommage, la fourche de réplication s'arrête, entraînant différents mécanismes: (i) l'arrêt du cycle cellulaire, pendant la réplication ou à d'autres points de contrôle du cycle, active les voies de réparation pour laisser le temps de réparer le dommage; (ii) des ADN polymérase ( $\eta$ ,  $\kappa$ ) (Goodman and Woodgate, 2013), capables de synthèse translésionnelle, permettant la poursuite de la réplication, avec la possibilité d'apparition de mutations; (iii) l'apoptose, induite directement après l'irradiation ou après un arrêt du cycle, est un mécanisme plus radical qui permet d'éliminer la cellule pour ne pas transmettre de mutations. Ces trois mécanismes peuvent se produire indépendamment ou successivement, le deuxième favorise la survie de la cellule et permet l'apparition de mutations, qui peuvent être à l'origine de l'apparition de nouveaux caractères, mais également de cancer, alors que les premier et troisième favorisent l'intégrité de la cellule et protègent des mutations. La régulation des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et d'apoptose par les UV sont présentés par la suite.

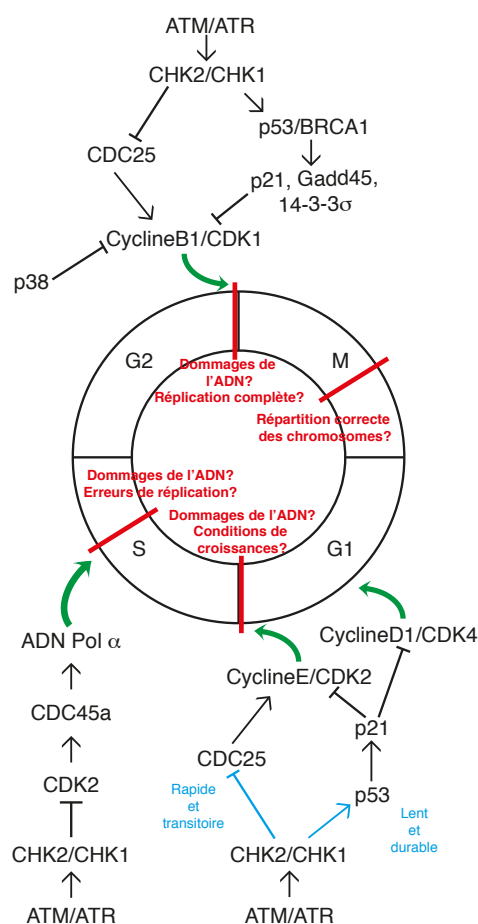
#### 2.3.1.1. Contrôles du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire permet à une cellule de se diviser pour former deux cellules. Il se compose de quatre phases: G1 de croissance, S de réplication de l'ADN, G2 de préparation à la division et M de division. De nombreux mécanismes de contrôle du cycle ont été sélectionnés, induisant un arrêt du cycle cellulaire pendant lequel les dommages sont réparés. A chaque phase, la présence de dommages de l'ADN est susceptible d'entraîner un arrêt du cycle cellulaire grâce à l'activation de deux protéines clefs: ATM et ATR (Kastan and Bartek,

2004). Dans les cas extrêmes, un arrêt prolongé en G0 permet la sortie du cycle et l'entrée de la cellule en sénescence.

L'activation d'ATM (ataxia telangiectasia mutated) est induite principalement par les cassures double brin. La fixation du complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) sur la cassure double brin modifie la conformation de l'homodimère inactif d'ATM et active les monomères d'ATM par phosphorylation. ATM phosphoryle et active la kinase CHK2 (Checkpoint Kinase 2) (Kastan and Bartek, 2004).

L'arrêt du cycle est induit par ATR (AMT- and Rad3-related) dans le cas de dommages simple brin et de blocages de la fourche de réplication. La protéine ATR, constitutivement active, est associée à la protéine ATRIP (ATR-interacting protein) qui permet son recrutement au niveau d'un dommage simple brin par l'interaction de ATRIP avec la protéine RPA qui stabilise le simple brin d'ADN lors du NER. Le complexe formé au niveau du dommage (dont Claspin, BRCA1, 53BP1, MDC1) recrute également la kinase CHK1 (Checkpoint Kinase 1) qui est alors phosphorylée par ATR (Smits and Gillespie, 2015).



**Figure 15. Points de contrôle du cycle cellulaire**

L'activation de ATM/ATR et CHK2/CHK1 est impliquée dans le passage des points de contrôles des différentes phases du cycle. En G1, CHK2/CHK1 inhibent rapidement l'activité de CDC25, bloquant le complexe CyclineE/CDK2. A plus long terme, CHK2/CHK1 activent p53 qui régule l'expression de facteurs inhibiteurs du cycle dont p21 qui inhibe CDK2 et CDK4. En S, CHK2/CHK1 inhibent CDK2, activateur de CDC45a et bloque ainsi la réplication par l'ADN polymérase  $\alpha$ . En G2, comme en G1, l'activation de CHK2/CHK1 réprime l'activité du complexe CyclinB1/CDK1 par deux voies impliquant CDC25 et p53. Après différents stress, p38, activée par phosphorylation, phosphoryle et réprime l'activité de cyclines. Inspiré de (Kastan and Bartek, 2004) (Smits and Gillespie, 2015).

L'activation de ATM et ATR grâce à la reconnaissance des dommages de l'ADN induits par les UV, entraîne l'activation de CHK2 et CHK1, et constitue la première étape de transduction du signal d'arrêt du cycle. L'inhibition de l'activité ou de l'expression des couples cyclines/CDK par ATM, ATR, CHK2 et CHK1 entraîne l'arrêt du cycle (Figure 15).

#### 2.3.1.2. Régulation de la réparation des dommages

L'activation d'ATM et ATR, suite à la reconnaissance des dommages, active de façon indirecte et directe la réparation des dommages. Indirectement, en induisant l'arrêt du cycle, ATM et ATR laisse le temps à la machinerie de réparation de traiter le dommage. L'activation d'ATM, ATR, CHK2, CHK1, p53 et CDK, entre autres, régule directement l'activité ou le niveau d'expression des protéines impliquées dans la machinerie de réparation (Branzei and Foiani, 2008). Par exemple, la mono- ou poly-ubiquitination de PCNA régule son recrutement dans l'un ou l'autre des complexes de réparation entre NER, recombinaison homologue ou translésion. ATR phosphoryle un complexe hélicase Cdc45-MCM-GINS qui permet l'ouverture de la chromatine et le recrutement de la machinerie de réparation (Sirbu and Cortez, 2013). Plus généralement, ATR, par activation et recrutement de différentes protéines, permet la stabilisation de la fourche de réplication lors de l'arrêt de la polymérase sur un dommage (Branzei and Foiani, 2008).

Dans des cellules de mélanome humain en culture, l'activation de MC1R par  $\alpha$ -MSH ou par un activateur pharmacologique, augmente le niveau d'ARN de récepteurs nucléaires NR4A (Smith et al., 2008). Après irradiation UVA et B de cellules de mélanomes humains, NR4A1 et NR4A2 co-localisent avec les protéines de la machinerie de réparation du NER, dont DDB2 et XPC, et réduisent le niveau des CPD (Jagirdar et al., 2013). La voie MC1R-NR4A-NER pourrait donc être une voie de réparation spécifiquement activée par les UV dans le lignage mélanocytaire. Une autre étude a montré que l'activation de MC1R pouvait également induire le NER via l'activation de ATR par AMPc-PKA (Jarrett et al., 2015).

#### 2.3.1.3. Apoptose

L'apoptose, mort cellulaire programmée, est un deuxième mécanisme qui permet d'éviter l'accumulation de mutations dans les cellules filles. L'apoptose est déclenchée en particulier par une forte exposition aux UV, ou plus généralement, lorsque le nombre de dommages à réparer dépasse un seuil. Trois types d'intermédiaires induisent l'apoptose en réponse aux UV: les ROS, les récepteurs de mort et les dommages de l'ADN.

L'induction immédiate de l'apoptose par les UV (moins de 30 min) fait intervenir les ROS, qui oxydent des phospholipides membranaires, modifiant le potentiel des membranes, en particulier mitochondriales, et résultant en la libération de cytochrome C par les mitochondries (Atlante et al., 2000). L'apoptosome, dont fait partie le cytochrome C, active alors la caspase 9 qui entraîne les clivages successifs des caspases 3, 6 et 7, activant le processus apoptotique (Lee et al., 2013).

L'induction intermédiaire de l'apoptose par les UV (30 min à 4h) fait intervenir les récepteurs de mort (*death receptors*) de la famille des TNF (Tumor Necrosis Factor) tels que TNF-R1, CD95 et Fas. Après irradiation, ces récepteurs sont activés par trimérisation soit indépendamment de leur ligand par fluidité de la membrane, soit par l'action de facteurs autocrines (Van Laethem et al., 2009). Ces récepteurs activent des voies induisant la libération du cytochrome C et la réponse apoptotique.

L'induction tardive de l'apoptose par les UV (après 4h) fait intervenir les dommages de l'ADN et l'activation d'ATM/CHK2 et ATR/CHK1, comme décrit dans la partie 2.3.1.1, en amont de l'activation de p53 ou de son homologue p73. Les facteurs de transcription p53 ou p73 induisent la transcription de facteurs pro-apoptotiques (BAX, PUMA, CD95), mais également, interagissent avec des facteurs anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>) et répriment leurs activités (Yoon et al., 2015).

Alors que l'apoptose immédiate est associée aux UVA, les UVB induisent l'apoptose principalement par les réponses intermédiaires et tardives. Ces mécanismes ont été étudiés dans différents types cellulaires; bien que les facteurs impliqués dans ces processus (récepteurs de mort, ATM/ATR, cytochrome C) soient présents dans toutes les cellules de la peau, ils ont été moins décrits dans les mélanocytes (Lee et al., 2013) que dans les fibroblastes et les kératinocytes (Van Laethem et al., 2009). Après irradiation UVA ou B de mélanocytes primaires en culture, la libération de cathepsines du lysosome induit l'apoptose via l'activation des protéines BAX et BCL-2 (Bivik et al., 2006). Les facteurs de transcription NFκB et Jun sont impliqués dans la régulation du processus apoptotique dans les mélanocytes primaires irradiés par des UVA ou B (Waster et al., 2014).

La régulation par MITF du facteur anti-apoptotique BCL-2, fortement exprimé dans les mélanocytes, serait à l'origine de la résistance des mélanocytes à l'apoptose (Jhappan et al., 2003). Ainsi l'inactivation homozygote de *Bcl-2* (exon 2) chez la souris induit une dépigmentation progressive à partir du 2<sup>e</sup> cycle pileux et l'absence de mélanocytes différenciés dans le bulbe (Kamada et al., 1995, Yamamura et al., 1996). L'expression

homozygote de l'allèle muté *Mitf*<sup>nit</sup> chez la souris induit un phénotype proche du mutant de *Bcl-2* (Steingrímsson et al., 1994). Chez le double mutant hétérozygote (*Bcl-2*<sup>+/-</sup> ; *Mitf*<sup>nit/+</sup>), une dépigmentation progressive associée à une disparition du lignage mélanocytaire est observée, soutenant le rôle régulateur de Mitf sur Bcl-2 (McGill et al., 2002). Dans ces quatre études, les mécanismes cellulaires n'ont pas été élucidés et pourraient faire intervenir l'apoptose des mélanocytes ou des McSC mais également la prolifération des mélanoblastes pendant le développement embryonnaire.

### 2.3.2. Signalisation de réponse aux stress

Les dommages des molécules autres que l'ADN modifient la signalisation cellulaire ajoutant une complexité supplémentaire à la régulation des mécanismes cellulaires. Les voies présentées dans cette partie font intervenir des protéines exprimées dans de nombreux types cellulaires et sont donc des mécanismes généraux de réponse aux stress, bien qu'indépendants des dommages de l'ADN.

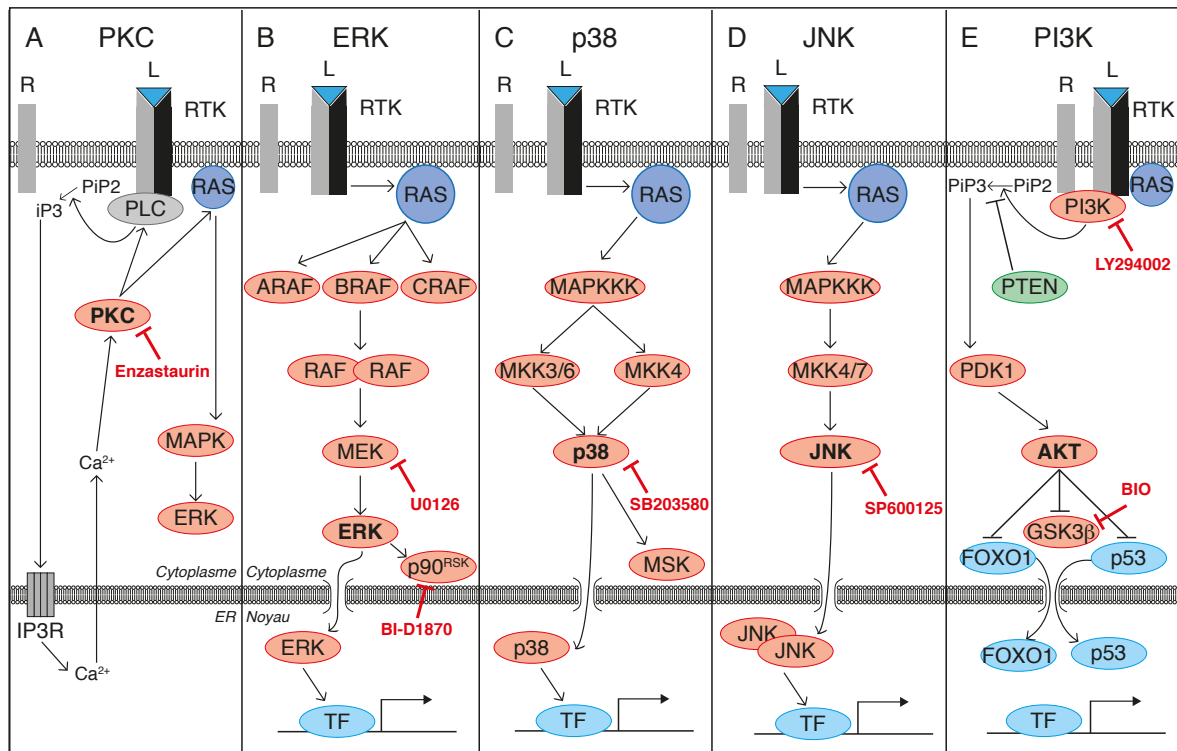
*RTK.* L'implication de récepteurs autres que l'ADN dans la réponse aux UV a été progressivement mise en évidence, d'abord par observation de cette réponse dans des cellules énucléées, puis par analyse du rôle des facteurs de croissance et de leurs récepteurs dans cette réponse (Krutmann et al., 2012, Sachsenmaier et al., 1994). Sachsenmaier et al. ont montré pour la première fois, dans des cellules humaines de carcinome cervical HeLa et épithélial A431, que les UVC induisent la phosphorylation d'une tyrosine de EGFR (Sachsenmaier et al., 1994). Différents mécanismes peuvent expliquer l'activation de récepteurs membranaires par les rayonnements UV. Les UV induisent l'oxydation des phospholipides affectant la fluidité membranaire, qui favorise l'activation par dimérisation de récepteurs tels que les récepteurs tyrosine-kinase (RTK) dont font partie les récepteurs des facteurs de croissance (GFR). A plus long terme, les UVB induisant une réponse inflammatoire, les cytokines sécrétées peuvent activer leurs récepteurs de façon autocrine ou paracrine (Van Laethem et al., 2009). Dans les cellules HeLa, les UVB activent les voies JNK et ERK grâce à l'activation des récepteurs à cytokines TNF-R et Il-1-R (Rosette and Karin, 1996).

*AhR.* L'excitation de chromophores, tels que l'acide aminé tryptophane, libère des photoproduits qui activent le récepteur nucléaire de l'arylhydrocarbène (AhR). Dans les kératinocytes immortalisés HaCaT, l'activation d'AHR par les UVB, et non par les UVA,

entraîne (i) sa translocation dans le noyau où il régule la transcription de ses cibles, (ii) l'activation d'EGFR par c-src conduisant à l'activation de ERK. *In vivo*, l'invalidation du gène *Ahr* abolit l'activation de la transcription des cibles de AhR, Cyp1a1 et Cox2, par les UVB, d'où le rôle d'AhR dans la réponse aux UVB (Fritsche et al., 2007).

Dans des mélanocytes primaires en culture, l'activation de AhR par les UVB induit la transcription des gènes de la mélanogenèse. Les UVB augmentent la pigmentation de la queue et des oreilles des souris sauvages avec une augmentation du nombre de mélanocytes différenciés alors que chez le mutant de AhR la pigmentation n'augmente pas et le nombre de mélanocytes différenciés est inférieur au contrôle. AhR est donc impliqué dans la réponse des mélanocytes aux UVB *in vivo* (Jux et al., 2011).

*PKC*. Les isoformes de la famille des kinases PKC répondent à différents signaux, comme les phorbol esters (ex: TPA), et le stress, comme les UV. Les protéines PKC sont activées par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 16A). Dans la lignée de kératinocytes JB6, les UVB induisent la relocalisation de PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$  et PKC $\zeta$  du cytoplasme vers la membrane (Chen et al., 1999, Huang et al., 2000). En réponse aux UVB, PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$  et PKC $\zeta$  activent ERK, et PKC $\zeta$  active AP-1. Dans des mélanocytes primaires en culture, les UVA activent la rhodopsine couplée à une protéine G qui active la PLC (phospholipase C) induisant un flux calcique grâce aux récepteurs TRPA1, et résulte en une augmentation de la quantité de mélanine (Bellono et al., 2013). L'activation de PKC n'est pas analysée dans cette étude, mais l'activation de PLC et l'entrée de calcium suggèrent que PKC pourrait être activée par le flux calcique et participerait ainsi à l'activation de la mélanogenèse par activation des voies MAPK (Videira et al., 2013).



**Figure 16. Voies de signalisation PKC, MAPK et PI3K**

Représentation simplifiée des voies de signalisation activant PKC, ERK, p38, JNK et PI3K et indications d'inhibiteurs pharmacologiques agissant sur ces voies. (A) L'activation de PKC par EGFR ou par des GPCR entraîne la formation d'iP3 et DAG. DAG peut activer PKC alors que iP3 induit un flux calcique qui active PKC. La kinase PKC régule alors de nombreuses voies dont ERK et des protéines dont AKT et GSK3 $\beta$ . L'enzastaurin (LY317615) est un inhibiteur de PKC. (B) L'activation de la protéine GTPase RAS par des RTK tels que EGFR ou des intégrines entraîne la phosphorylation des MAPKK kinases (MAPKKK) ARAF, BRAF ou CRAF. Ces MAPKK s'activent par hétérodimérisation et phosphorylent la MAPKK MEK qui phosphoryle et active la MAPK ERK. ERK phosphoryle alors de nombreuses protéines dont p90<sup>RSK</sup> dans le cytoplasme et des facteurs de transcriptions tels que AP-1, c-FOS ou PAX6 dans le noyau. U0126 est un inhibiteur de MEK, BI-D1870 est un inhibiteur de p90<sup>RSK</sup>. (C) Les RTK, les récepteurs de TGF $\beta$ , des GPCR ou un stress direct tel que les UV activent des MAPKKK telles que MEKK1/4 ou MLK2/3. Ces MAPKKK activent les MAPKK MKK3/6 et MKK4 qui phosphorylent et activent la MAPK p38. P38 phosphoryle alors de nombreuses protéines dont MSK et des facteurs de transcription tels que USF1 et p53. SB203580 est un inhibiteur de p38. (D) Les RTK, des GPCR ou un stress direct tel que les UV, activent RAS puis RAC. RAC active des MAPKKK telles que MEKK1/4 ou MLK2/3. Cette activation peut aussi être induite par des récepteurs de mort tels que FAS. Ces MAPKKK activent les MAPKK MKK4/7 qui phosphorylent et activent JNK1/2/3. Les kinases JNK forment un hétérodimère qui régule l'activité de facteurs de transcription en particulier de la famille AP-1 (JUN, NFAT). SP600125 est un inhibiteur de JNK. (E). Les RTK, des récepteurs de cytokines, des intégrines et des GPCR activent PI3K par phosphorylation. PI3K convertit PIP2 en PIP3. La phosphatase PTEN catalyse la réaction inverse convertissant PIP3 en PIP2. PIP3 active la kinase PDK1 qui phosphoryle et active AKT. AKT phosphoryle de nombreuses protéines avec un effet activateur ou répresseur. En particulier AKT inhibe l'activité de GSK3 $\beta$  et FOXO1, mais active MDM2 et IKK, réprimant p53 et activant NF $\kappa$ B respectivement. LY294002 est un inhibiteur de PI3K. BIO est un inhibiteur de GSK3 $\beta$ . Si la représentation très schématique, linéaire et non exhaustive des différentes voies permet de simplifier leur compréhension, les interactions entre ces voies et avec d'autres voies non représentées ont été mises en évidence mais ne sont pas représentées dans un souci de clarté.

*MAPK*. L'activation des récepteurs des facteurs de croissance par les UV active les voies des MAP kinases ERK, JNK/SAPK et p38 (Coso et al., 1995, Englaro et al., 1998, Natarajan et al., 2014). Les MAPK sont activées par phosphorylation des Tyrosines et Thréonines par des MAPK kinases activées elles mêmes par une cascade de phosphorylation en amont (Figure 16B-D). En fonction du type d'UV reçu, ces kinases phosphorylent et régulent l'activité de différentes protéines et facteurs de transcription dans le cytoplasme ou le noyau (Bode and Dong, 2003, Lopez-Camarillo et al., 2012, Zhong et al., 2011).

Les UVB activent p38 via l'activation de EGFR, mais ERK et JNK via l'activation de PKC dans la lignée de kératinocytes JB6 (Huang et al., 2000). Par cette voie, la kinase ERK active le facteur de transcription AP-1 par hétérodimérisation de JUN et FOS (Englaro et al., 1998). Les kinases ERK ou p38, et JNK phosphorylent respectivement les Sérines 15 et 20 de p53 induisant l'arrêt du cycle et/ou l'apoptose (She et al., 2002a). Par l'action indirecte des ROS, les UVA et les UVB activent également les facteurs de transcription NFκB, NFAT et AP-1 (Bickers and Athar, 2006, Bode and Dong, 2003, Lopez-Camarillo et al., 2012).

JNK1 ainsi que les kinases p90<sup>RSK2</sup> (90-kD ribosomal S6 kinase 2) et MSK1 (mitogen and stress activated kinase), respectivement phosphorylées et activées par ERK et p38, phosphorylent la Sérine 112 de BAD inhibant l'apoptose (She et al., 2002b). L'activation des protéines ribosomales p90<sup>RSK</sup> et P70<sup>S6K</sup> (70-kD ribosomal S6 kinase) par ERK et p38, mais non par JNK dans le cas des UVB, permet une régulation de l'expression génique au niveau traductionnel modulant la croissance cellulaire après irradiation (Nomura et al., 2001). Dans le cas des UVA, ERK et JNK activent p90<sup>RSK</sup> par phosphorylation de la Sérine 381 dans la lignée de kératinocytes JB6 (Zhang et al., 2001).

*PI3K*. La voie PI3K/AKT (Figure 16E) est activée par les UVB, induisant l'augmentation de la forme phosphorylée PIP3 (Kabuyama et al., 1998) et réprimant l'apoptose (Ibuki and Goto, 2000). Il semble que l'activation de PI3K soit plus importante en réponse aux UVB qu'aux UVA et C (Bode and Dong, 2003, Lopez-Camarillo et al., 2012). Dans des peaux humaines irradiées, les UV induisent (i) l'activation de PI3K, (ii) l'activation d'AKT par phosphorylation, dépendante de PDK1, de la Sérine 473 et (iii) la phosphorylation de BAD, de façon dépendante de EGFR et PI3K (Wan et al., 2001). La cascade d'activation d'AKT induit les phosphorylations activatrices ou inhibitrices de nombreuses cibles dont GSK3β (Sérine 9), IKKα (Sérines 176 et 180), MDM2 (Sérines 166 et 186) et FOXO1 (Thréonine 24, Sérines 256 et 319) (Figure 16). L'activation d'IKKα induit la dégradation d'IκB, inhibiteur de



NFκB, et permet l'activation des facteurs de transcription de la famille NFκB (Strozyk and Kulms, 2013). PI3K/AKT régule et croise de nombreuses voies de signalisation dont les MAPK favorisant d'une façon générale la survie et la prolifération cellulaire.

*TGFβ*. De nombreuses autres voies sont régulées par les UVB soit directement via un chromophore et l'activation d'un récepteur, soit indirectement via les ROS ou en aval des voies précédemment citées. L'expression du facteur SMAD7, de la voie TGFβ/SMAD, est activée par les UVB dans les fibroblastes humains primaires en culture grâce au facteur de transcription AP-1 (Quan et al., 2005).

*β-caténine*. Comme p38, JNK, ERK, p53, SMAD, l'activité des protéines est dépendante de leur localisation cellulaire. La régulation de l'activité des protéines par relocalisation cellulaire est un mécanisme de réponse rapide au stress puisqu'il ne nécessite pas de synthèse protéique. L'activation de ces protéines, souvent par modification post-traductionnelle, permet leur relocalisation grâce à des transporteurs, ou par changement de conformation et mise en évidence d'un domaine de relocalisation nucléaire (NLS). C'est le cas de β-caténine, qui ne possède pas de domaine NLS mais interagit probablement avec des transporteurs nucléaires composant les pores nucléaires tels que NUP62 (Aktary et al., 2016, Sharma et al., 2012). L'activité de β-caténine est régulée par différents stress qui favorisent sa localisation membranaire, cytoplasmique ou nucléaire. Deux études *in vivo* ont montré, dans les peaux de souris adultes irradiées par des UVB, que la forme nucléaire de β-caténine est augmentée dans la peau totale (Prasad and Katiyar, 2014), et dans les cellules souches mélanocytaires du follicule pileux de façon dépendante du RTK KIT (Yamada et al., 2013). L'activité transcriptionnelle de β-caténine augmente *in vitro* après irradiation UVB de kératinocytes en culture (Smith et al., 2012). Dans ces études, la relocalisation et l'activation de β-caténine ont été corrélées avec une diminution du niveau de GSK3β total ou une augmentation de sa phosphorylation inactivatrice (Sérine 9), mais l'implication directe de GSK3β dans l'activation de β-caténine par les UV n'a pas été montrée.

Dans les kératinocytes HaCaT irradiés, les UVA induisent la phosphorylation de la Sérine 654 de β-caténine, par une voie dépendante de EGFR, la translocation nucléaire de β-caténine et son interaction avec les facteurs de transcription TCF, alors que son interaction avec la E-cadhérine est réduite. La sérine 654 de β-caténine est nécessaire à l'augmentation de la migration des cellules HaCaT irradiées par des UVB (Jean et al., 2009). L'endotheline-1

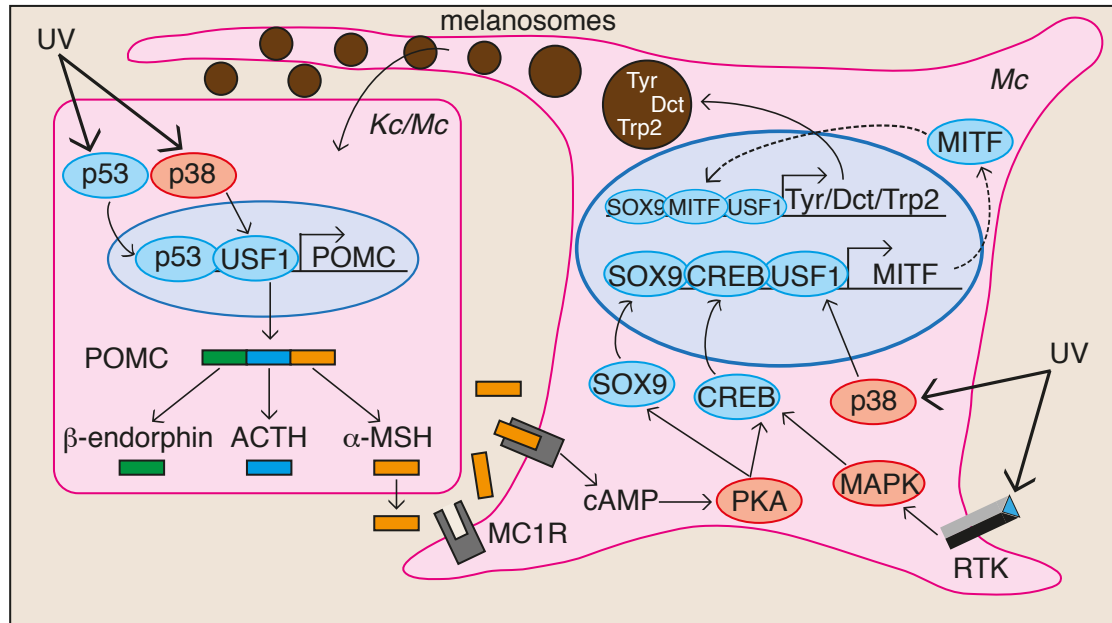
(EDN-1), synthétisée *in vitro* par les kératinocytes irradiés par des UVB, réduit les niveaux de E-cadhérine et de  $\beta$ -caténine 40h après irradiation de mélanocytes et de cellules de mélanomes en culture, suggérant l'implication de EDN-1 et E-cadhérine dans la diminution à long terme du niveau de  $\beta$ -caténine après irradiation (Jamal and Schneider, 2002).

Dans des kératinocytes en culture non irradiés, p38 induit la relocalisation nucléaire d'APC, protéine du complexe de destruction de  $\beta$ -caténine, et augmente la forme phosphorylée et nucléaire de  $\beta$ -caténine (Hildesheim et al., 2005). Dans des fibroblastes murins embryonnaires (MEF) non irradiés, l'activation d'ATM, par un stress oxydatif prolongé, inhibe l'expression de WIF-1 (WNT inhibitor factor 1) via les facteurs de transcription c-JUN et ATF3. L'inhibition de WIF-1 est associée à une diminution de la transcription de CTNNB1 et à une diminution de l'activité co-transcriptionnelle de  $\beta$ -caténine (Svegliati et al., 2014).

L'activation de  $\beta$ -caténine par les UVB peut également être modulée par PTEN via MC1R. Les UV induisent la formation d'un immunocomplexe entre MC1R et PTEN, inactivant PTEN et augmentant le niveau de phosphorylation d'AKT dans des mélanocytes humains primaires en culture ou dans des cellules de mélanome murin B16. Cette interaction est dépendante à la fois des UV, de la présence d' $\alpha$ -MSH et du statut de MC1R (Cao et al., 2013). De plus, PTEN réduit l'activité de  $\beta$ -caténine par compétition d'interactions avec CAV1. Dans des cellules épithéliales murines, la diminution du niveau de PTEN augmente la forme nucléaire active de  $\beta$ -caténine, alors qu'une diminution du niveau de CAV1 réduit la forme nucléaire de  $\beta$ -caténine (Conde-Perez et al., 2015). Les UVB, en inactivant PTEN via MC1R, pourraient augmenter la localisation nucléaire et l'activité de  $\beta$ -caténine.

### 2.3.3. Pigmentation et protection contre les UV

Comme évoqué dans la partie 2.1.2, les UV induisent une augmentation de la pigmentation en deux phases, ce qui permet un rétrocontrôle négatif de la réponse aux UV puisque la pigmentation réduit la dose d'UV atteignant les cellules épidermiques *in vivo*, et donc la réponse cellulaire. Cette réponse, spécifique des mélanocytes, repose sur l'activation du récepteur MC1R, exprimé dans la peau spécifiquement par les mélanocytes, et sur le facteur de transcription M-MITF, caractéristique des mélanocytes.



**Figure 17. Voie dépendante de MC1R**

L'activation de p53 par les UV dans les kératinocytes (Ozel Turkcu et al.) et les mélanocytes (Mc) active la transcription du gène POMC (ProOpioMelanoCortine) codant un précurseur polypeptidique qui forme après clivage la β-endorphine, l'ACTH (Hormone AdrénocorticoTrophine) et l'α-MSH (α-Melanocyte Stimulating Hormone). Le peptide α-MSH se fixe sur les récepteurs MC1R (MelanoCortin 1 Receptor), qui sont activés par phosphorylation. Dans les mélanocytes, MC1R active l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) qui active PKA puis les facteurs de transcription CREB (cAMP Response Element-Binding protein) et SOX9 (SRY-related HMG box). CREB peut également être activé par les MAPK suite à l'activation du RTK, KIT, par les UVB. Les UV activent p38 qui active le facteur de transcription USF1 (UpStream transcription Factor 1). CREB, SOX9 et USF1 induisent la transcription de MITF après irradiation UV. MITF active la transcription des enzymes de la mélanogénèse, alors que SOX9 et USF1 activent la transcription de tyrosinase, augmentant la mélanogénèse et la pigmentation. Adapté de (Oren and Bartek, 2007).

**MC1R-MITF.** Le récepteur MC1R est un récepteur couplé à une protéine G (GPCR) à sept domaines transmembranaires, activé par phosphorylation des Sérines (dont S316) et Thréonines (dont T308) après fixation d'un agoniste tel que α-MSH. Il active en aval les kinases PKA et PKC via l'AMPc. La voie classique d'activation de MC1R par les UV fait intervenir la synthèse d'α-MSH par les kératinocytes et les mélanocytes (Millington, 2006, Nicolaou et al., 2004), grâce à p53 (Cui et al., 2007), qui induit la transcription de MITF, puis des enzymes de la mélanogénèse (Busca and Ballotti, 2000) (Figure 17). L'activation de l'AMPc par les UVB active également le facteur de transcription SOX9 (Passeron et al., 2007), qui induit la transcription à la fois de MITF et des enzymes de la mélanogénèse, augmentant la quantité de mélanine dans des mélanocytes humains en culture. Les autres produits de POMC, ACTH et β-endorphine, sont également impliqués dans la réponse aux UV puisque ACTH se fixe également sur le récepteur MC1R, et β-endorphine régule la

mélanogénèse dans les mélanocytes de la papille dermique (Kausser et al., 2004). Cette signalisation participe donc à la pigmentation à long terme après irradiation.

De nombreuses protéines affectent l'activité des récepteurs GPCR et, en particulier, de MC1R dans les mélanocytes. Les différents isoformes de la famille des  $\beta$ -arrestines interagissent avec MC1R dans des cellules de mélanome humain HBL; ARRB2, mais pas ARRB1, empêche l'activation de MC1R par MSH (Abrisqueta et al., 2013, Swope et al., 2012). Les facteurs  $\beta$ -arrestine participent à la voie WNT/ $\beta$ -caténine en interagissant à la fois avec le récepteur LRP6 et Dishevelled (Bryja et al., 2007).

*MAPK-MITF*. Différents RTK sont impliqués dans la régulation du niveau basal de pigmentation (EGFR, FGFR, KIT, EDNRB). Certains de ces récepteurs sont activés par les UV et participent ainsi à l'augmentation de la pigmentation. L'endotheline-1 (EDN-1) est synthétisée par les kératinocytes irradiés *in vitro* (Jamal and Schneider, 2002) et *in vivo* (Hyter et al., 2013). Dans des peaux de souris irradiées aux UVB, le nombre de cellules exprimant KIT et le niveau d'expression de son ligand augmentent dans les mélanocytes (Yamada et al., 2013). Ces RTK activent la transcription de MITF par la voie des MAPK et le facteur de transcription CREB, et induisent des phosphorylations activatrices de MITF sur les sérines 73, par ERK, et 409, par p90<sup>RSK</sup>, augmentant ainsi la mélanogénèse (Hemesath et al., 1998, Lin and Fisher, 2007).

*P38-USF1*. La pigmentation est induite par les UV dans les mélanocytes par une voie dépendante de p38 et du facteur de transcription USF1 (Figure 17). La kinase p38, activée par les UV (partie 2.3.2), phosphoryle la Thréonine 153 d'USF1, qui est alors activé et induit la transcription de tyrosinase (Galibert et al., 2001). L'activation d'USF1 par p38 induit également la transcription de POMC et MC1R dans des mélanocytes irradiés par des UVB (Corre et al., 2004), amplifiant la voie, dépendante de MC1R, de synthèse de mélanine en réponse aux UV. Le facteur USF1 régule également la transcription de CSA et HR23A, deux facteurs du NER, affectant la vitesse de réparation des CPD induits par les UVB *in vivo* et *in vitro* dans les kératinocytes murins XB2 (Baron et al., 2012).

### 3. La protéine Dicer et les microARN

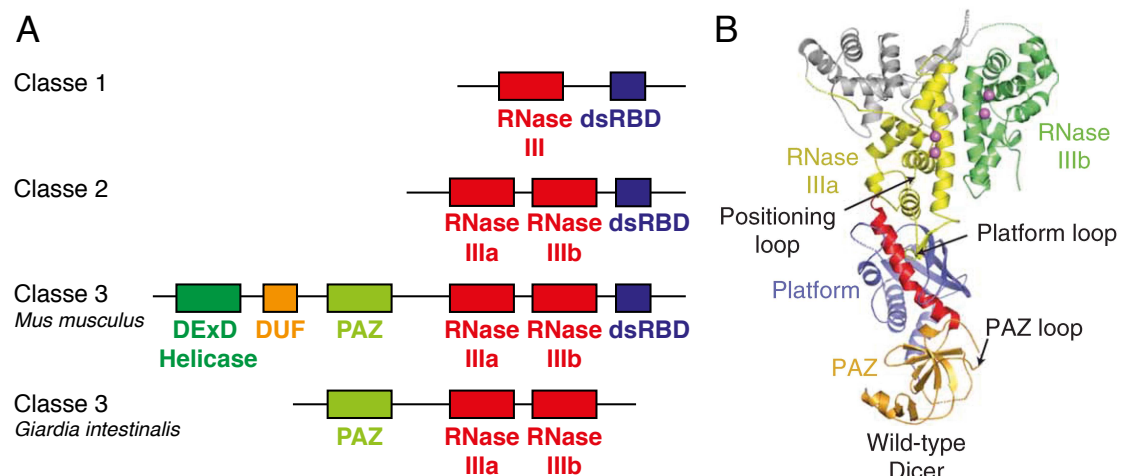
Les ARN interférents sont des ARN simple brin de 19 à 22 nucléotides impliqués dans l'extinction de l'expression de gènes spécifiques. Les ARN interférents peuvent avoir une origine endogène, suite à l'expression de gènes (microARN, piwiARN, lncARN, ...), ou exogène, suite à l'insertion par transfection ou infection virale d'un ARN (siARN). Les premières observations du phénomène d'extinction d'un caractère remontent à 1928 lorsque des plants de tabac infectés par le virus TRV (Tobacco Ring spot Virus) ont développé une résistance à ce virus. La défense contre les infections virales est d'ailleurs probablement l'une des forces ayant permis la sélection du mécanisme d'extinction génique. Le mécanisme général responsable de ce processus n'a été élucidé qu'en 1993 chez *Caenorhabditis elegans* par V. Ambros et G. Ruvkun avec le gène *lin-4* (Lee et al., 1993, Wightman et al., 1993). Le mécanisme moléculaire d'action des ARN interférents a été réellement caractérisé chez *C. elegans* en 1998 avec l'introduction expérimentale d'un ARN exogène dans le but d'éteindre l'expression d'un gène cible (Fire et al., 1998). Cette découverte a été récompensée par le prix Nobel de Médecine en 2006 à Craig Mello et Andrew Fire. La découverte du deuxième microARN (miARN), *let-7*, en 2000 chez *C. elegans*, puis de ses homologues chez de nombreuses espèces dont les Mammifères, a augmenté l'intérêt pour le mécanisme d'extinction génique, étudié intensément depuis cette date. Le rôle de la RNase III Dicer dans la maturation des miARN a été mis en évidence en 2001 chez *C. elegans* et *D. melanogaster* faisant le lien entre le mécanisme d'interférence des ARN exogènes et les miARN endogènes (Almeida et al., 2011).

#### 3.1. Structure des RNase III et de Dicer

Les RNase III sont des endoribonucléases (RNase) capables de cliver l'ARN double brin en une structure double brin comportant un groupe phosphate en 5' et deux nucléotides débordants en 3'. La famille des nucléases RNase III comporte trois classes caractérisées par leurs domaines (Figure 18A). La classe 1 regroupe les RNase III composées d'un unique domaine ribonucléase et d'un domaine de fixation à l'ARN double brin (dsRBD). La classe 2 regroupe les RNase III composées de deux domaines ribonucléases appelés RNaseIIIa et RNaseIIIb et d'un domaine dsRBD. La classe 3 regroupe les RNase III composées de six domaines: deux domaines ribonucléases RNaseIIIa et RNaseIIIb, un domaine dsRBD, un domaine hélicase N-terminal DExD/H-box, un domaine DUF283 (Domain of Unknown

Function) et un domaine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) (MacRae and Doudna, 2007). La classe 1 contient des RNases bactériennes et eucaryotes, la classe 2 contient les RNases de la famille de DROSHA et la classe 3 contient les RNases de la famille de DICER.

La protéine Dicer est conservée chez les eucaryotes même si elle semble avoir été perdue de façon indépendante dans de rares cas comme chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Trypanosoma cruzi* et *Cyanidioschyzon merolae* (Cerutti and Casas-Mollano, 2006). La structure de la protéine Dicer peut varier avec par exemple absence des domaines hélicase-DUF et dsRBD chez *Giardia intestinalis* (Macrae et al., 2006) (Figure 18A). Un seul isoforme de Dicer est exprimé chez les Vertébrés (ex: *Homo sapiens*) alors que deux isoformes sont exprimés à partir de deux gènes paralogues chez les Insectes (ex: *Drosophila melanogaster*) et quatre isoformes sont exprimés à partir de quatre gènes paralogues chez les Plantes (ex: *Arabidopsis thaliana*). Chez les organismes exprimant plusieurs isoformes de Dicer, les domaines peuvent être répartis sur les différents isoformes (Sasaki and Shimizu, 2007). Par exemple, chez *D. melanogaster*, Dicer1 a perdu une partie du domaine hélicase N-terminal alors que Dicer2 possède les six domaines caractéristiques des RNaseIII de classe 3 (Welker et al., 2011).



**Figure 18. Domaines caractéristiques des RNase III et structure 3D de Dicer**

(A) Comparaison des domaines caractéristiques des différentes classes de RNase III et des spécificités structurales des RNase III de classe 3 des Mammifères et de *G. intestinalis*. DUF : Domain of Unknown Function ; PAZ : Piwi-Argonaute-Zwille ; dsRBD : double strand RNA Binding Domain (B) Représentation 3D de la structure obtenue par cristallographie de Dicer de *Giardia intestinalis*. Domaine PAZ (orange), domaine RNaseIIIa (jaune), domaine RNaseIIIb (vert), sites de fixation des ions métaux (International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet and skin), pont entre les deux domaines RNaseIII (gris), plateforme de support pour l'ARN double brin (bleu), connecteur en hélice  $\alpha$  (rouge). Extrait de (MacRae et al., 2007).

Chacun des domaines de Dicer assure une fonction individuelle qui donne à la protéine sa fonction globale (MacRae and Doudna, 2007, Nicholson, 2014). La construction par cristallographie de la structure 3D de Dicer chez *Giardia intestinalis* a permis de mettre en évidence des mécanismes d'action des domaines RNaseIIIa, IIIb et PAZ (Macrae et al., 2006). Les domaines PAZ et RNase fonctionnent comme une hachette (Figure 18B). Le domaine PAZ, poignée de la hachette, permet la reconnaissance de l'ARN double brin, et grâce à la structure continue du domaine PAZ avec le domaine RNaseIIIa, oriente l'ARN double brin pour obtenir un clivage à 25-27 nucléotides à partir de l'extrémité 3' (MacRae et al., 2007). Les domaines RNaseIII, lames de la hachette, forment une structure hétérodimérique interne. Si l'activité RNaseIII de Dicer fonctionne sous forme d'un monomère, l'hétérodimère interne des deux domaines RNaseIII rappelle la structure homodimérique des RNaseIII bactériennes de classe 1. L'activité ribonucléase de Dicer étant dépendante du magnésium, deux sites de fixation de  $Mg^{2+}$  ont été observés sur chaque domaine RNaseIII, autour du site de clivage, et permettent probablement de catalyser la réaction (Macrae et al., 2006). L'étude par cristallographie de Dicer humain est restreinte par la taille d'environ 220 kDa de la protéine alors que Dicer *Giardia intestinalis* fait environ 90 kDa.

L'étude des protéines Dicer de *D. melanogaster* et de *C. elegans* a montré que le domaine hélicase est nécessaire au clivage des ARN double brin possédant des extrémités franches ou une extrémité 5' débordante mais pas dans le cas d'une extrémité 3' débordante. Cette activité hélicase est dépendante d'ATP (Welker et al., 2011). La fonction du domaine PAZ de fixation de l'ARN double brin, mise en évidence par cristallographie, a amené à rechercher la fonction du domaine dsRBD, conservé dans les trois classes de RNaseIII. L'une des hypothèses est que ce domaine permettrait une distinction entre les ARN double brin linéaires (siARN) et les structures tige-boucle (miARN). Cependant, une étude de Dicer humain a révélé que la fixation d'un ARN double brin par le dsRBD n'est pas affectée par la présence d'un ARN simple brin tel qu'une boucle, indiquant que le domaine dsRBD fixe aussi bien les siARN que les miARN (Wostenberg et al., 2012).

## 3.2. Fonctions moléculaires de Dicer

### 3.2.1. Fonctions cytoplasmiques

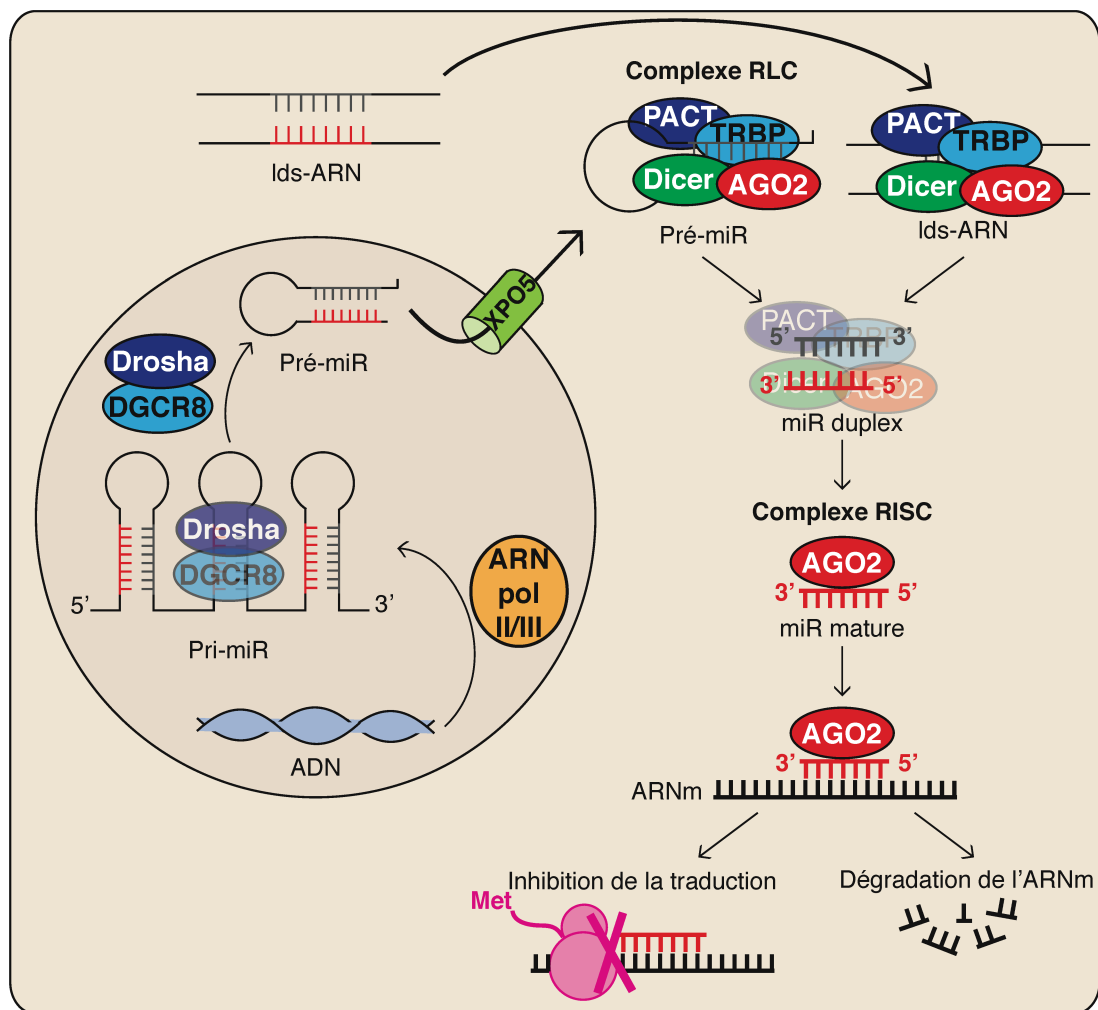
Les ARN non codants sont divisés en fonction de leur taille en longs ARN non codants (lncRNA) et petits ARN non codants (sncRNA). La classification des sous-catégories d'ARN non codants est basée sur l'origine génomique et leur mécanisme de biosynthèse. Les miARN, endo-siARN et piwi-ARN sont de petits ARN non codants réprimant l'expression de gènes cibles par complémentarité de séquences. Les miARN et endo-siARN sont maturés par Dicer et Argonaute alors que les piwi-ARN sont maturés par Piwi et sont spécifiques de la lignée germinale. La fonction canonique de DICER est la maturation des longs ARN double brin en siARN et des pré-miARN en miARN duplex, plaçant Dicer au cœur de la régulation de l'expression génique (Figure 19). Le terme "longs ARN double brin" regroupe des ARN double brin exogènes à la cellule, tels que les génomes de virus à ARN, ou les ARN double brin introduits de façon expérimentale et communément appelés siARN.

Les miARN sont exprimés à partir de gènes monocistroniques ou polycistroniques codant plusieurs miARN d'une même famille, ou sont insérés dans les introns d'autres gènes. Leur transcription est régulée par leur propre promoteur ou par le promoteur du gène dans lequel ils sont insérés. Les miARN reconnaissent des séquences 3'UTR, 5'UTR, codantes et/ou promotrices des ARN et gènes, si bien qu'un seul miARN peut avoir plusieurs gènes cibles. Les miARN sont impliqués dans la régulation de l'expression de nombreux gènes et de tous les processus cellulaires tels que la prolifération, l'apoptose ou la différenciation.

Dans le complexe RLC, l'activité de Dicer est régulée par les protéines TRBP et PACT. TRBP est proche du domaine hélicase de Dicer alors que AGO2 est proche du domaine RNaseIII de Dicer. TRBP, associé à Dicer, contribue à la fixation de l'ARN, à la stabilisation du complexe Dicer/ARN, à la précision du site de clivage, à la mesure du brin clivé, à l'efficacité du clivage et à l'assemblage des complexes RLC et RISC. PACT favorise le clivage par Dicer des pré-miARN par rapport aux précurseurs de siARN (Kurzynska-Kokorniak et al., 2015).

Chez les plantes, un nouveau mécanisme de régulation des miARN a été mis en évidence. Les pri-miARN synthétisés par l'ARN polymérase, jusqu'alors reconnus comme non codants, peuvent être traduits sur de petites fenêtres de lecture (ORF) conduisant à la synthèse d'un petit peptide appelé miPEP. Ce miPEP augmenterait l'expression et l'efficacité des miARN associés (Lauressergues et al., 2015).





**Figure 19. Voie de biogenèse et de maturation des microARN et siARN**

La voie de biogenèse des miARN (miR) commence par la synthèse par l'ARN polymérase II ou III d'un miARN primaire (pri-miR) constitué d'une succession de structures tige-boucle avec une coiffe en 5' et une queue polyA en 3'. Dans le noyau, le pri-miARN est pris en charge par un complexe microprocesseur formé de DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) qui reconnaît et fixe l'ARN double brin et de la RNase III de classe 2 DROSHA qui clive le pri-miARN en miARN précurseur (pré-miR) d'environ 70 nucléotides. Le pré-miARN est constitué d'une unique structure tige-boucle avec une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3' débordante de 2 nucléotides caractéristique des RNase III. Le pré-miARN est exporté du noyau vers le cytoplasme grâce à l'Exportine 5 (XPO5). Dans le cytoplasme, le pré-miARN est pris en charge par le RLC (RISC-loading complex) formé de nombreuses protéines dont Dicer, TRBP (human immunodeficiency virus (HIV)-1 transactivating response (TAR) RNA-binding protein), PACT (protein activator of protein kinase R), et AGO2 (Argonaute RISC catalytic component 2). Dicer clive le pré-miARN en un miARN double brin, appelé miARN duplex, d'environ 22 nucléotides avec une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3' débordante de 2 nucléotides. Le miARN duplex est chargé sur AGO2 par le RLC dans un complexe effecteur appelé RISC (RNA-induced silencing complex). Le complexe RISC effectue la dernière étape de maturation du miARN en éliminant l'un des deux brins du miARN duplex, appelé passager ou \*miARN, conservant le miARN mature ou guide fixé à AGO2. Le complexe RISC mature reconnaît alors les ARNm cibles du miARN mature, et réprime leur expression généralement par inhibition de la traduction ou déadénylation et dégradation de l'ARNm. Les siARN sont synthétisés à partir de longs ARN double brin (lds-ARN) exogènes maturés par des voies similaires à la voie de maturation des miARN à partir de la prise en charge par le complexe RLC. Inspiré de (Emde and Hornstein, 2014, Foulkes et al., 2014, Kurzynska-Kokorniak et al., 2015).

### 3.2.2. Fonctions nucléaires

#### 3.2.2.1. Maturation nucléaire des microARN

La maturation des miARN et siARN peut se produire dans le noyau grâce à un complexe appelé RITS (RNA-induced transcriptional silencing) faisant intervenir des protéines Dicer et Drosha nucléaires. Ce mécanisme régule la transcription des gènes cibles suite à la reconnaissance, par le couple Drosha/miARN, de l'ARNm cible en cours de transcription. Chez *Saccharomyces pombe*, le complexe RITS recrute des enzymes de méthylation des histones (H3K9me) induisant la formation d'hétérochromatine et réprimant la transcription. Chez les Mammifères, le complexe RITS recrute des enzymes de méthylation des histones réprimant (H3K9me3) ou activant (H3K4me3) la transcription (Burger and Gullerova, 2015).

#### 3.2.2.2. Régulation de la transcription

Une étude chez les Mammifères a montré un mécanisme de régulation de la transcription grâce à des ARN double brin maturés par Dicer. Dans les cellules HEK293, Dicer interagit avec l'ARN polymérase II et l'ARN guide pour réprimer la transcription du gène cible. Cette interaction, spécifiquement observée dans des sites actifs de transcription, se produit dans des régions ouvertes de la chromatine mais induit la méthylation H3K9me2 répressive de la transcription (White et al., 2014). Des protéines du complexe RLC, Dicer, PACT et TRBP sont également impliquées dans la régulation de l'activité de récepteurs nucléaires, tels que SRA (steroid receptor RNA activators) en jouant le rôle de co-régulateurs dans la transcription des gènes cibles. Enfin Argonaute, Dicer et des petits ARN interfèrent avec la machinerie d'épissage. En particulier, les protéines AGO, associées à l'ARN guide sont recrutées par le spliceosome sur l'ARNm, ralentissent la transcription et facilitent l'épissage (Kurzynska-Kokorniak et al., 2015).

#### 3.2.2.3. Maturation des ARN ribosomiques

Dicer semble également impliqué dans la maturation des ARN ribosomiques (ARNr). Chez *Candida albicans*, l'invalidation du gène *DCR1*, codant une forme simplifiée de RNase III de classe 3 homologue à Dicer, a été réalisée en réinsérant une forme ectopique inductible de DCR1, puisqu'un mutant total, probablement létal, ne peut être obtenu. En absence d'induction de DCR1 ectopique, la croissance cellulaire et la maturation des siARN sont réduites, et une accumulation d'ARNr non maturés est observée (Bernstein et al., 2012). Cette

étude suggère donc une possible fonction de Dicer dans la maturation des ARNr chez les eucaryotes, rappelant la fonction de RNT1 chez *S. cerevisiae* ou la fonction des RNase III bactériennes (classe 1) chez *Escherichia coli* dans le processus de maturation des ARNr (Bernstein et al., 2012, MacRae and Doudna, 2007). L'étude n'apporte pas d'indications sur la localisation cytoplasmique ou nucléaire de cette fonction. Chez les Mammifères, Dicer interagit également avec les ADN ribosomiques (Sinkkonen et al., 2010, White et al., 2014).

#### 3.2.2.4. Régulation de la structure de la chromatine

De façon générale, Dicer est impliqué dans la structure de la chromatine. La première étude démontrant le rôle de Dicer dans la formation de l'hétérochromatine a été publiée en 2004 et utilise un modèle inductible d'inactivation de Dicer dans des cellules DT40 hybrides poulet-Homme possédant le génome total du poulet et le chromosome 21 humain. Les cellules mutantes pour Dicer1 accumulent des transcrits de séquences satellites centromériques normalement hétérochromatiques et non transcrites, et présentent des anomalies de la localisation de deux protéines de l'hétérochromatine, Ras21 et BubR1. Elles accumulent également des anomalies mitotiques et présentent une séparation prématurée des chromatines sœurs. Ces observations suggèrent un rôle important de Dicer dans la formation de l'hétérochromatine nécessaire à la ségrégation des chromosomes en mitose (Fukagawa et al., 2004). Chez les Mammifères, l'interaction d'AGO1 et Dicer avec des ARN double brin dans le noyau induit la formation de marques répressives H3K9me2 sur les gènes cibles. Le lien entre la formation de marques répressives H3K9me2 et le complexe RITS n'a pas été démontré mais ces deux mécanismes semblent faire intervenir les mêmes acteurs et favoriser la formation d'hétérochromatine. De plus, l'analyse ChIP-seq d'interaction de Dicer avec l'ADN a montré un enrichissement de Dicer sur les régions satellites, ARNr et ARNt qui sont des régions d'hétérochromatine, et un appauvrissement de Dicer sur les régions d'éléments transposables qui peuvent être associées à l'hétérochromatine (LINE) ou l'euchromatine (White et al., 2014). Une étude *in vitro* a montré qu'après irradiation de fibroblastes humains par des UVC, Dicer est recruté aux sites de dommages de l'ADN grâce à son interaction avec ZRF1 et à des ARN, permettant l'ouverture de la chromatine via PARP mais indépendamment de DDB2 (Chitale and Richly, 2017).

### 3.2.2.5. Réparation des dommages de l'ADN

Dicer est impliqué dans la réparation des dommages de l'ADN par différentes machineries de réparation. L'invalidation périnatale de Dicer dans les kératinocytes grâce au mutant K5::Cre induit la perte du pelage chez la souris adulte et l'accumulation de cassures double brin (DSB) caractérisée par une augmentation de la phosphorylation de H2AX en aval d'ATM (Lyle et al., 2014). Dicer est impliqué dans la réparation des DSB de l'ADN chez les animaux (Francia et al., 2012) et les plantes (Wei et al., 2012) grâce à des ARN double brin appelés DDRNA (DNA-damage RNA ou Dicer- and Drosha- dependent ARN). Ces DDRNA, synthétisés au niveau des sites de dommages, maturés par Dicer et Drosha, activent la phosphorylation d'ATM, par un mécanisme encore inconnu mais dépendant de l'ARN polymérase II, et induisent la réparation par recombinaison homologue (Francia et al., 2012). Dans les fibroblastes humains irradiés par des UVC *in vitro*, l'ouverture de la chromatine par ZRF1-Dicer-PARP accélère la réparation des CPD par GG-NER (Chitale and Richly, 2017). Et l'interaction de Dicer avec l'ARN polymérase II observée dans des cellules humaines (White et al., 2014), suggère que Dicer pourrait également participer à l'étape de reconnaissance des dommages par TC-NER, initiée par la polymérase II. Enfin, il apparaît aujourd'hui que plusieurs protéines, initialement impliquées dans la biogenèse des miARN, participeraient à la réparation des dommages de l'ADN, par exemple, DGCR8 dans le TC-NER (Calses et al., 2017) et AGO1 dans le NER (Schalk et al., 2017).

### 3.2.2.6. Fonction DNase

Une fonction non-canonique de Dicer est la possibilité de convertir cette RNase en une DNase. Cette fonction a été observée et mise en évidence chez *C. elegans* où l'homologue de Dicer, DCR-1, participe à la fragmentation de l'ADN dans le mécanisme d'apoptose. DCR-1 est clivé par CED-3, homologue de la caspase 3 humaine, au milieu du domaine RNaseIIIa générant une protéine formée d'un domaine RNaseIII tronqué, d'un domaine RNaseIII entier et d'un domaine dsRBD, capable de digérer l'ADN. Le site catalytique de clivage de l'ADN de cette protéine tronquée est le même site que celui de la RNase totale (Nakagawa et al., 2010). L'activité DNase de la protéine DCR-1 totale est réprimée par une structure en hélice  $\alpha$  située en N-terminal de la protéine (Ge et al., 2014).

### 3.3. Régulation de Dicer

#### 3.3.1. Mécanismes de régulation de Dicer

##### 3.3.1.1. Mécanismes de régulation de l'ARN Dicer

Le gène *DICER1*, localisé sur le chromosome 14 chez l'Homme et sur le chromosome 12 chez la souris, possède 26 exons codants conservés entre les deux espèces. Les séquences nucléotidiques des gènes *DICER1* chez l'Homme et *Dicer1* chez la souris présentent 53% d'identité et de similarité, et les séquences peptidiques des protéines Dicer humaines et murines présentent 92% d'identité et 96% de similarité par alignement global, confirmant la conservation de la protéine Dicer entre l'Homme et la souris.

La structure du locus humain a été plus précisément étudiée par Singh et al. (Singh et al., 2005) et Irvin-Wilson (Irvin-Wilson and Chaudhuri, 2005). La présence de sites alternatifs d'initiation de la transcription et d'épissages alternatifs en 5' a amené deux nomenclatures différentes de la part de ces auteurs. La nomenclature de Singh et al, utilisée par la suite, référence ces exons alternatifs en 1A, 1B, 1C pour les exons d'initiation et AS1, AS2, AS3 pour les exons alternatifs d'épissage. Cette région fortement variable constitue la partie 5'-UTR de l'ARNm puisque le site d'initiation de la traduction (AUG) se situe dans l'exon 2 d'après la nomenclature de Singh et al. Elle engendre une régulation fine du niveau de transcription et de la stabilité des ARN permettant une spécificité de tissu ou de stade de développement pour les transcrits de *DICER1* (Irvin-Wilson and Chaudhuri, 2005, Singh et al., 2005). La région 3'-UTR des transcrits, moins variable mais particulièrement longue (plus de 4000 pb), est impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle de *DICER1* (Kurzynska-Kokorniak et al., 2015). Parmi les différents variants de *DICER1*, quatre transcrits principaux ont été identifiés chez l'Homme, avec des variations dans les régions 5' et 3' UTR mais codant la même protéine de 1922 acides aminés. Chez la souris, un seul transcrit de 1906 acides aminés est répertorié. Le fait que le niveau d'ARNm de Dicer ne soit pas toujours corrélé à son niveau de protéine suggère différents niveaux de régulation de l'expression de Dicer.

Le niveau de transcription de ces ARNm est régulé par différents facteurs de transcription. SOX4 se fixe au promoteur de Dicer et induit la transcription de *DICER1* dans des cellules de mélanome humain (Jafarnejad et al., 2013). Des sites de fixation de MITF sont présents sur une séquence de 2,5 kb en amont du premier site d'initiation de la transcription de *DICER1*, et MITF induit la transcription de *DICER1* dans des mélanocytes

humains primaires en culture (Levy et al., 2010). Des sites de fixation de p53 et p63 sont également présents sur le promoteur de *DICER1*, mais, chez la souris, seul p63 se fixe au promoteur et induit la transcription de *Dicer1* dans des fibroblastes en culture (Su et al., 2010). La cycline D1 induit la transcription de *DICER1* dans des cellules MEF7 de cancer du sein par un mécanisme inconnu (Yu et al., 2013). Le niveau d'ARNm de DICER est régulé par des facteurs épigénétiques. La méthyltransférase EZH2 réprime la transcription de *DICER1* en réponse à l'hypoxie dans des cellules MCF7 et HMLER de cancer du sein (van den Beucken et al., 2014).

La stabilité des ARNm de DICER est régulée par différents microARN (miR), tels que les miR-103/107, le miR-192 et des miR de la famille let-7 qui ciblent la région 3'-UTR des transcrits (Kurzynska-Kokorniak et al., 2015). Les miR-103 et 107 diminuent le niveau protéique de DICER dans les cellules d'ostéosarcome U2OS et de cancer du sein MDA-MB-231 (Martello et al., 2010). Pour certains miR, tels que let-7, des séquences cibles se trouvent aussi dans la partie codante des transcrits de DICER. L'exportation des transcrits de DICER dans le cytoplasme est dépendante de l'Exportine 5 qui assure également le transport des pré-miARN et des ARN viraux, suggérant une compétition entre ces différents ARN et un mécanisme d'inhibition de la traduction de DICER (Bennasser et al., 2011).

### 3.3.1.2. Mécanismes de régulation de la protéine Dicer

La stabilité et l'activité de la protéine Dicer sont régulées par des modifications post-traductionnelles. Chez *C. elegans*, Erk phosphoryle les Sérines 1705 et 1833 de Dicer. Ces phosphorylations sont nécessaires et suffisantes à la localisation nucléaire de Dicer. Ces phosphorylations ont également été observées *in vitro* sur les Sérines 1712 et 1836 d'une forme recombinante de DICER humain et *in vivo* chez la souris par immunomarquage avec un anticorps reconnaissant les formes phosphorylées des Sérines 1705 et 1833 de Dicer de *C. elegans* et de *M. musculus* (Drake et al., 2014). La protéine Dicer possède plusieurs sites potentiels de sumoylation et de glycosylation qui pourraient affecter sa stabilité et sa localisation.

L'activité de Dicer est enfin régulée par sa localisation. La localisation cytoplasmique de Dicer, observée dans de nombreuses cellules dans différents organismes, a semblé, à première vue, cohérente avec sa fonction associée aux miARN. Sa localisation nucléaire, confirmée plus récemment, semble être débattue. La protéine Dicer a été observée dans le noyau de cellules humaines et chez le vers *C. elegans* grâce à des immunomarquages de

DICER endogènes ou par suivi d'une protéine de fusion DICER-GFP (Chitale and Richly, 2017, Drake et al., 2014, Francia et al., 2012, White et al., 2014). Cependant, chez la souris, Much et al. soutiennent que Dicer est absent dans le noyau des cellules de souris *in vivo* et *in vitro* (Much et al., 2016). Cette étude ne suit qu'une protéine de fusion Dicer-Gfp et ne présente pas de marquage de la protéine Dicer endogène à cause de l'inexistence d'anticorps spécifiques du Dicer murin.

### 3.3.2. Régulation de Dicer et des microARN par les stress

#### 3.3.2.1. Régulation de Dicer par les stress

	Stress	Type cellulaire	ARN/protéine/activité de Dicer	Variation
Asada et al. 2008	Privation de sérum	Cellules endothéliales de veine de cordon	ARN	↓
			protéine	↓
Wiesen & Tomasi 2009	TSA	Trophoblastes Cellules de mélanome	ARN	↔
			protéine	↓
			activité	↔
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Trophoblastes	protéine	↓
	PMA	Trophoblastes	protéine	↓
	INF-α	Trophoblastes	protéine	↓
	INF-γ	Trophoblastes	protéine	↑
	UV	Pre-adipocytes	ARN	↓
van den Beucken et al. 2014	0.2% O <sub>2</sub>	Cellules de cancer du sein	ARN	↓
			protéine	↓

**Tableau 2. Effet des stress sur l'expression de Dicer**

PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate); TAS (trichostatine A).

L'expression et l'activité de Dicer sont régulées par des stress dans différents types cellulaires (Tableau 2). Dicer est généralement réprimé par les stress. Les traitements par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, phorbol-ester (PMA), interférons α, ou inhibiteur de HDAC (trichostatine A) de trophoblastes JAR ou de cellules de carcinome HeLa, réduisent le niveau de protéine Dicer 4h, 24h, 72h ou 24h après traitement respectivement (Wiesen and Tomasi, 2009). La privation de sérum de cellules endothéliales induit une diminution du niveau protéique de Dicer 12 à 24h après traitement, compensée par un traitement avec le facteur de croissance VEGF (Asada et al.,



2008). La réduction du niveau de dioxygène ambiant à 0,2% dans différentes cellules de cancer du sein (MCF7, MDA, SUM149, HCC1954, HMLER) réduit les niveaux ARN et protéiques de Dicer 24 à 48h après traitement (van den Beucken et al., 2014). Un traitement aux UV de pré-adipocytes en culture 3T3-F442A réduit le niveau d'ARN de Dicer 3h après irradiation. La dose d'UV utilisée varie entre 0 et 50 mJ/cm<sup>2</sup> mais le type d'UV utilisé n'est pas mentionné (Mori et al., 2012). Une seule étude a montré une augmentation du niveau protéique de Dicer dans les cellules de mélanome murin B16, 24h après traitement aux interférons  $\gamma$  (Wiesen and Tomasi, 2009).

Dicer intervient également dans le stress psychologique en interaction avec  $\beta$ -caténine (Dias et al., 2014). La surexpression de  $\beta$ -caténine ou l'expression d'une forme stabilisée de  $\beta$ -caténine (S33Y) dans les cellules des noyaux *accubens* de souris présentant un phénotype assimilé à la dépression, a un effet pro-résilient ou anti-dépressif et anti-anxiolytique. L'analyse par ChIP-seq des sites d'interaction de  $\beta$ -caténine avec l'ADN dans les noyaux *accubens* révèle un enrichissement de  $\beta$ -caténine sur le promoteur de Dicer chez les souris résilientes par rapport aux souris dépressives. L'invalidation de Dicer chez les souris surexprimant  $\beta$ -caténine empêche l'effet pro-résilient de  $\beta$ -caténine suggérant que la régulation de Dicer par  $\beta$ -caténine induit le phénotype pro-résilient dans ce modèle de dépression (Dias et al., 2014).

Le rôle de Dicer dans la réponse aux stress est également soulevé par sa participation à la réparation des dommages de l'ADN induits par différents stress dont les UV (partie 3.2.2.5).

### 3.3.2.1. Régulation des microARN par les UV

La régulation de Dicer et d'autres protéines impliquées dans la maturation de miARN affecte le niveau global des miARN de la cellule. Dans les cellules cutanées, les UV modifient le profil d'expression des miARN qui sont impliqués dans différents processus cellulaires dont la réponse aux dommages de l'ADN (miR-16), la survie cellulaire (miR-22, miR125b, miR-19), la pigmentation (miR-25, miR-145, miR-434), le photovieillissement (miR-155, miR-101) et la photocarcinogénèse (miR-21, miR-17, miR-106a, miR-155, miR-206) (Syed et al., 2013). Les UVA et les UVB induisent différents profils d'expression des miARN dans les kératinocytes (Kraemer et al., 2013) et probablement dans les autres cellules de l'épiderme.

Certains de ces miARN sont régulés par les UV dans le lignage mélanocytaire. L'analyse du miRnome des mélanocytes murins Melan-a, soumis à trois irradiations



consécutives avec un simulateur solaire et traités à la forskoline, a révélé en majorité une diminution du niveau des miARN (miR-125b, miR-139-5p, miR-145, miR-155, miR-193\*, miR-206, miR-218, miR-221, miR-222, miR-28, miR-335\*, miR-365, et miR-455) et l'augmentation du niveau de trois miARN (miR-130b, miR-182, et miR-9) en comparaison des cellules non traitées (Dynoodt et al., 2013). *In vivo*, les miRnoms de mélanocytes extraits de peaux humaines irradiées ou non ont été analysés en distinguant les individus ayant déjà eu un mélanome (n=9) et les individus n'ayant jamais eu de mélanomes ni de cancers cutanés (n=8). Chez les individus ayant eu un mélanome, un résultat similaire aux cellules Melan-a est observé avec une diminution du niveau des miARN après irradiation. Chez les individus n'ayant jamais eu de cancers cutanés, un nombre inférieur de miARN est régulé par les UV et, parmi ces miARN, le niveau de la plupart est augmenté. De plus, seize miARN sont régulés de façon opposée entre les individus ayant eu des mélanomes et ceux n'en ayant jamais eu (Sha et al., 2016). Cette étude suggère que les UV affectent le niveau des miARN dans le lignage mélanocytaire et que la régulation des miARN par les UV est différente entre les cellules de mélanome et les mélanocytes *in vivo* et *in vitro*.

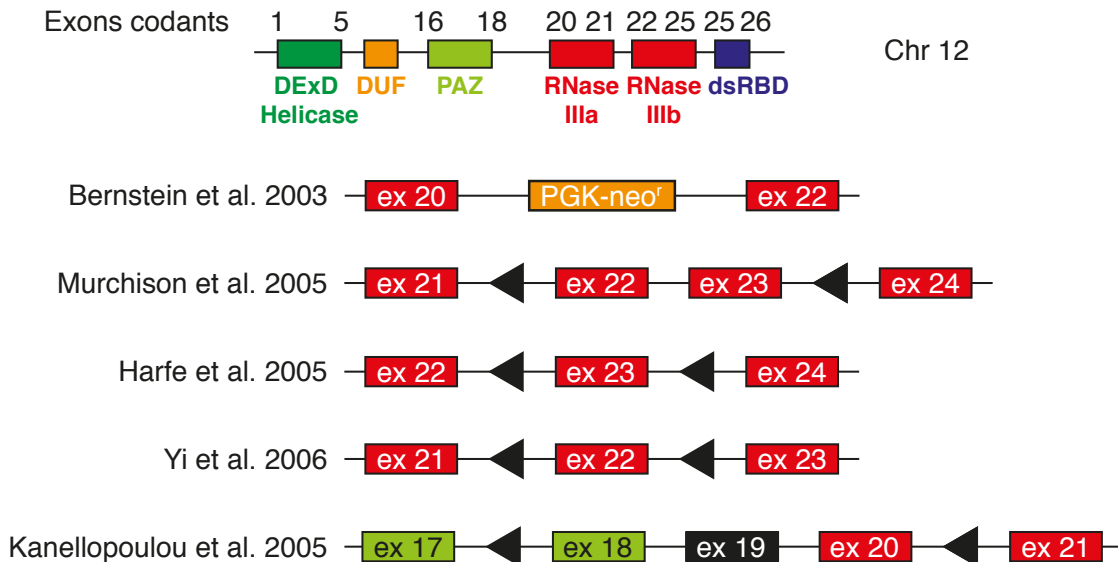
### 3.4. Rôle de Dicer dans le développement

#### 3.4.1. Dicer dans le développement normal chez les Mammifères

L'invalidation totale de Dicer a été réalisée chez la souris par génération d'une mutation récessive par génétique moléculaire en remplaçant l'exon 21 du gène *Dicer1* par une cassette PGK-neo<sup>r</sup> (Figure 20A), supprimant le domaine RNaseIIIa et l'activité RNase de Dicer (Bernstein et al., 2003). Le croisement d'individus hétérozygotes a donné 26 homozygotes sauvages (*Dicer*<sup>+/+</sup>), 36 hétérozygotes (*Dicer*<sup>+/-</sup>) et 0 homozygotes mutants (*Dicer*<sup>-/-</sup>) indiquant une létalité embryonnaire. Au moins un allèle fonctionnel de *Dicer1* est donc nécessaire au développement embryonnaire. Plus précisément, le nombre d'embryons *Dicer*<sup>-/-</sup> au stade E7.5 ne représente que 50% de la proportion mendélienne attendue, suggérant que 50% des embryons *Dicer*<sup>-/-</sup> meure avant ce stade. Les 50% d'embryons *Dicer*<sup>-/-</sup> présents au stade de développement E7.5 sont plus petits que les *Dicer*<sup>+/+</sup> et présentent des anomalies morphologiques. L'absence d'expression de brachyury au stade E7.5 indique l'absence de détermination du mésoderme et suggère que le développement des embryons *Dicer*<sup>-/-</sup> est interrompu avant la gastrulation (Bernstein et al., 2003). L'invalidation de *Dicer1* dans l'ensemble de l'embryon a également été réalisée en croisant un mutant conditionnel

inductible de Dicer avec un mutant exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur du gène codant Actine exprimé dans la lignée germinale (Actin::Cre). Au stade E7.5, un phénotype similaire au mutant de Bernstein et al a été observé (Harfe et al., 2005).

## A Dicer mutants



## B Tyr::Cre



## C Tyr::CreERT2



### Figure 20. Mutants murins conditionnels de Dicer dans le lignage mélanocytaire

(A) Indication des exons codants les différents domaines de Dicer et représentation schématique de différents allèles mutants et floxés de Dicer chez la souris. La couleur des exons correspond au domaine qu'ils codent, PAZ (vert clair), RNaseIII (rouge), ou à l'absence de domaine (noir). Les triangles noirs indiquent les sites LoxP. (B) Schéma du transgène Tyr::Cre inséré sur le chromosome X murin. (C) Schéma du transgène Tyr::Cre-ERT2 dont le site d'insertion chez la souris est inconnu.

Afin d'étudier l'importance de Dicer dans le développement des différents organes, de nombreux mutants conditionnels ont été générés (Figure 20A). Les mutants conditionnels de *Dicer1* sont "floxés", c'est-à-dire que des séquences loxP exogènes ont été introduites dans la séquence du gène *Dicer1* endogène. Ces séquences sont généralement introduites dans des introns afin de ne pas altérer la protéine chez le mutant floxé. Ces séquences sont reconnues par la recombinaise Cre exogène qui catalyse la recombinaison des deux sites loxP et induit

l'excision de la séquence flanquée. L'invalidation de *Dicer1* dans un type cellulaire particulier est réalisée grâce à un mutant possédant le transgène permettant d'exprimer la recombinaise Cre sous le contrôle d'un promoteur spécifique de ce type cellulaire (Figure 20B). Dans le cas d'une induction temporelle, une recombinaise Cre inducible (Cre-ERT2) peut être utilisée. Cette recombinaise Cre-ERT2 est couplée à un récepteur aux œstrogènes (ER), et peut être activée par un analogue des œstrogènes, le tamoxifène, administré de façon locale ou systémique à la souris (Figure 20C).

La génération d'un double mutant possédant l'allèle floxé de *Dicer1* et exprimant la recombinaise Cre spécifiquement dans un type cellulaire induit l'invalidation de *Dicer1* spécifiquement dans ce type cellulaire. Le gène codant Dicer possédant 26 exons codants, il est difficile de floxer la totalité du gène. Différents allèles floxés ont été produits (Figure 20A) et ciblent généralement les domaines RNaseIII qui contiennent le site catalytique. L'expression de la protéine Dicer peut être observée mais la protéine produite est inactive. Dans la plupart des cas, un niveau réduit mais non nul de protéine a été observé. Les mutants conditionnels de *Dicer1* chez la souris ont ainsi montré que Dicer est nécessaire au développement normal de nombreux lignages cellulaires tels que les cellules issues du mésoderme (Harfe et al., 2005), les neurones (Nowakowski et al., 2013, Pang et al., 2014, Saurat et al., 2013), les kératinocytes (Andl et al., 2006, Lyle et al., 2014, Yi et al., 2006) et les cellules T (Cobb et al., 2005).

Dans l'épiderme, deux types de mutants ont été générés. L'utilisation du mutant K14::Cre a permis d'invalider *Dicer1* dans les kératinocytes de la lame basale. Une étude a utilisé un allèle de Dicer floxé pour les exons 22 et 23 (Murchison et al., 2005), l'autre a utilisé un allèle floxé pour l'exon 22 (Yi et al., 2006). Dans les deux cas, des défauts de morphogénèse des follicules pileux ainsi que des évaginations du derme ont été observés indiquant le rôle crucial de Dicer dans la différenciation des kératinocytes basaux en cellules folliculaires (Andl et al., 2006, Yi et al., 2006). L'utilisation du mutant K5::Cre a permis d'invalider *Dicer1* dans l'ensemble des kératinocytes de l'épiderme. Si les souris mutantes *Dicer*<sup>Δex18-20/Δex18-20</sup> sont semblables aux souris contrôles *Dicer*<sup>+/+</sup> à la naissance, les souris mutantes commencent à perdre leur pelage à partir de la 5<sup>e</sup> semaine, au cours du premier cycle pileux adulte, et meurent prématurément à partir du 6<sup>e</sup> mois avec 80% de décès à 20 mois. La perte du pelage s'accompagne d'anomalies de morphologie de l'épiderme et d'une augmentation du marquage γH2AX caractéristique des dommages DSB de l'ADN. Cette

étude montre le rôle de Dicer dans l'homéostasie des kératinocytes de l'épiderme adulte et dans la protection des dommages de l'ADN (Lyle et al., 2014).

Chez l'Homme, en 2009, des mutations germinales inactivatrices dominantes dans le gène *DICER1* ont été associées à la formation de blastomes pleuropulmonaires (BPP), cancer rare de l'enfant. Les mutations ponctuelles, insertions ou délétions, observées dans 11 familles induisent l'expression d'une protéine Dicer tronquée ou probablement inactive et sont associées au développement de BPP (Hill et al., 2009). Le syndrome DICER1 se caractérise par un risque accru de développer des tumeurs bénignes ou malignes principalement dans les poumons (BPP), les reins (néphrome kystique), les ovaires (tumeur à cellules de Sertoli-Leydig), et la thyroïde (goitre multinodulaire). La transmission du syndrome est autosomale dominante mais la fréquence des mutations de *DICER1* dans la population et la pénétrance du syndrome sont peu connues. La pénétrance serait relativement faible, probablement proche de 50% chez les femmes et 20% chez les hommes (Foulkes et al., 2014).

### 3.4.2. Dicer dans le développement du lignage mélanocytaire

L'inactivation de *Dicer1* dans les cellules des crêtes neurales précurseurs des mélanoblastes a été réalisée avec le mutant exprimant l'allèle de *Dicer1* floxé pour l'exon 22 (Yi et al., 2006) et le mutant *Wnt1::Cre* spécifique des cellules migrant des crêtes neurales (Danielian et al., 1998). Les mutants *Dicer1*<sup>Δex22/Δex22</sup> sont létaux à la naissance. Des malformations des DRG et des ganglions sympathiques, des défauts de développement du cerveau ainsi que des structures squelettiques du crâne sont observés chez les embryons mutants par rapport aux contrôles, alors que le squelette dérivant du mésoderme est présent. Ce phénotype est associé à une augmentation de l'apoptose marquée par TUNEL dans les cellules du cerveau et des DRG (Huang et al., 2010). Le développement des cellules du lignage mélanocytaire dérivant des crêtes neurales et des DRG n'a pas été évoqué dans cette étude.

L'inactivation de *Dicer1* dans les mélanoblastes au stade E10.5 a été réalisée avec le mutant exprimant l'allèle de *Dicer1* floxé pour l'exon 23 (Harfe et al., 2005) et le mutant *Tyr::Cre* spécifique du lignage mélanocytaire embryonnaire et des mélanocytes différenciés adultes (Delmas et al., 2003). Les souris *Dicer1*<sup>Δex23/Δex23</sup> sont hypopigmentées à la naissance et totalement blanches à 1 mois alors que les souris *Dicer1*<sup>Δex23/+</sup> sont noires. Ce phénotype est dû à l'absence de mélanocytes, rapportée par l'absence de marquage spécifique des mélanocytes (MITF et *Dct::LacZ*) à P42. Les souris mutantes *Dicer1*<sup>Δex23/Δex23</sup> semblent plus petites que les souris contrôles, bien que ce point ne soit pas soulevé par les auteurs. Les

mutants *Dicer1* <sup>$\Delta$ ex23</sup> ont également été croisés avec des mutants *Dct::Cre* (Guyonneau et al., 2004) et *Tyr::CreER*<sup>T2</sup> (Bosenberg et al., 2006). Les souris (*Dct::Cre* ; *Dicer1* <sup>$\Delta$ ex23/ $\Delta$ ex23</sup>) présentent une hypopigmentation hétérogène avec des zones blanches à la naissance, suivie d'une dépigmentation progressive. Les souris (*Tyr::CreER*<sup>T2</sup> ; *Dicer1* <sup>$\Delta$ ex23/ $\Delta$ ex23</sup>) traitées par application locale de 4-OH-tamoxifène de P2 à P5 présentent une hypopigmentation hétérogène avec des zones blanches à P32, associée à une absence de mélanocytes rapportée par l'absence de marquage S100 (Levy et al., 2010). *In vitro*, la diminution du niveau de *Dicer* par transfection d'un siARN dans des mélanocytes humains primaires induit une augmentation du marquage TUNEL, caractéristique de l'apoptose, et la perte de ces mélanocytes en 6 jours (Levy et al., 2010).

Chez l'Homme, les mutations inactivatrices dominantes dans le gène *DICER1* ne sont pas associées à un phénotype pigmentaire. Cette observation s'explique par le fait que, chez la souris, seuls les mutants homozygotes de *Dicer1* présentent une hypopigmentation alors que les hétérozygotes présentent une pigmentation sauvage. Chez l'Homme, l'inactivation des deux allèles de *DICER1* dans la lignée germinale est probablement létale, comme observé chez la souris. Cependant, le niveau de *DICER* a été corrélé à l'évolution de différents cancers dont le mélanome. Le niveau cytoplasmique de *DICER* est réduit dans 135 mélanomes métastatiques par rapport aux 30 nævi bénins (Jafarnejad et al., 2013). A l'inverse, une autre étude a montré que le niveau protéique de *DICER* est plus important dans 223 mélanomes cutanés ou métastatiques que dans 71 nævi. La forte expression de *DICER* est associée à des formes progressives de mélanomes avec invasion et métastases (Ma et al., 2011). Une troisième étude a révélé l'absence de variation du niveau cytoplasmique de *DICER* entre les différents stades de progression des mélanomes sur une cohorte de 341 mélanomes (Cheng et al., 2015). Les résultats contrastés de ces analyses corrélatives reposent sur des protocoles différents de groupement des lésions, de marquage de *DICER* et d'analyse des marquages, qui ne permettent pas de conclure pour l'instant sur le rôle de *DICER* dans le mélanome. Il est également possible que les contradictions reposent sur la faible corrélation entre niveau d'ARN, niveau de protéine et activité de *DICER*, évoquée dans la partie 3.3.1.



#### 4. Présentation du projet de la thèse

Le lignage mélanocytaire est constitué (i) des mélanoblastes qui dérivent des crêtes neurales, (ii) du *pool* de cellules souches mélanocytaires mis en place à la naissance, (iii) des mélanocytes différenciés et (iv) des éventuelles cellules de mélanome, dans un état transformé malin. Chez les Mammifères adultes, les mélanocytes différenciés sont présents principalement dans la peau au niveau de l'épiderme et du follicule pileux. Les mélanocytes sont les cellules de la pigmentation et du stress. La fonction principale des mélanocytes cutanés est la synthèse de la mélanine dans des organites spécialisés, les mélanosomes, qui sont transmis aux kératinocytes, conduisant à la pigmentation de la peau, des poils et des yeux. Les mélanocytes protègent les cellules environnantes des stress chimiques (ex: rôle de la mélanine de protection contre les ROS), biologiques (ex: fonction phagocytaire des mélanocytes), et physiques (ex: rôle de la mélanine de protection contre les UV).

Dans la peau, la mélanine protège les kératinocytes des rayonnements ultraviolets. Les modifications cellulaires induites par les UV solaires sont des dimères de pyrimidines et des dommages oxydatifs qui induisent un stress génotoxique et oxydatif. La réponse des cellules à ces stress est complexe et régule la progression du cycle cellulaire, la réparation des dommages et la survie cellulaire orientant la cellule vers un équilibre entre formation de mutations et survie cellulaire. La signalisation induite par les UV solaires comporte une réponse rapide à court terme et une réponse plus lente à long terme qui dépendent de mécanismes moléculaires différents. La réponse rapide est basée sur la régulation de l'activité de protéines déjà présentes, par modifications post-traductionnelles. La réponse lente correspond aux modifications transcriptionnelles, conséquences de la réponse rapide. Les UV activent des voies de signalisation spécifiques aux mélanocytes qui conduisent à deux phases d'augmentation de la synthèse de mélanine à court terme et à long terme.

Dicer est une protéine clef de la biogenèse des microARN. Une variation fine de son activité est susceptible de moduler l'expression de nombreux microARN et ainsi de nombreux gènes, ce qui en fait une protéine idéale de la réponse au stress. L'expression et l'activité de Dicer sont en effet régulées par différents stress. La régulation de Dicer dépend de son niveau d'ARNm, de protéine, sa localisation et son activité. Cette protéine est ubiquitaire et nécessaire au développement embryonnaire ainsi qu'à la mise en place du lignage mélanocytaire. Cependant son rôle dans le maintien, le renouvellement et l'homéostasie du lignage mélanocytaire adulte n'est pas décrit. Notre projet a pour objectif de comprendre le

rôle et la régulation de Dicer dans le lignage mélanocytaire dans des conditions normales, ainsi que dans des conditions de stress UVB.

Nous avons supposé que le rôle essentiel de Dicer dans le développement des mélanoblastes est différent de sa fonction dans les McSC, les TAC et mélanocytes différenciés chez l'adulte. Des études ont suggéré que Dicer induit l'apoptose des mélanoblastes embryonnaires, nous avons décidé d'étudier le rôle de Dicer dans le maintien, le renouvellement, la migration et la différenciation du lignage mélanocytaire adulte *in vivo* et *in vitro*. La régulation transcriptionnelle de Dicer dans le lignage mélanocytaire est peu connue. Afin d'envisager les signaux susceptibles d'affecter le niveau de Dicer dans les mélanocytes, nous avons analysé les voies impliquées dans la régulation de Dicer dans le lignage mélanocytaire *in vitro*. Cette partie a abouti à montrer l'implication de  $\beta$ -caténine dans la répression transcriptionnelle de Dicer.

Si Dicer est régulé par différents stress, sa régulation par les UV dans le lignage mélanocytaire n'a pas été démontrée. Nous avons fait l'hypothèse que les voies de régulation de Dicer mises en évidence dans le lignage mélanocytaire sont induites par les UVB et participent ainsi à la régulation de Dicer par les UVB et à son rôle dans la réponse au stress. La régulation de  $\beta$ -caténine par les UVB a d'abord été envisagée. Sachant que l'activité de  $\beta$ -caténine est fortement liée à sa localisation,  $\beta$ -caténine est un candidat potentiel dans la réponse rapide aux stress, en particulier UV. Dans cette étude, la localisation de  $\beta$ -caténine en réponse aux UVB a été analysée *in vivo* et *in vitro* ainsi que son activité transcriptionnelle, nécessaire à la régulation de Dicer. Nous avons ensuite analysé la régulation transcriptionnelle et le rôle de Dicer dans les mélanocytes soumis à un stress UVB.



## MATERIELS ET METHODES



## MATERIELS ET METHODES

### Modèles de souris et traitement au tamoxifène

Toutes les souris ont un fond génétique C57BL/6J et sont hébergées en zone agréée exempte d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS). Les expériences ont été réalisées suivant les recommandations du Ministère de l'Education nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt par des concepteurs de projets formés (Niveau B, ex-niveau 1).

Des croisements successifs de souris ont permis d'obtenir des souris (Tyr::Cre/<sup>o</sup> ; Dicer F/F) qui possèdent les deux allèles du gène *Dicer1* floxés (Murchison et al., 2005) et le transgène Tyr::Cre dont la recombinaison Cre est exprimée sous le contrôle du promoteur de la Tyrosinase (Delmas et al., 2003). Chez ces souris, le gène *Dicer1* est invalidé spécifiquement dans le lignage mélanocytaire à partir du jour embryonnaire E9.5-10.5 par délétion des exons 22 et 23. D'après les publications utilisant ce mutant de Dicer, il est possible qu'un faible niveau de la protéine Dicer soit présent dans les cellules, mais le site RNaseIII est inactif et l'activité RNase est supprimée. Les souris (Tyr::Cre/<sup>o</sup> ; DicerF/F) sont utilisées dans nos expériences, ainsi que leurs contrôles (Tyr::Cre/<sup>o</sup> ; Dicer F/+), (Tyr::Cre/<sup>o</sup> ; Dicer +/+) et (<sup>o/o</sup> ; Dicer F/F). L'observation de la couleur de la robe, rapportée par des photographies, a été effectuée à la naissance et pendant la vie normale de la souris adulte.

Par croisements successifs, les souris (Tyr::Cre-ERT2 ; Dicer F/F) ont également été générées. Elles possèdent les deux allèles du gène *Dicer1* floxés et le transgène Tyr::Cre-ERT2 dont la recombinaison Cre inactive est exprimée sous le contrôle du promoteur de la Tyrosinase (Yajima et al., 2006). Dans ces souris, l'activation de la recombinaison Cre a été induite à la naissance grâce à un analogue des œstrogènes, le tamoxifène. Le traitement au tamoxifène a été réalisé d'après le protocole publié précédemment (Pitulescu et al., 2010) par injection intragastrique de 50 µg par jour de tamoxifène (Sigma T5648) dilué dans de l'huile de maïs (Sigma C8267) à 1 mg/mL aux jours P1, P2 et P3. L'observation de la couleur de la robe a été effectuée au cours des jours suivant le traitement et pendant la vie normale de la souris adulte, et des photographies ont été réalisées à trois semaines et à dix semaines.

A trois semaines, les photographies et prélèvements de poils ont été effectués sur souris en contention. Chez l'adulte, les photographies, les prélèvements de poils, les épilations et les biopsies de peau ont été effectués sur souris endormies à l'isoflurane.

### **Analyse du génotype des souris**

Le génotype des souris est analysé par PCR sur l'ADN extrait d'un bout de queue digéré par la protéinase K (Roche 03115844001) suivant le Tableau 3. Les PCR d'amplification du transgène Tyr::Cre-ERT2, de l'allèle floxé de *Dicer1* et de l'allèle défloxe de *Dicer1* sur l'ADN extrait du follicule pileux suivent un protocole particulier. Les souris anesthésiées à l'isofluorane sont épilées à la cire avec un mélange 1:1 de cire d'abeille (Sigma 243221) et de gum rosin (Sigma R3755). Treize jours plus tard, des poils sont prélevés sur la région épilée et digérés par la protéinase K. La PCR est ensuite réalisée sur l'ADN extrait avec les amorces LL2585 et LL2256 (Tableau 3).

### **Irradiation UVB in vivo**

Les irradiations UVB ont été réalisées avec une lampe VL-330 émettant un spectre continu de 250 à 400 nm et un pic d'émission à 313 nm. La dose de notre système d'UV a été mesurée par le Laboratoire Nationale de Métrologie et d'Essais (LNE – France). D'après la distribution du spectre d'énergie de la source UV mesurée à 23 cm de la lampe, l'éclairement énergétique spectrique contient environ 70% d'UVB, 29,9% d'UVA, et une très faible part d'UVC à la limite UVC-UVB (0,1%). Le spectre issu de la source UV est représenté en Figure 21. Des expositions d'environ 10 et 40 secondes sont nécessaires pour des irradiations de 25 et 100 mJ/cm<sup>2</sup> respectivement. Ce temps est contrôlé avant chaque exposition grâce à un radiomètre IL1700 (Vilber Lourmat 51300011) pourvu d'un capteur à 312 nm (Vilber Lourmat 51900002).

Les souris C57BL/6J, fournies par Charles River France, ont été croisées avec des souris homozygotes Dct::LacZ (MacKenzie et al., 1997) pour marquer le lignage mélanocytaire. Les nouveau-nés (P1) hétérozygotes sont immobilisés sur une boîte en plastique et irradiés avec 100 mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB majoritairement sur le dos. Les nouveau-nés contrôles sont traités de la même manière mais sans irradiation. Les souris sont sacrifiées 15h après irradiation selon les règles éthiques, avant de prélever la peau du dos. Pour séparer le derme de l'épiderme, les échantillons de peau sont incubés pendant 30 min à 37°C dans une solution de 2,5% de trypsin (Gibco) puis dissociés mécaniquement sous le microscope. Pour les extractions d'ARN, le derme et l'épiderme sont congelés séparément dans l'azote liquide.

### **Préparation des échantillons de peau et de poils**

Pour les prélèvements de peau de souriceaux, l'injection de BrdU est réalisée par deux injections intragastriques de 50 µg/g de souris 3h avant sacrifice et prélèvement de la peau du dos. Pour les biopsies de peau, les souris adultes sont épilées sur le coté gauche du dos ou du ventre à dix semaines sous anesthésie à l'isofluorane, puis dix jours plus tard (anagène tardive du cycle pileux), une biopsie de 0,25 cm<sup>2</sup> (0,5 cm x 0,5 cm) est réalisée sous anesthésie, sur la région épilée. La blessure est refermée par suture de 3 à 4 points avec du fil en Vicryl (Ethicon JV1012). Les biopsies sont étalées sur une feuille de papier Wattman pour que la peau ne s'enroule pas sur elle-même. Après rinçage avec du PBS froid, les échantillons de peau sont fixés pendant la nuit dans du paraformaldéhyde 4% en PBS. Après fixation, les échantillons sont rincés dans du PBS et plongés pour une nuit dans du sucrose 30% en PBS. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 8h dans une solution de sucrose 30% - OCT 50% en PBS. L'inclusion est réalisée dans des cassettes remplies d'OCT (VWR 00411243) par congélation dans des vapeurs d'azote liquide, en plaçant la peau dans la bonne orientation pour permettre des coupes longitudinales de follicules pileux. Les blocs d'OCT contenant les échantillons sont conservés à -80°C en attendant les cryosections.

Pour les prélèvements de poils, les souris sont anesthésiées à l'isofluorane et les poils du coté droit du dos ou du ventre sont prélevés à l'aide d'une pince coudée pour arracher l'ensemble du poil et du follicule pileux. Pour les photographies, les poils sont montés individuellement et suffisamment espacés dans du glycérol 10% entre lame et lamelle. Les photographies sont réalisées avec un microscope en lumière de plein champ aux grossissements 10X et 40X (Berlin et al., 2012).

### **Immunohistofluorescence sur cryosections de peau**

Les marquages de peau sont effectués sur des coupes longitudinales de peau de 10 µm d'épaisseur afin d'observer l'ensemble du follicule pileux. Les sections sont réalisées à partir des blocs d'OCT contenant les échantillons de peau, au cryostat de la plateforme d'Histologie de l'Institut Curie d'Orsay sur des lames SuperFrost Plus (Fisher Scientific 12-550-15), conservées jusqu'à un mois à -80°C.

Pour le marquage, les lames conservées à -80°C sont rincées trois fois 10 min en PBS 1X – 0,2 % Tween 20 (PBST). Un démasquage de l'antigène est réalisé par incubation des lames dans du tampon citrate bouillant pendant 20 min. Les lames sont rincées dans du PBST avant blocage dans 2 % BSA (Sigma A9418) en PBST pendant 1h à température ambiante.

Les lames sont incubées en chambre humide avec l'anticorps primaire anti-DCT (Tableau 4) dilué en PBST à 4°C pendant la nuit. Les lames sont ensuite rincées dans du PBST puis incubées à température ambiante, en chambre humide, et dans le noir, pendant 1h, avec les anticorps secondaires Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 555 (Tableau 4) et le DAPI (1:5000) dilués en PBST. Les lames sont rincées avec du PBST, montées en milieu de montage Vectashield (Vector Laboratoire) et scellées avant d'observer le marquage au microscope à épifluorescence ou au microscope confocal (Berlin et al., 2012). Les images sont analysées sous ImageJ ou Adobe Photoshop.

### **Culture cellulaire, transfection et traitements**

Les mélanocytes murins Melan-a ont été donnés par D. Bennett (Bennett et al., 1989) et sont cultivés en milieu F12 (Gibco 21765) complété par 10% de sérum de veau fœtal (FBS Eurobio CVFSVF00-01), 1% d'antibiotiques (Penicilline/Streptomycine, Gibco 15140-122) et 200 nM de TPA (tetradecanoyl phorbol acetate, Sigma P8139). Les cellules de mélanome humain MNT-1 et Lu1205 sont cultivées en milieu RPMI-1640 (Gibco 21875) complété par 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotiques. Les fibroblastes NIH3T3 et kératinocytes XB2 murins sont cultivés en milieu DMEM (Gibco 41965) complété par 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotiques. Toutes les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

La transfection transitoire des cellules avec un plasmide (Tableau 5) ou un siARN (Tableau 6) est effectuée grâce à la Lipofectamine 2000 (Invitrogen 11668019). Les cellules sontensemencées dans des plaques de 12 puits (TPP 92012) pour atteindre environ 70% de confluence après 24h. Le lendemain, la transfection est effectuée avec 2µl de Lipofectamine par puits pour un maximum d'1 µg de plasmide et de 100 nM de siARN dans un milieu sans antibiotique. Après 6h d'incubation, la Lipofectamine est retirée et le milieu est remplacé par du milieu de culture complet correspondant à la lignée cellulaire.

Pour le traitement des cellules avec des inhibiteurs pharmacologiques, les inhibiteurs sont resuspendus dans du DMSO à 10mM suivant les instructions du fournisseur. Le milieu des cellules est retiré et remplacé par une solution d'inhibiteur dissout dans du milieu complet à la concentration finale désirée (Tableau 7). Les cellules sont incubées avec cette solution, à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, pendant 6h ou 24h suivant l'inhibiteur.

## Plasmides

Les différents plasmides transfectés dans les cellules sont listés dans le tableau 5. Pour les constructions #SH, #C, #E, #ΔTCFa,b,c, #SK, #B et #D, les promoteurs ont été générés par digestion du promoteur de 2,5kb (Full dicer) avec les enzymes de restriction suivantes : AflII-HindIII, NcoI-HindIII, EcoRI-HindIII, SacII-HindIII, AflII-KpnI, NcoI-KpnI et EcoRI-KpnI. Ces promoteurs ont été insérés dans le vecteur pGL3 digéré avec SmaI et HindIII ou KpnI. Pour les constructions #EΔFOXO1, #EΔTCFa, #EΔSOX9, #EΔTCFb, #EΔTCFc, #ΔTCFa,b et #EΔTCFb,c, les promoteurs ont été générés par mutagenèse dirigée sur le promoteur Full dicer. Ces promoteurs, digérés avec EcoRI et SacII, ont été insérés dans le vecteur Full dicer digéré avec EcoRI et SacII.

## Irradiation UVB *in vitro*

L'irradiation *in vitro* est réalisée sur des cellules en culture à 80% de confluence. Le milieu est retiré et conservé, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS +  $\text{Ca}^{2+}$  +  $\text{Mg}^{2+}$  à température ambiante puis les cellules sont incubées dans un volume de PBS +  $\text{Ca}^{2+}$  +  $\text{Mg}^{2+}$  correspondant à la moitié du volume de milieu, le temps de l'irradiation. Le couvercle en plastique est retiré et les cellules sont exposées aux UVB pendant un temps déterminé précédemment pour une dose de 25 mJ/cm<sup>2</sup> ou 100 mJ/cm<sup>2</sup>. Le PBS +  $\text{Ca}^{2+}$  +  $\text{Mg}^{2+}$  est retiré et remplacé par le milieu conservé avant irradiation, puis les cellules sont incubées à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> pour la suite de l'expérience. Les cellules contrôles reçoivent le même traitement mais sans l'irradiation.

## Dosage de la mélanine

La quantification de la mélanine a été effectuée sur les cellules en culture et sur les poils de souris. Après collection,  $5 \cdot 10^5$  cellules sont centrifugées et le culot est resuspendu dans 1mL de NaOH 1M. Après pesée, 1mg de poils est resuspendu dans 1mL de NaOH 1M. En parallèle, 1mg de mélanine synthétique (Sigma) est resuspendu dans 1mL de NaOH 1M pour réaliser une gamme étalon diluée en NaOH. La digestion dans le NaOH 1M est réalisée par incubation pendant 4h à 85°C. Après centrifugation à 12 000 rpm pendant 10 min, l'absorbance du surnageant est mesurée à 475 nm et comparée à l'absorbance de la gamme étalon pour déduire la concentration en mélanine (Berlin et al., 2012).

### **Tests de migration et d'invasion *in vitro***

Le test de migration *in vitro* consiste à suivre la migration des cellules isolées sur un support plastique. Les cellules sontensemencées dans des plaques de 6 puits à raison de 50 000 cellules par puits puis incubées pendant 5h à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> pour qu'elles adhèrent au plastique. Les cellules sont ensuite photographiées au microscope à contraste de phase de façon automatisée toutes les 4 minutes pendant 12h. L'analyse est ensuite effectuée grâce au programme iTrack4U (Cordelieres et al., 2013).

Le test d'invasion inversée dans du Matrigel est réalisé en préparant une matrice de Matrigel (5 mg/mL) dans des transwell puis en déposant 50 000 cellules sur le transwell inversé. Les cellules invasives traversent ainsi le transwell et doivent ensuite envahir le Matrigel. Après 4h d'incubation, le transwell est retourné dans sa position normale et incubé dans du milieu complet pendant 4 jours. L'analyse du nombre de cellules invasives est réalisée par marquage des cellules à la calcéine puis photographie au microscope confocal de stacks de 15 µm. Les cellules sont considérées invasives lorsqu'elles passent le seuil des 45 µm de Matrigel, le pourcentage de cellules invasives est calculé en faisant le rapport des intensités de marquage calcéine après et avant le seuil de 45 µm.

### **Extraction d'ARN et PCR quantitative en temps réel**

L'ARN total est extrait à partir des cellules en culture, de l'épiderme ou du derme de nouveau-nés murins grâce à un kit RNeasy d'après les instructions du fournisseur. La concentration de l'ARN extrait est quantifiée avec un lecteur Nanovue (GE Healthcare Life Sciences) avant de réaliser la transcription reverse (RT-PCR) afin d'obtenir des ADNc. La RT-PCR est réalisée à partir d'1 µg d'ARN total avec la transcriptase reverse M-MLV (Invitrogen 28025-013) d'après les instructions du fournisseur. La réaction de PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) est réalisée sur les ADNc obtenus avec les amorces spécifiques du gène à amplifier (Tableau 3) et un SYBR Green Supermix (Bio-Rad) dans une machine qPCR (Applied Biosystem 7900). Le profil de la réaction utilisée est le suivant : 90s à 95°C; (30s à 95°C; 60s à 60°C) x 40. Les résultats sont standardisés par rapport au gène de ménage *GAPDH* chez l'Homme et *Hprt* chez la souris puis la quantité relative de chaque transcrit est normalisée par rapport au contrôle de l'expérience par la méthode  $\Delta\Delta C_t$ . Les valeurs obtenues pour une expérience biologique représentent la moyenne de deux répliques techniques et chaque résultat final représente la moyenne d'au moins trois répliques biologiques.



### **Immunoprécipitation de la chromatine**

Les expériences de ChIP ont été réalisées comme décrites précédemment (Aktary and Pasdar, 2013, Peng and Jahroudi, 2003). Un culot de  $2.10^7$  cellules est resuspendu dans du milieu de culture complété par du formaldéhyde à 1% (Fisher) pour fixation pendant 10 min à température ambiante. La fixation est interrompue par ajout de glycine (125 mM final). Après rinçage au PBS, les cellules sont lysées (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT et 0.49 mM PMSF) 15 min sur glace. Du NP-40 (0,6% final) est ajouté et les cellules sont vortexées pendant 10s puis centrifugées à 18 000 g pendant 30s. Les cellules sont soniquées quatre fois 1 min à 10% dans du tampon de sonication (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH8, 0.49 mM DTT et 0.02 µg/mL aprotinine et leupeptine). La chromatine soniquée est resuspendue dans du tampon de dilution au 1/10 (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris pH 8, 167 mM NaCl). Un extrait de 50 µl est conservé comme contrôle "Input". Après ajout de 40 µl de billes d'agarose A/G (Calbiochem), l'échantillon est incubé 2h à 4°C en rotation. Après centrifugation, le surnageant est divisé en plusieurs aliquots utilisés pour différentes immuno-précipitations. Chaque aliquot est incubé pendant la nuit en rotation à 4°C avec 5 µg d'anticorps (Tableau 4) et 40 µl de billes d'agarose A/G (Calbiochem) préalablement lavées (incubation rotative pendant la nuit à 4°C avec de l'ADN de sperme de Saumon en BSA). Après centrifugation à 420 g à 4°C, le surnageant est retiré et les billes sont rincées successivement six fois 5 min dans quatre tampons: W1 (1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM Tris pH 8, 167 mM NaCl), W2 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl), W3 (250 mM LiCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA) et W4 (10 mM Tris pH 8 and 1 mM EDTA). Le complexe ADN-protéine est ensuite élué par incubation 15 min dans un tampon d'élution (1% SDS and 50 mM NaHCO<sub>3</sub>), suivie d'ajout de RNase (1 µg) et NaCl (300 mM final) et incubation 4h à 65°C, puis d'ajout de Tris (pH 6.8, 40 mM final), EDTA (10 mM final) et protéinase K (4 µg) et incubation 2h à 45°C. Les échantillons sont ensuite purifiés avec le kit PCR Purification (Qiagen) et utilisés pour la PCR (Tableau 3).

### **Mesure de l'activité luciférase relative**

Pour les tests luciférase, les cellules sontensemencées dans des plaques de 12 puits, puis co-transfectées avec 250 µg de plasmide rapporteur exprimant la luciférase *Firefly* et 250 µg de plasmide TK::Renilla exprimant la luciférase *Renilla*, utilisée comme contrôle interne, et,

suivant les expériences, avec un siARN ou le plasmide  $\beta$ -caténine-NLS. Les cellules sont lysées 48h après transfection avec un tampon de lyse passif fourni (Passive Lysis Buffer, Promega) avant de déterminer les activités luciférase Firefly et Renilla par réaction avec des substrats luminescents du kit Dual Luciferase Reporter Assay (Promega E1980). L'activité luciférase *Firefly* de chaque extrait est rapportée à l'activité luciférase *Renilla* correspondante, puis normalisée par rapport à la valeur de la condition contrôle de l'expérience.

### **Extraction protéique et western blot**

Le lysat protéique de cellules en culture est extrait grâce à un tampon RIPA complété avec des inhibiteurs de protéases (Complete, Roche 118735 80001) et de phosphatases (PhoStop Roche 04 906 837 001). La concentration protéique est déterminée par un test BCA (Sigma D8284) ou un test Bradford (BioRad 500-0006), avant de diluer l'échantillon dans un tampon de charge dénaturant (DTT 50mM final) incubé 10 min à 95°C. Entre 5 et 50  $\mu$ g de protéines sont migrées sur un gel SDS-PAGE d'acrylamide 10 % (6% pour Dicer). Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare 10 6000 001) par transfert à 90 V pendant 90 min (39V pendant 16h pour Dicer). Après rinçage en solution de TBS – 0,01% Tween-20 (TBST), la membrane est bloquée par incubation dans une solution de 5% lait en TBST (protéines totales) ou de 5% BSA en TBST (Dicer humain, protéines phosphorylées) ou de 5 % BSA – 1 % lait en TBST (Dicer murin) pendant 1h à température ambiante. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage à la concentration indiquée (Tableau 4) à 4°C pendant la nuit. Après rinçage en TBST, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire associé à la Peroxidase Horseradish (HRP) dilué dans la solution de blocage au 1:20 000 pendant 1h à température ambiante. Le signal est détecté par réaction chimiluminescente avec l'ECL (Thermo Scientific 34077). Les anticorps et dilutions utilisés sont indiqués dans le Tableau 4. L'actine, la tubuline ou la vinculine sont utilisées comme contrôle de charge.

### **Immunomarquage sur cellules en culture**

Les immunomarquages des CPD ont été réalisés par immunofluorescence ou par ELISA d'après les deux protocoles donnés par le fournisseur (Cosmo Bio).

Pour l'immunofluorescence, les cellules sont ensemencées sur lamelles en verre de 18 mm de diamètre et subissent différents traitements suivant l'expérience. A la fin de l'expérience, les cellules sont fixées avec une solution de 4% PFA en PBS pendant 20 min à

température ambiante. Chacune des étapes du protocole est suivie d'un rinçage PBS. Les cellules sont perméabilisées avec une solution de 0,5% Triton X-100 en PBS pendant 5 min sur glace. L'ADN est dénaturé par incubation dans une solution d'HCl 2 M pendant 30 min à température ambiante. Les cellules sont bloquées avec une solution de 20% FBS en PBS pendant 1h à température ambiante puis incubées avec l'anticorps primaire anti-CPD (clone TDM-2 Tableau 4) dilué au 1:2000 dans une solution de 5% FBS en PBS pendant 2h à température ambiante. Les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-mouse alexa 555 (Tableau 4) dilué au 1:500 dans une solution de 5% FBS en PBS pendant 1h à température ambiante. Les cellules sont incubées dans une solution de DAPI 1:5000 en PBS pendant 15 min à température ambiante. Les lamelles sont montées sur lames en milieu de montage Vectashield (Vector Laboratoire) et scellées avant d'observer le marquage au microscope à épifluorescence. Les images sont analysées et montées sous ImageJ ou Adobe Photoshop.

Pour l'ELISA, les cellules sontensemencées dans des plaques de 12 puits ou de 96 cm de diamètre et subissent différents traitements suivant l'expérience. A la fin de l'expérience, les cellules sont récoltées dans du PBS froid à l'aide d'un grattoir puis centrifugées à 10 000 rpm pendant 15s à 4°C avant de congeler le culot sec à -80°C. Le protocole d'ELISA utilise des plaques de 96 puits (PVC microtiter plate, Thermo Scientific 2801) recouvertes d'une couche de protamine sulfate qui permet de fixer l'ADN. La préparation de ces plaques se fait par incubation de 50 µl par puits d'une solution de 0,003% de protamine sulfate à 37°C pendant la nuit, jusqu'à évaporation totale suivie d'un rinçage à l'eau distillée. L'extraction d'ADN est réalisée à partir du culot sec grâce au kit NucleoSpin Tissu (Macherey-Nagel 740952.50) et la quantité d'ADN extrait est mesurée avec un lecteur Nanovue. L'ADN est dilué à une concentration de 0,2 µg/mL en PBS et dénaturé par ébullition à 100°C pendant 10 min suivi de 15 min dans la glace. L'ADN est réparti dans la plaque de 96 puits préparée à raison de 50 µl d'ADN par puits, 4 puits par échantillon, 4 puits avec du PBS sans ADN pour le contrôle négatif, et une gamme d'ADN irradiés pour le contrôle positif. La plaque est incubée à 37°C pendant la nuit, jusqu'à évaporation totale. L'ADN est rincé avec une solution de PBS – 0,05% Tween-20 (PBST), puis bloqué avec 150 µl/puits d'une solution de 2% FBS en PBS pendant 30 min à 37°C. Chacune des étapes du protocole est suivie d'un rinçage PBST. La plaque est incubée avec 100 µl/puits d'anticorps anti-CPD (Tableau 4) dilué au 1:2000 en PBS pendant 30 min à 37°C. La plaque est incubée avec 100 µl/puits d'anticorps secondaires anti-mouse couplé à la biotine (Invitrogen 62-6540) dilué au 1:2000 en PBS

pendant 30 min à 37°C. La plaque est incubée avec 100 µl/puits de Peroxidase-Streptavidin (Perkin FP1047) diluée au 1:10 000 en PBS pendant 30 min à 37°C. La plaque est rincée avec un tampon citrate-phosphate (pH 5.0) puis incubée avec une solution de substrat de la Peroxidase (40% *o*-Phenylene diamine en tampon Citrate-phosphate – 0,00007% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pendant 30 min à 37°C. La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 50µl/puits d'acide sulfurique 2M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). L'absorbance à 492 nm est mesurée grâce à un spectrophotomètre lecteur de plaque. La moyenne des quadruplicas, donnant la valeur d'absorbance de chaque échantillon, est normalisée par rapport à la valeur contrôle.

Le protocole de marquage par immunofluorescence de β-caténine est indiqué dans l'article inséré en partie 2.1 des résultats (Bertrand et al., 2017).

## Tableaux et figures des matériels et méthodes

ADN amplifié	Orientation	Oligonucléotide (séquence)	Code	Utilisation (PCR [programme], qPCR [concentration])	Produit amplifié (pb)
Tyr.:Cre	sens	5' GTCACCTCCAGGGGTGCTGG 3'	LL125	PCR [94°C 5 min; (94°C 30s; 60°C 30s; 72°C 45s) x 30; 72°C 10min]	473
	antisens	5' CCGCCGCATAACCAGTGA 3'	LL296		
Tyr.:CreERT2	sens	5' GAAGCAATCATCGATTG 3'	LL148	PCR [94°C 4min; (94°C 30s; 57°C 30s; 72°C 1min) x 30; 72°C 10min]	412
	antisens	5' TGAAGGGTCTGGTAGGATCA 3'	LL622		
Dicer flox / WT	sens	5' ATTGTTACCAGCGCTTAGAATTCC 3'	LL2254	PCR [94°C 3min; (94°C 30s; 60°C 30s; 72°C 45s) x 30; 72°C 5min]	Flox 767 / WT 560
	antisens	5' GTACGTCTACAATTGCTTAIG3'	LL2585		
Dicer deflox	sens	5' TCGGAATAGGAACCTTCGTTTAAAC 3'	LL2256	PCR [94°C 3min; (94°C 30s; 60°C 30s; 72°C 45s) x 30; 72°C 5min]	429
	antisens	5' GGGAGGTGTACGTCTACAATT 3'	LL2585		
Dct.:LacZ	sens	5' CAGGACACGGCTTGTCTATCATGGTGT 3'	LL999	PCR [94°C 5min; (94°C 30s; 62°C 30s; 72°C 45s) x 30; 72°C 10min]	530
	antisens	5' CATTCAATCCTCTCTCAGGAATTCA 3'	LL1000		
hDicer cDNA	sens	5' CAAATTTAGCCCGGCTGAGAG 3'	LL1887	qRT-PCR [300 nM]	106
	antisens	5' GGCAATCCTGTAACCTCGACCA 3'	LL1888		
mDicer cDNA	sens	5' AGCATGGCAGGCCTCGAC 3'	LL1795	qRT-PCR [300 nM]	224
	antisens	5' TGATGGGCCAGCTCTTTGG 3'	LL1786		
hGAPDH cDNA	sens	5' AGAAGGCTGGGGCTCATTTG 3'	LL1727	qRT-PCR [300 nM]	258
	antisens	5' AGGGGCCATCCACAGTCTTC 3'	LL1728		
mGapdh cDNA	sens	5' ACCCAGAAGACTGTGGATGG 3'	LL778	qRT-PCR [300 nM]	171
	antisens	5' CACATTGGGGGTAGGAACAC 3'	LL779		
mHprt cDNA	sens	5' CAAGCTTGCTGGTGAAAAGGA 3'	LL1615	qRT-PCR [300 nM]	186
	antisens	5' TCGCTCATCTTAGGCTTTGTA 3'	LL1616		
hDicer promoteur	sens	5' GCAAACGCCTCTCCGGCCTC 3'	LL2367	PCR (ChIP) [94°C 5 min; (94°C 30s; 60°C 45s; 72°C 45s) x 40; 72°C 10min]	140
	antisens	5' GGCATGAGAGCGAGCCTGTG 3'	LL2368		

**Tableau 3. Oligonucléotides utilisés dans les expériences de PCR, qRT-PCR et ChIP**

Anticorps	Code	Fournisseur	Référence	Utilisation
β-CATENINE	#118	Abcam	ab6302	WB 5% Lait 1:5000 ; IHF 1:300
β-actine	#148	Sigma	A5441	WB 5% Lait 1:5000
Vinculine	#162	Sigma	V9131	WB 5% lait 1:5000
GSK3β	#113	Santa Cruz	sc-9166	WB 5% Lait 1:2000
p38	#250	Cell signaling Technology	9212	WB 5% Lait 1:2000
ERK	#185	Cell signaling Technology	9102	WB 5% Lait 1:1000
AKT (11E7)	#241	Cell signaling Technology	4685	WB 5% Lait 1:1000
CHK2	#381	Santa Cruz	sc-9064	WB 5% Lait 1:1000
P <sub>S33,S37,T41</sub> -βCATENINE	#115	Cell signaling Technology	9561	WB 5% BSA 1:1000
P <sub>T41,S45</sub> -βCATENINE	#116	Cell signaling Technology	9565S	WB 5% BSA 1:1000
P <sub>S9</sub> -GSK3β	#117	Cell signaling Technology	9336S	WB 5% BSA 1:1000
P <sub>Y204</sub> -ERK	#126	Santa Cruz	sc-7383	WB 5% BSA 1:1000
P <sub>S473</sub> -AKT	#192	Cell signaling Technology	9271S	WB 5% BSA 1:1000
P <sub>T180,Y182</sub> -p38	#249	Cell signaling Technology	9211	WB 5% BSA 1:1000
hDicer (13D6)	#283	Abcam	ab14601	WB 5% BSA 1:1000
P <sub>T68</sub> -CHK2	#382	Cell signaling Technology	2661	WB 5% BSA 1:1000
mDICER	#439	Abcam	ab167444	WB 5% BSA + 2% Lait - 1:500
anti-mouse HRP		Jackson Laboratory	115-005	WB 1:20 000
β-galactosidase	#246	Abcam	ab9361	IHF 1:500
TYROSINASE		Dako	M3623	IHF 1:50
DCT (TRP2)	#356	Santa Cruz	sc-10451	IHF 1:300
β-CATENINE		BD Bioscience	610154	IHF 1:300
BrdU	#227	BD Bioscience	555627	IHF 1:200
CPD (TDM-2)	#446	COSMO BIO	NMDND001	IF 1:2000 ; ELISA 1:2000
anti-mouse alexa fluor 555		Invitrogen	A21422	IF 1:100
anti-chicken alexa fluor 488		Invitrogen	A11039	IF 1:100
GFP	#243	Abcam	Ab290	ChIP
β-CATENINE	#372	Cell signaling Technology	9581	ChIP
LEF-1	#373	Santa Cruz	sc 8592	ChIP
SOX9	#383	Millipore	AB5535	ChIP
FOXO1	#384	Santa Cruz	sc-11350	ChIP
p53	#387	Santa Cruz	sc-126	ChIP
Histone H3	#388	Cell signaling Technology	2650	ChIP

**Tableau 4. Anticorps primaires et secondaires utilisés dans les expériences de western blot (WB), ChIP, immunohistofluorescence (IHF) et immunofluorescence (IF)**

Plasmide	Code	Références
FullDicer::luciférase	#1006	Levy et al 2010
#SH	#1161	Non publié
#C	#1164	Non publié
#E	#1169	Non publié
#SK	#1160	Non publié
#B	#1163	Non publié
#D	#1168	Non publié
#EΔFOXO1	#1182	Non publié
#EΔTCFa	#1183	Non publié
#EΔSOX9	#1184	Non publié
#EΔTCFb	#1173	Non publié
#EΔTCFc	#1174	Non publié
#EΔTCFa,b	#1178	Non publié
#EΔTCFb,c	#1175	Non publié
#EΔTCFa,b,c	#1177	Non publié
TK::Renilla	#894	Promega E2241
pGL3	#654	Promega E1751
β-CATENINE-NLS	#1012	Gift from I. Davidson
TOPflash	#390	Korinek et al. 1997
Brn2::luciférase	#685	Goodall et al. 2004

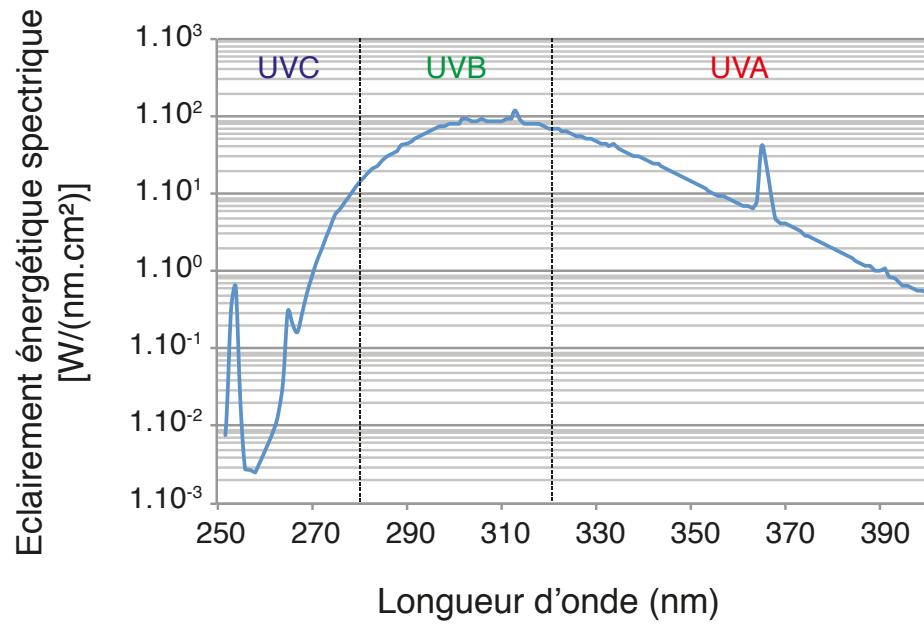
**Tableau 5. Plasmides transfectés dans différentes lignées cellulaires**

Gène	Séquence	Code	Compagnie	Référence	Utilisation
Scr	AAUUCUCCGAACGUGUCACGU-dTdT	#010	MWG		50 nM
hDicerh	UAAAGUAGCUGGAAUGAUG	#075	Dharmacon	SMARTpool M-003483-00	50 nM
	GGAAGAGGCUGACUAUGAA				
	GAAUAUCGAUCCUAUGUUC				
	GAUCCUAUGUCAAUCUAA				
mDicer	GGAAAGAGACUGUAAAUA	#026	Dharmacon	SMARTpool M-040892-01	50 nM
	GAUCAUAUGUCCAGUCUAA				
	GAGCGCCGAUCUCUAAUUA				
	GCAAUUUGGUGGUUCGUUU				

**Tableau 6. SiARN transfectés dans différentes lignées cellulaires**

Inhibiteur	Cible	Compagnie	Référence	Utilisation
U0126	MEK	Cell Signaling	9903	6h 10uM
SB203580	p38α,β	Sigma	S8307	6h 10uM
SP600125	JNK 1,2,3, Aurora A	Sigma	S5567	6h 50uM
Enzastaurin	PKCβ	Sigma	SML0762	6h 10uM
LY294002	Pi3K	Calbiochem	440202	6h 50uM
KU55933	ATM	Selleckchem	S1092	24h 10uM
BI-D1870	p90 RSK	Calbiochem	559286	6h 20uM
BIO	GSK3	Sigma	B1686	6h 5uM
iCRT3	β-caténine	Sigma	SML0211	6h 10uM

**Tableau 7. Inhibiteurs utilisés, cibles et conditions d'utilisation**



**Figure 21. Spectre d'émission de la lampe VL-330 utilisée pour les expériences d'irradiation**





## RESULTATS



## RESULTATS

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de comprendre une partie de la régulation de l'expression de Dicer dans le lignage mélanocytaire en conditions normales et en conditions de stress UVB, et de préciser son rôle spécifiquement dans ce lignage en questionnant plus précisément son importance dans le maintien, le renouvellement et la différenciation du lignage mélanocytaire adulte, nécessaires à la pigmentation du poil. Ces résultats sont présentés dans deux parties, comportant chacune deux sous-parties, sur le rôle et la régulation de Dicer, en conditions normales dans la partie 1 et en conditions de stress UVB dans la partie 2.

### **1. Rôle de Dicer dans la pigmentation et sa régulation dans le lignage mélanocytaire**

#### **1.1. Rôle de Dicer dans la pigmentation**

Le but de cette partie est de comprendre le rôle de Dicer dans la pigmentation adulte, c'est-à-dire dans le maintien et le renouvellement des McSC et leur différenciation en mélanocytes matures. Cette étude a été réalisée *in vivo* avec un mutant murin d'invalidation de Dicer et *in vitro* par réduction du niveau de Dicer dans des cellules du lignage mélanocytaire.

#### **1.2. Régulation de Dicer dans le lignage mélanocytaire**

Dans cette partie, l'implication de différentes voies de signalisation a été analysée *in vitro* dans des cellules de mélanome en utilisant une approche naïve grâce à des inhibiteurs pharmacologiques. L'analyse du rôle d'effecteurs de ces voies a permis de mettre en évidence un mécanisme moléculaire de régulation transcriptionnelle de Dicer via  $\beta$ -caténine.

### **2. Régulation de $\beta$ -caténine et Dicer par les UVB dans le lignage mélanocytaire et leur implication dans la réponse au stress des UV**

#### **2.1. Les UVB répriment la migration des mélanocytes via l'activation de $\beta$ -caténine**

Cette partie découle de la partie 1.2. et a pour objectif de mettre en évidence l'activation transcriptionnelle de  $\beta$ -caténine par les UVB et son rôle dans la migration des mélanocytes.

Ces résultats sont présentés dans un article publié dans le journal *Experimental Dermatology* en Février 2017 (Bertrand et al., 2017):

JU Bertrand\*, V Petit\*, E Hacker, I Berlin, NK Hayward, M Pouteaux, E Sage, DC Whiteman and L Larue. UVB represses melanocyte cell migration and acts through  $\beta$ -catenin. *Exp Dermatol.* 2017;00:1-8.

## **2.2. Les UVB répriment l'expression de Dicer via $\beta$ -caténine**

La dernière partie a pour objectif de démontrer la régulation de Dicer par les UVB dans le lignage mélanocytaire et d'envisager un rôle possible de Dicer dans la réponse au stress des UVB.

## 1. Rôle de Dicer dans la pigmentation et sa régulation dans le lignage mélanocytaire

### 1.1. Rôle de Dicer dans la pigmentation

#### Contexte et objectifs

La pigmentation du poil est dépendante de la présence de mélanocytes dans le bulbe et de leur bon fonctionnement c'est-à-dire leur aptitude à produire, transporter et transférer la mélanine dans les mélanosomes. La présence de mélanocytes est dépendante de la présence de McSC et de leur bon fonctionnement, c'est-à-dire leur capacité à se renouveler tout en formant des TAC. Les TAC sont des cellules mélanocytaires transitoires qui prolifèrent et migrent vers le bulbe dans la papille dermique pour se différencier en mélanocytes. La pigmentation est donc basée sur les processus de sortie de quiescence, prolifération, migration et différenciation des cellules du lignage mélanocytaire.

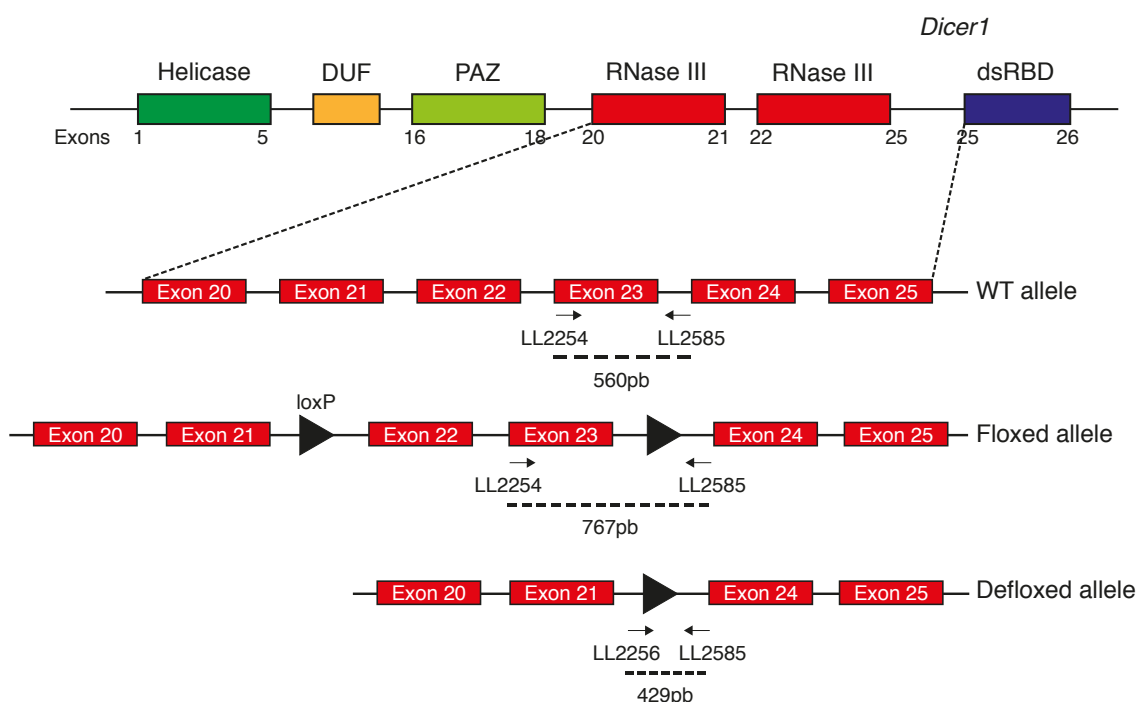
Dicer est une ribonucléase de la famille des RNase III dont la fonction canonique est la maturation des miARN. Par cette fonction, Dicer participe à la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de nombreux gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires telles que la quiescence, la prolifération, la migration, la différenciation et l'apoptose. En effet, l'absence de Dicer dans les kératinocytes de la lame basale empêche leur différenciation en cellules folliculaires et induit l'absence de poils et de follicules pileux (Murchison et al., 2005, Yi et al., 2006). Dans les mélanocytes, des miARN sont impliqués dans la régulation de la mélanogenèse par régulation des enzymes TYR, DCT et TYRP1 (Syed et al., 2013).

L'invalidation de *Dicer1* dans les mélanocytes murins pendant le développement embryonnaire conduit à la naissance d'une souris hypopigmentée dont le phénotype est associé à une absence de mélanocytes chez l'adulte (Levy et al., 2010). Dicer est donc nécessaire à la mise en place du lignage mélanocytaire. L'absence de mélanocytes chez ce mutant ne permet pas d'étudier le rôle de Dicer dans la pigmentation chez l'adulte. Nous avons voulu étudier si Dicer est impliqué dans un ou plusieurs processus cellulaires se déroulant dans le lignage mélanocytaire et aboutissant à la pigmentation. L'objectif de cette partie de la thèse est d'étudier si Dicer est impliqué dans la pigmentation en particulier chez l'adulte. L'étude a donc porté sur la mise en place du lignage mélanocytaire, son renouvellement et sur le processus de mélanogenèse.

## Résultats

### *L'absence de Dicer dans les mélanoblastes induit un blanchiment précoce.*

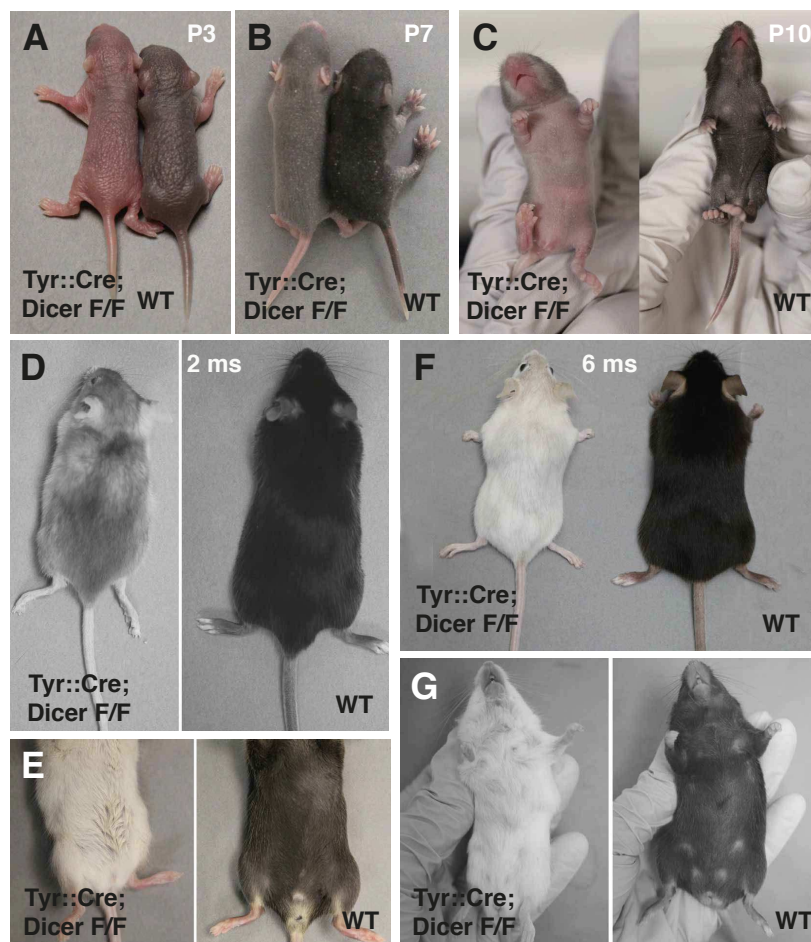
L'inactivation constitutive du gène *Dicer1* chez la souris est létale (Bernstein et al., 2003) et interrompt le développement embryonnaire juste après l'implantation, avant la gastrulation. L'étude du rôle de Dicer dans les mélanocytes a été effectuée grâce à un mutant inducible de Dicer. Nous avons utilisé l'allèle de *Dicer1* dont les exons 22 et 23 sont floxés (Murchison et al., 2005) (Figure 22). Le mutant inducible de Dicer a été croisé avec le mutant Tyr::Cre (Delmas et al., 2003) exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur Tyrosinase, spécifiquement dans les mélanoblastes et les mélanocytes différenciés. Le génotype des mutants ainsi générés a été déterminé par PCR avec les oligonucléotides LL2254 et LL2585 pour amplifier les allèles floxé et sauvage de Dicer (Figure 22) et LL125 et LL296 pour amplifier le transgène Tyr::Cre.



**Figure 22. Représentation des allèles sauvage, floxé et défloxe de *Dicer1* et amorces utilisées pour les amplifier par PCR**

Structure du gène murin *Dicer1* et spécificité du domaine RNase III des allèles sauvage (WT), floxé et défloxe. L'allèle sauvage (WT allele) est amplifié par PCR avec les amorces LL2254 et LL2585 donnant un fragment de 560 pb. L'allèle floxé (Floxed allele) inclut des séquences loxP entre les exons 21 et 22 puis 23 et 24. L'amplification par PCR avec les amorces LL2254 et LL2585 donne un fragment de 767 pb. L'allèle défloxe (Defloxed allele) résultant de la recombinaison entre les deux séquences loxP ne possède plus les exons 22 et 23, la PCR avec les amorces LL2254 et LL2585 n'amplifie aucun ADN sur cet allèle. Par contre la PCR avec les amorces LL2256 et LL2585 donne un fragment de 429 pb. DUF : Domaine of Unknown Function (domaine à fonction inconnue); RBD : RNA Binding Domain (domaine de fixation de l'ARN).

A la naissance, les mutants ( $\text{Tyr::Cre}^{\circ}/^{\circ}$  ;  $\text{Dicer F/F}$ ) présentent une hypopigmentation par rapport aux contrôles sauvages (WT) (Figure 23A). Avant l'apparition des poils, la peau des mutants est rose alors que celle des sauvages est foncée. Les premiers poils mutants sont blancs sur le ventre et gris sur le dos alors que ceux du sauvage sont noirs (Figure 23B,C). Chez le mutant, des mélanocytes sont donc présents au niveau dorsal au premier cycle pileux embryonnaire mais ne permettent pas une pigmentation maximale du poil. Les cycles pileux suivants présentent un blanchiment progressif des poils du dos avec un pelage blanc à six mois (Figure 23D,F). Nous confirmons le blanchiment du mutant de *Dicer* également observé sur des souris possédant deux allèles de *Dicer* inductibles floxés pour l'exon 23 (Levy et al., 2010) pour lesquelles le blanchiment est présenté à un mois. Nos résultats montrent en plus le caractère progressif du blanchiment, suggérant un mécanisme cumulatif progressant avec les cycles pileux. Chez le mutant de Levy et al., l'absence totale de mélanocytes, évaluée avec le mutant rapporteur *Dct::LacZ*, est observée dès six semaines.

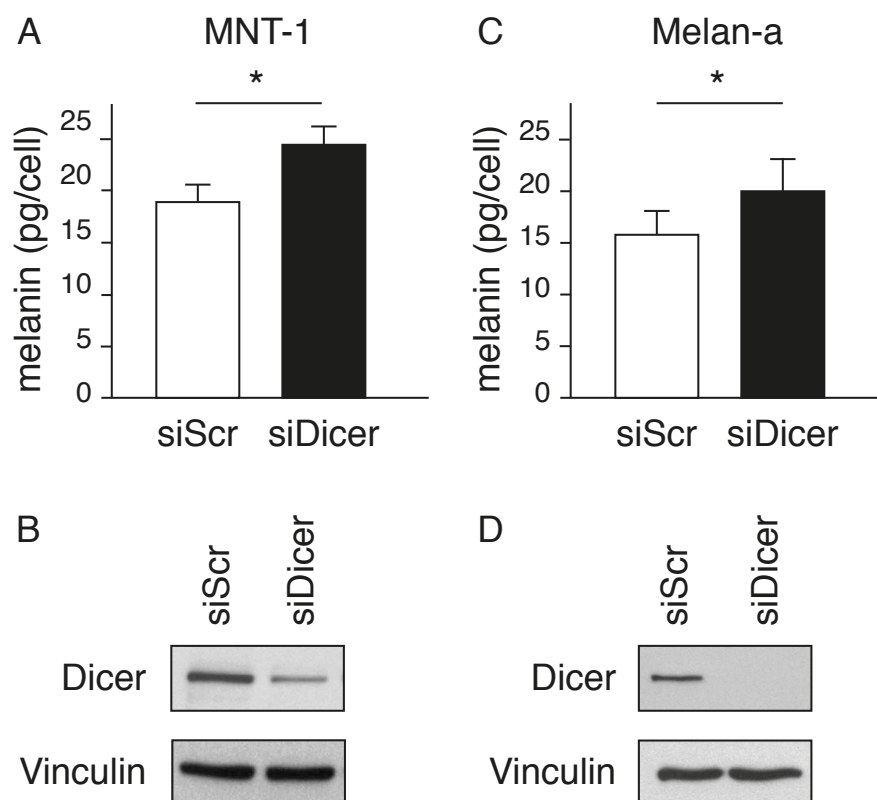


**Figure 23.**  
**Hypopigmentation**  
**des mutants**  
 **$\text{Tyr::Cre}^{\circ}/^{\circ}$  ;  $\text{Dicer}$**   
 **$\text{F/F}$**

Photographies des souris invalidées pour *Dicer* pendant le développement embryonnaire grâce à l'expression conditionnelle de la recombinaise Cre ( $\text{Tyr::Cre}$ ) chez les doubles mutants  $\text{Tyr::Cre}^{\circ}/^{\circ}$  ;  $\text{Dicer F/F}$  comparé aux souris sauvages (WT) issues de la même portée.

L'hypopigmentation est visible dès la naissance sur le dos (A) puis à l'apparition du premier poil sur le dos (B) et le ventre (C) puis à deux mois sur les poils adultes du dos (D) et du ventre (E). A six mois, le pelage du mutant est blanc sur le dos (F) et le ventre (G).

L'absence de Dicer induit deux phénotypes: une hypopigmentation à la naissance et un blanchiment chez l'adulte. La pigmentation du premier poil a une origine différente de celle des poils adultes suivants. Les mélanocytes du premier poil proviennent des mélanoblastes interfolliculaires embryonnaires alors que les mélanocytes des poils adultes proviennent des McSC via les TAC. Afin d'expliquer à la fois l'hypopigmentation à la naissance et la perte des mélanocytes, quatre hypothèses non exclusives ont été posées: (i) le nombre de mélanoblastes à la naissance est inférieur chez le mutant par rapport au contrôle induisant un nombre réduit de McSC et de mélanocytes; ou le nombre de mélanoblastes est identique entre le mutant et le contrôle mais (ii) l'absence de Dicer altère le fonctionnement des McSC, leur capacité à sortir de quiescence et à se renouveler, (iii) l'absence de Dicer altère le fonctionnement des TAC, leur prolifération et leur migration vers le bulbe, (iv) l'absence de Dicer altère le fonctionnement des mélanocytes différenciés, leur aptitude à produire, transporter et transférer la mélanine dans les mélanosomes.



**Figure 24. Effet d'une diminution du niveau de Dicer sur la quantité de mélanine *in vitro***

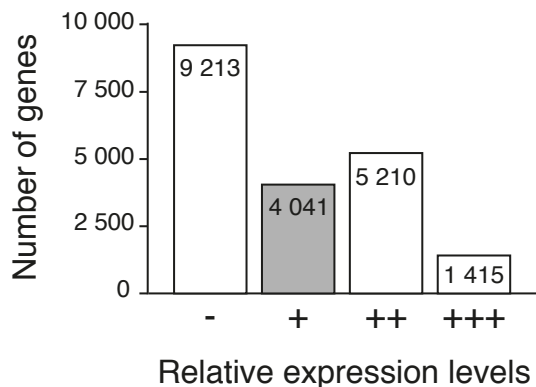
Les cellules MNT-1 (A,B) ou Melan-a (C,D) ont été transfectées pendant 48h avec un siARN dirigé contre Dicer humain ou murin (siDicer) ou un siARN contrôle (siScr) avant d'être récoltées. La quantité de mélanine a été déterminée sur un culot de  $5.10^5$  cellules pour chaque condition puis rapportée en quantité de mélanine par cellule (A,C) et le niveau de protéine de Dicer a été analysé par



western blot sur des extraits protéiques totaux (B,D). La vinculine est utilisée comme contrôle de charge. La moyenne et l'écart-type sont présentés pour au moins trois expériences indépendantes. Analyse statistique par t-test: \* p-value < 5.10<sup>-2</sup>.

*In vitro*, la réduction du niveau de Dicer grâce à un siARN dirigé contre Dicer dans des cellules de mélanome humain pigmentées MNT-1 (Figure 24B) ou dans des mélanocytes murins immortalisés Melan-a (Figure 24D), induit une augmentation du niveau de mélanine par cellule (Figure 24A,C). La réduction du niveau de Dicer n'empêche donc par la mélanogenèse suggérant que l'hypothèse (iv) est peu probable.

L'hypothèse (i) sera testée en croisant les souris (Tyr::CreA/<sup>o</sup> ; Dicer F/F) avec des mutants Dct::LacZ permettant de marquer le lignage mélanocytaire. Des données d'analyse transcriptomique générées au laboratoire indiquent que Dicer est exprimé dans les mélanoblastes murins au stade embryonnaire E15.5 (Figure 25). Dicer fait partie des gènes moyennement exprimés dans les mélanoblastes au stade E15.5. Nous analyserons ainsi le nombre de mélanoblastes au stade E14.5 du développement embryonnaire. Ces expériences sont en cours de réalisation.

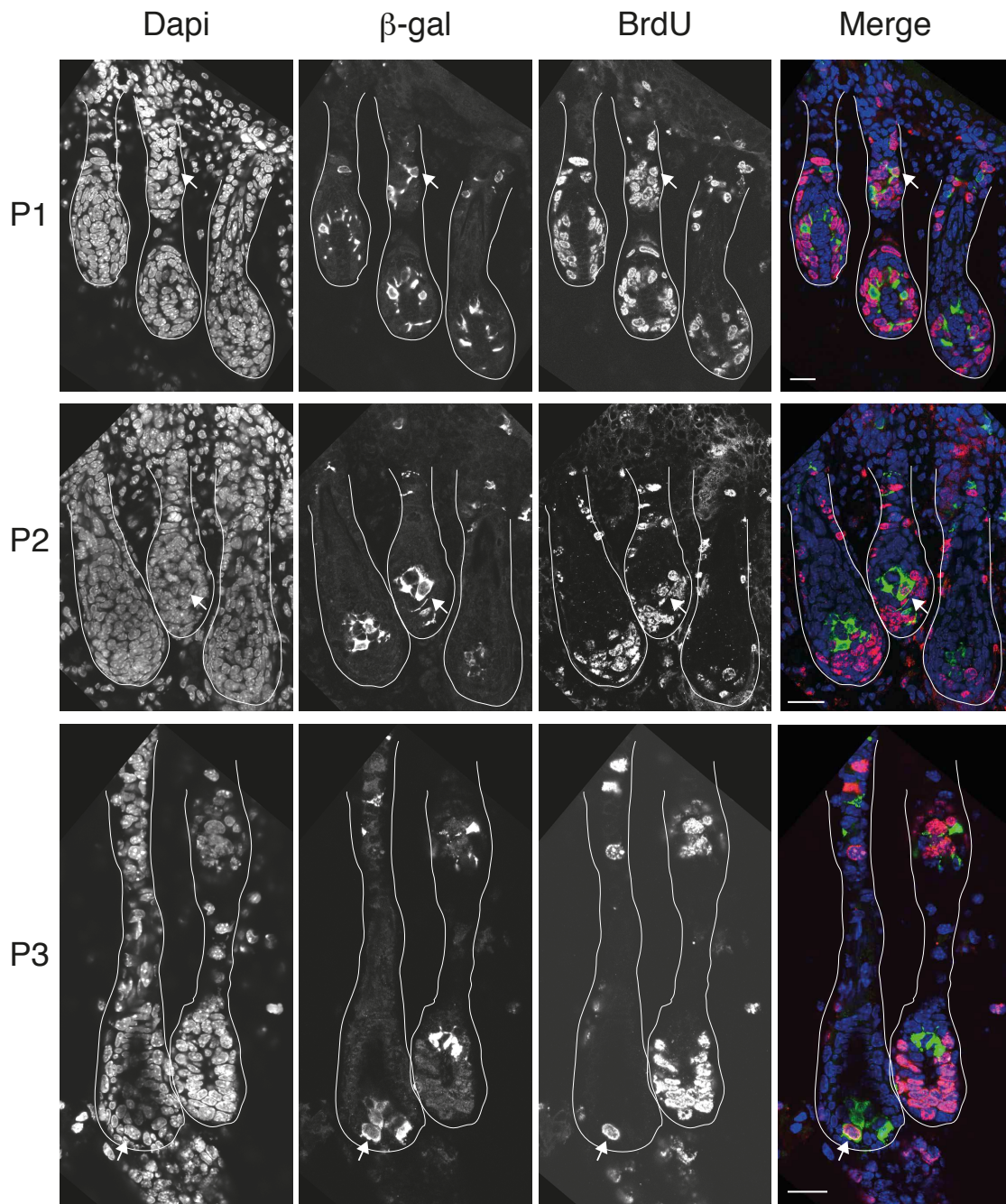


**Figure 25. Position de Dicer dans la classification des gènes en fonction de leur niveau d'expression dans les mélanoblastes murins à E15.5**

Le niveau d'expression relative de 20 000 gènes/sondes a été quantifié par analyse transcriptomique dans les mélanoblastes murins extraits d'embryons à E15.5. Quatre classes de gènes ont été construites en fonction du niveau d'expression: très élevé (+++), élevé (++), moyen (+) ou faible (-). Dicer est classé parmi les gènes ayant une expression moyenne dans les mélanoblastes à E15.5.

*L'absence de Dicer dans les mélanocytes réduit la pigmentation adulte.*

Pour contourner l'hypothèse (i), Dicer a été invalidé à la naissance, après le développement des mélanoblastes.

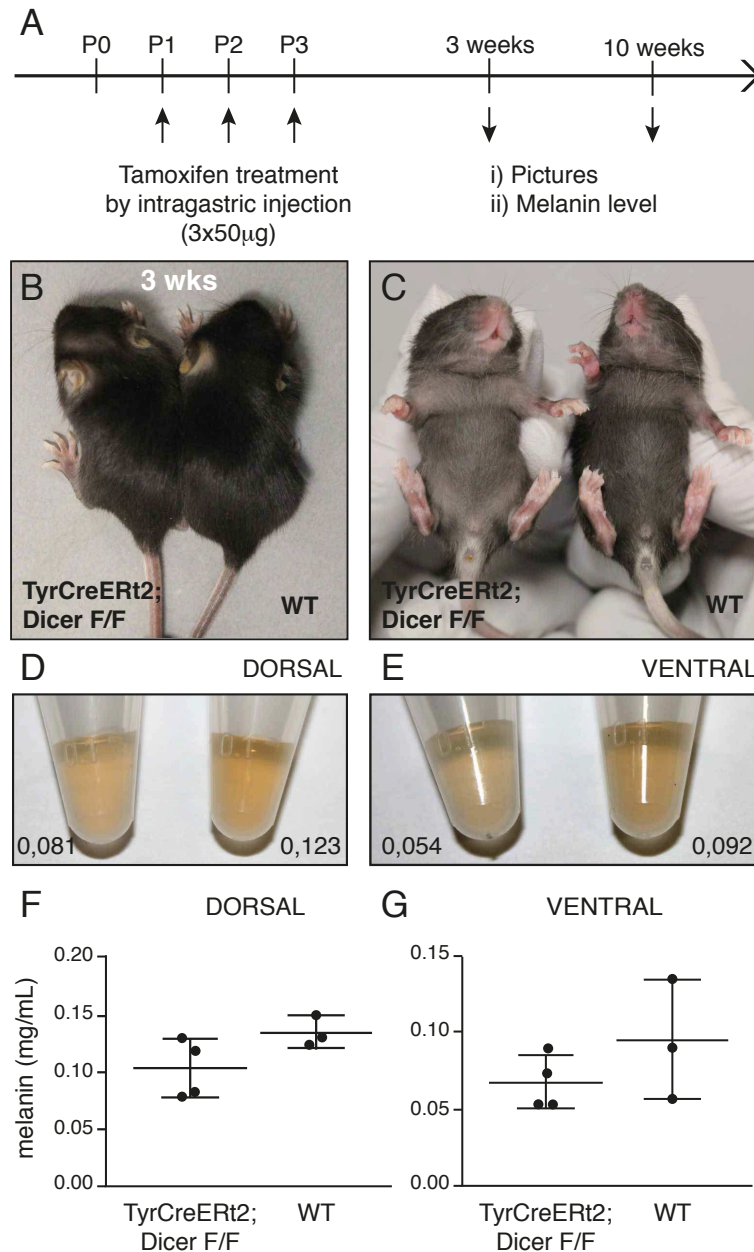


**Figure 26. Prolifération des cellules du lignage mélanocytaire murin à P1, P2, P3**

Des peaux de souriceaux Dct::LacZ injectés avec du BrdU ont été prélevées aux jours P1, P2 et P3 après la naissance afin de réaliser un immunomarquage de BrdU (prolifération, vert),  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal, mélanocytes, rouge) et Dapi (bleu) sur cryosections de peau (10  $\mu$ m). Les cellules présentant un double marquage  $\beta$ -gal<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> sont indiquées par une flèche blanche. Le marquage fluorescent a été observé et photographié au microscope confocal avec une section optique de 0,2  $\mu$ m d'épaisseur. Barre d'échelle 20  $\mu$ m.

Le développement post-natal des mélanoblastes en McSC et mélanocytes est peu connu et la cinétique d'arrêt de prolifération des mélanoblastes et de début de différenciation des mélanocytes n'a pas été décrite. Des cellules prolifératives du lignage mélanocytaire ( $Dct^+$ ), caractérisées par un co-marquage  $\beta\text{-gal}^+/\text{BrdU}^+$  ont été observées dans différentes parties du follicule pileux en croissance, correspondant probablement aux futurs bulges et aux futurs bulbes. Les cellules du lignage mélanocytaire continuent donc de proliférer après la naissance au moins jusqu'au jour P3. Ce résultat nous indique que, dans le cas d'une hypopigmentation du premier poil embryonnaire, après invalidation de *Dicer* à la naissance, la prolifération peut être un des mécanismes cellulaires impliqués.

Afin d'invalider *Dicer* à la naissance, le mutant de *Dicer1* floxé pour les exons 22 et 23 a été croisé avec le mutant *Tyr::Cre-ERT2* exprimant une forme inactive de la recombinaise Cre spécifiquement dans toutes les cellules du lignage mélanocytaire jusqu'au jour P3 et dans les mélanocytes différenciés adultes en absence de tamoxifène (Yajima et al., 2006). La recombinaise Cre-ERT2 peut être activée par un analogue des œstrogènes, le tamoxifène. La fixation du tamoxifène au récepteur des œstrogènes (ER) couplé à la recombinaise Cre induit la relocalisation nucléaire de la Cre-ERT2 et permet son activité recombinaise. Les nouveau-nés sont traités avec du tamoxifène de manière systémique par injection intragastrique aux jours P1, P2 et P3 après la naissance afin d'activer la recombinaise Cre-ERT2 dans les McSC et les mélanocytes du premier cycle pileux (Figure 27A).



**Figure 27. Hypopigmentation des souris de trois semaines C57BL/6 invalidées pour Dicer à la naissance**

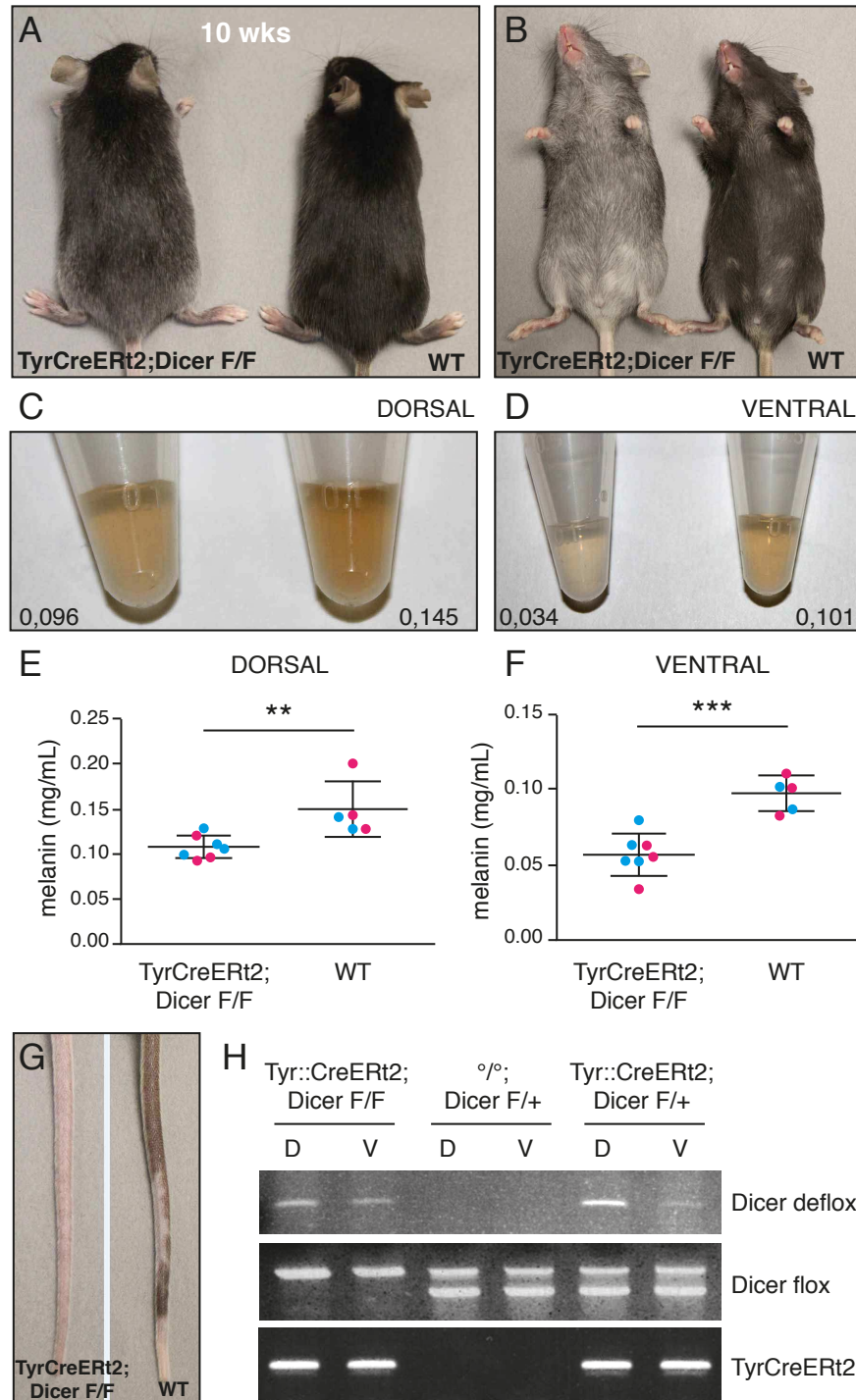
(A) Représentation temporelle d'induction au tamoxifène et d'analyse de la pigmentation. (B,C) Photographies du pelage d'une souris de trois semaines invalidée pour Dicer à la naissance (TyrCreERT2 ; Dicer F/F) et de la souris contrôle (WT) de la même portée. (D,E) Digestion des poils du dos ou du ventre dans NaOH (1M) avec indication de la valeur d'absorbance correspondant à l'échantillon présenté et (F,G) détermination de la concentration en mélanine par mesure de l'absorbance à 475nm et comparaison à une dilution de mélanine synthétique. La concentration en mélanine est exprimée en mg/mL ou mg/mg de poil. A trois semaines, le phénotype d'hypopigmentation est visible sur le dos (B,D,F) et le ventre (C,E,G) des souris C57BL/6 invalidées pour *Dicer1* à la naissance (TyrCreERT2 ; Dicer F/F) comparées aux souris contrôles (WT) issues de la même portée.

Les souriceaux mutants présentent une hypopigmentation du dos et du ventre au premier cycle pileux (Figure 27B,C). Ce phénotype est visuellement plus fortement marqué au niveau ventral. Afin de préciser cette observation, la quantité de mélanine présente dans les poils a été quantifiée sur le dos et le ventre. La quantité de mélanine est réduite dans les poils du dos et du ventre des mutants comparés aux contrôles sauvages issus de la même portée (Figure 27D-G).

Les mutants adultes présentent également une hypopigmentation du dos, du ventre et de la queue (Figure 28A,B,G). Cette hypopigmentation est associée à une diminution significative du niveau de mélanine dans les poils du dos et du ventre dans les mutants comparés aux contrôles sauvages issus de la même portée (Figure 28C,D). La quantité de mélanine passe d'environ 0,15 mg/mL chez le contrôle à 0,11 mg/mL chez le mutant sur le dos et d'environ 0,10 mg/mL chez le contrôle à 0,06 mg/mL chez le mutant sur le ventre (Figure 28E,F). A trois semaines comme à six semaines, pour les souris sauvages, la quantité de mélanine est plus élevée sur le dos que sur le ventre des souris sauvages. Ce résultat s'explique par un nombre de mélanocytes présents sur le ventre naturellement plus faible que sur le dos chez les souris C57BL/6 dû à une nombre de mélanoblastes plus faible sur le ventre pendant le développement embryonnaire (Kelsh et al., 2009, Wilkie et al., 2002). De plus, aucune différence évidente n'a été observée entre les mâles (bleu) et les femelles (rose).

Le défloxxage du gène *Dicer1* chez les souris mutantes a été vérifié par PCR (Figure 22) sur l'ADN extrait des bulbes de poils prélevés sur le dos ou le ventre des mutants et contrôles. Les PCR amplifiant les allèles floxés et sauvages de *Dicer* (*Dicer* flox) et le transgène *Tyr::Cre-ERT2* confirment le génotype des individus par amplification de l'ADN issu à la fois des mélanocytes et des kératinocytes. Mais la PCR vérifiant le défloxxage de *Dicer* (*Dicer* deflox) amplifie uniquement l'ADN issu des mélanocytes défloxxés. Chez les mutants (*Tyr::Cre-ERT2*<sup>°</sup> ; *Dicer* F/F) et (*Tyr::Cre-ERT2*<sup>°</sup> ; *Dicer* F/+), la PCR confirme le défloxxage de l'allèle de *Dicer1* floxé (Figure 28H). L'absence d'amplification chez le mutant (*°/°* ; F/+) montre que la recombinaison *Cre-ERT2* est nécessaire au défloxxage. Ce résultat suggère que le défloxxage de *Dicer1* dans les mélanocytes (*Tyr::Cre-ERT2*<sup>°</sup> ; *Dicer* F/F) n'affecte pas leur survie: il existe chez le mutant des McSC ou mélanocytes défloxxés et vivants.



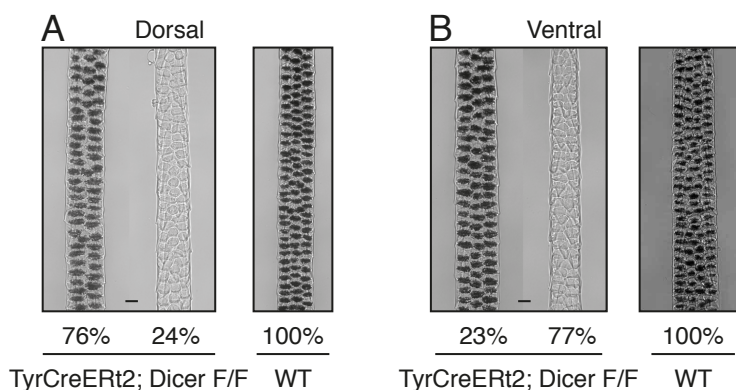


**Figure 28. Hypopigmentation des souris de dix semaines C57BL/6 invalidées pour Dicer à la naissance**

A dix semaines, le phénotype d'hypopigmentation est visible sur le dos (A,C,E), le ventre (B,D,F) et la queue (G) des souris C57BL/6 invalidées pour *Dicer1* à la naissance (TyrCreERT2 ; Dicer F/F) comparées aux souris contrôles (WT) issues de la même portée. (A,B,G) Photographies d'une souris de dix semaines invalidée pour Dicer à la naissance (TyrCreERT2 ; Dicer F/F) et de la souris contrôlée (WT) de la même portée. (C,D) Digestion des poils du dos ou du ventre dans NaOH (1M) avec indication de la valeur d'absorbance correspondant à l'échantillon présenté et (E,F) détermination de la concentration en mélanine par mesure de l'absorbance à 475nm et comparaison à une dilution de mélanine synthétique. La concentration en mélanine est exprimée en mg/mL ou mg/mg de poil. Les

points roses correspondent aux femelles et les bleus aux mâles. Analyse statistique par t-test: \*\*\* p-value <  $10^{-3}$ , \*\* p-value <  $10^{-2}$ . (H) Vérification du défloxxage du gène *Dicer1* chez les mutants (TyrCreERT2 ; *Dicer* F/F) et (TyrCreERT2 ; *Dicer* F/+) et de l'absence de défloxxage chez le contrôle ( $^{\circ}/^{\circ}$  ; *Dicer* F/F) par PCR sur l'ADN extrait du follicule pileux avec les amorces LL2256 et LL2585. Les PCR *Dicer* Flox et TyrCreERT2 permettent de vérifier le génotype de la souris. D : Dos, V : Ventre.

*L'absence de Dicer affecte la localisation des mélanocytes.*

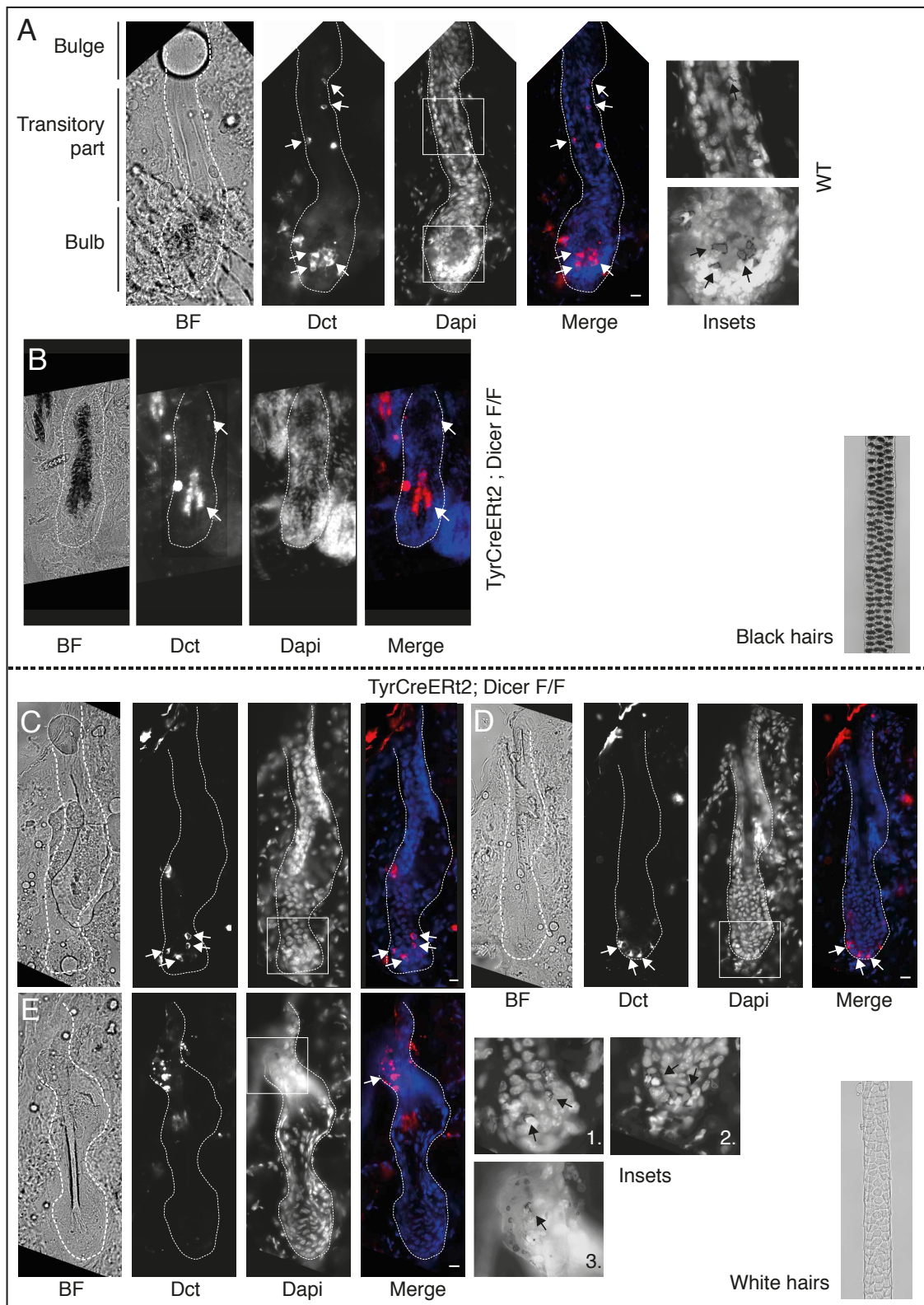


**Figure 29. Pigmentation des poils de souris invalidées pour *Dicer* à la naissance**

(A,B) Poils noirs et blancs observés sur le dos (A) ou le ventre (B) des souris C57BL/6 invalidées pour *Dicer* à la naissance (TyrCreERT2 ; *Dicer* F/F) comparés aux poils noirs des souris contrôles (WT). Barre d'échelle 10  $\mu$ m.

Afin de comprendre l'origine de l'hypopigmentation observée chez les mutants de *Dicer*, des poils ont été prélevés sur le dos et le ventre des mutants et contrôles à dix semaines. Les poils des souris sauvages sont noirs et formés d'une succession de kératinocytes dans lesquelles des granules de pigment peuvent être observés (Figure 29A,B). Chez les mutants (Tyr::Cre-ERT2/ $^{\circ}$  ; *Dicer* F/F), des poils noirs et des poils blancs sont observés. Le phénotype d'hypopigmentation du mutant est donc un phénotype "poivre et sel" caractérisé par une association de poils noirs et blancs. Sur le dos, les poils noirs sont majoritaires alors que sur le ventre les poils blancs sont majoritaires (Figure 29A,B).

Plusieurs hypothèses sont envisagées pour expliquer la présence de poils blancs chez le mutant: (i) l'absence de McSC entraîne l'absence de mélanocytes différenciés dans les bulbes correspondants; (ii) les McSC sont présentes mais leur fonctionnement est altéré, entraînant l'absence de mélanocytes différenciés; (iii) les McSC et les mélanocytes sont présents, les poils blancs sont associés à un défaut de fonctionnement des TAC et/ou mélanocytes c'est-à dire de prolifération, migration et/ou mélanogenèse.



**Figure 30. Localisation anormale de mélanocytes chez les souris invalidées pour Dicer à la naissance**

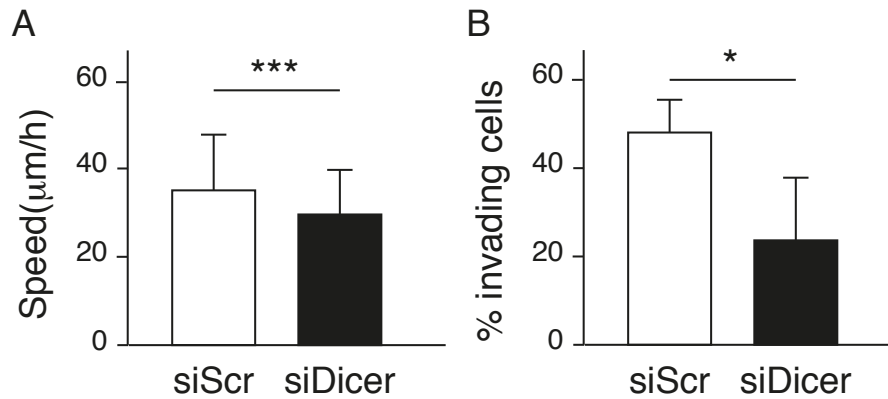
Une souris invalidée pour Dicer à la naissance (TyrCreERT2 ; Dicer F/F) et une souris contrôle (WT) issues de la même portée ont été épilées à dix semaines sur la moitié gauche du dos, une biopsie de 0,25cm<sup>2</sup> a été prélevée sur la zone épilée dix jours après l'épilation afin de réaliser un immunomarquage de Dct (rouge, flèches blanches) et Dapi (bleu) sur coupes de peau (10 µm). (A,B)



Les follicules associés aux poils noirs chez la souris sauvage (WT, A) ou la souris mutante (TyrCreERT2 ; Dicer F/F, B) possèdent des mélanocytes (Dct<sup>+</sup>, flèches) dans la papille dermique du bulbe, dans le bulge et dans la partie transitoire du follicule pileux. Les agrandissements des régions repérées par des carrés (A, insets) montrent la présence de pigment. (C-E) Les follicules associés aux poils blancs chez la souris mutante (TyrCreERT2 ; Dicer F/F) possèdent des mélanocytes anormalement localisés dans le bulbe (C), à la base du bulbe (D) ou dans la glande sébacée (E). Les agrandissements des régions repérées par des carrés sur les figures C (1.), D (2.) et E (3.) montrent la présence de pigment (flèches noires). Le marquage fluorescent a été observé et photographié sur une épaisseur de 10 µm au microscope à épifluorescence. Barre d'échelle 25 µm.

Des biopsies de peau du mutant et de son contrôle issu de la même portée sont réalisées à dix semaines afin de vérifier la présence de McSC et de mélanocytes ainsi que leur localisation. L'immunomarquage anti-Dct des coupes de peau de 10 µm permet de localiser les mélanocytes. Chez les souris sauvages, les cellules Dct<sup>+</sup> localisées dans le bulbe sont des mélanocytes différenciés, alors que les cellules Dct<sup>+</sup> localisées le long du follicule dans la partie transitoire sont probablement des TAC, et la cellule en retrait du follicule dans le bulge serait une McSC (Figure 30A). Chez le mutant (Tyr::Cre-ERT2<sup>o</sup> ; Dicer F/F), les follicules de poils noirs sont associés à la présence de mélanocytes différenciés dans le bulbe au niveau de la papille dermique, et probablement de McSC dans le bulge (Figure 30B). Les follicules de poils blancs sont associés à une localisation anormale des cellules Dct<sup>+</sup>. Les mélanocytes sont localisés à la périphérie du bulbe (Figure 30C,D) ou proches de la glande sébacée (Figure 30E). Un marquage pigmenté co-localise avec ces mélanocytes (Figure 30, insets) suggérant la présence de mélanosomes et donc le caractère différencié de ces mélanocytes. L'anomalie de localisation des mélanocytes favorise l'hypothèse (iii) et plus précisément un défaut de migration ou de "*homing*" des TAC.

*In vitro*, la réduction du niveau de Dicer grâce à un siARN dirigé contre Dicer dans des mélanocytes murins immortalisés Melan-a réprime la migration des cellules. La vitesse des cellules siDicer est réduite comparée aux cellules contrôles dans un test de migration en cellule seule en 2D (Figure 31A). Le pourcentage de cellules invasives est réduit dans les cellules siDicer par rapport aux cellules contrôles dans un test d'invasion inversé (Figure 31B). Ces résultats confortent l'observation que Dicer est impliqué dans la migration des mélanocytes et suggèrent que l'anomalie de localisation observée en absence de Dicer pourrait être due à un défaut de migration *in vivo* dans le follicule pileux.



**Figure 31. Effet d'une diminution du niveau de Dicer sur la migration et l'invasion *in vitro***

Les cellules Melan-a ont été transfectées pendant 48h avec un siARN dirigé contre Dicer (siDicer) ou un siARN contrôle (siScr). (A) La migration des cellules a été suivie pendant 12h par vidéo-microscopie et la vitesse a été déduite de l'analyse automatisée. L'expérience a été réalisée 3 fois sur un total d'environ 300 cellules. (B) La capacité à envahir le Matrigel a été suivie par migration dans un transwell inversé. La proportion de cellules ayant traversé plus de 45 μm est représentée. L'expérience a été réalisée 4 fois. La moyenne et l'écart-type de 4-6 répliques techniques sont présentés pour une expérience représentative. Analyse statistique par t-test: \*\*\* p-value < 10<sup>-3</sup>, \* p-value < 5.10<sup>-2</sup>.

## Conclusions et perspectives

Cette partie a permis de mettre en évidence le rôle de Dicer dans la pigmentation du poil. Nous avons utilisé une approche *in vivo* grâce à un mutant inductible de Dicer. Comme publié précédemment (Levy et al., 2010), l'invalidation de Dicer dans le lignage mélanocytaire grâce au mutant Tyr::Cre induit un pelage blanc chez l'adulte. Cependant, à la naissance, une pigmentation résiduelle est observée puis perdue progressivement. Ce phénotype suggère que des mélanocytes sont présents à la naissance et dans les premiers cycles pileux adultes mais un épuisement rapide des McSC expliquerait la disparition des mélanocytes dans les cycles suivants. Afin de vérifier si le nombre de mélanoblastes est réduit en absence de Dicer, les mélanoblastes seront localisés chez l'embryon en utilisant un fond génétique exprimant le rapporteur Dct::LacZ.

Afin de s'affranchir de la disparition des mélanocytes et d'étudier le rôle de Dicer dans les processus cellulaires de la pigmentation, Dicer a été invalidé à la naissance, après la mise en place du lignage mélanocytaire. Ainsi mutants et contrôles possèdent le même nombre de mélanoblastes et de McSC à la naissance. L'invalidation de Dicer réduit la pigmentation dès le premier cycle pileux embryonnaire suggérant un rôle indépendant des McSC. Cette hypopigmentation est également présente chez l'adulte. Des expériences *in vitro* ont montré que la diminution du niveau de Dicer ne réduit pas la quantité de mélanine, suggérant que la mélanogenèse n'est pas affectée chez le mutant. Dicer serait alors potentiellement impliqué dans la prolifération ou la migration des cellules transitoires qui se différencient en mélanocytes.

Chez l'adulte, l'hypopigmentation est caractérisée par l'association de poils noirs et blancs. L'une des hypothèses est que les mélanocytes des poils noirs ne soient pas défloqués. L'absence d'anticorps reconnaissant la protéine Dicer de souris par marquage immunofluorescent empêche de vérifier si la protéine est exprimée. Cependant l'amplification par PCR de l'allèle défloqué confirme que Dicer est défloqué dans des mélanocytes du follicule pileux et que ces mélanocytes sont vivants. L'autre hypothèse est que tous les mélanocytes sont défloqués mais le phénotype est variable entre les follicules pileux avec des mélanocytes plus affectés que d'autres, probablement en fonction du contexte environnant et un possible effet non autonome des cellules.

Alors que la structure des follicules des poils noirs est similaire aux follicules des souris contrôles, la localisation des mélanocytes des follicules des poils blancs est anormale.

La présence de mélanocytes dans les poils blancs confirme que Dicer n'intervient pas dans leur survie *in vivo*. Par contre Dicer interviendrait dans leur localisation, et donc potentiellement dans la migration des TAC. Le rôle de Dicer dans la migration des mélanocytes a été montré *in vitro*. Mais la direction de migration, plus que la capacité à migrer, semble affectée chez le mutant, ce qui suggère plutôt un défaut de "*homing*" probablement lié à l'interaction des TAC avec leur environnement et leur capacité à migrer dans une direction. Il sera important d'envisager le rôle de miARN impliqués dans la migration pour expliquer ce phénotype, en se concentrant d'abord sur des miARN régulant les intégrines qui sont des protéines clef de l'adhésion cellulaire et de la migration des mélanocytes. De plus, la différenciation de ces mélanocytes anormalement localisés devra être confirmée par un marquage de la mélanine ou de l'activité de la tyrosinase (TTA). La localisation des McSC dans ces poils blancs devra également être caractérisée afin d'évaluer leur implication dans le phénotype observé.

Nous pouvons conclure que Dicer est impliqué dans la pigmentation chez la souris. Dicer est nécessaire au développement des mélanoblastes, à la mise en place des mélanocytes du premier cycle et au renouvellement des mélanocytes adultes. Dicer ne semble pas affecter la survie, ni la différenciation des mélanocytes mais bien leur localisation dans le bulbe où ils transfèrent la mélanine aux kératinocytes du poil en croissance. Le phénomène de blanchiment du poil, appelé canitie, est induit chez l'Homme par différents facteurs et peut également être associé à une perte ou à un dysfonctionnement des mélanocytes. Il est possible d'envisager qu'une dérégulation de l'expression de Dicer soit à l'origine de canitie chez l'Homme.

## 1. Rôle de Dicer dans la pigmentation et sa régulation dans le lignage mélanocytaire

### 1.2. Régulation de Dicer dans le lignage mélanocytaire

#### **Contexte et objectifs**

Le rôle de Dicer dans la maturation des miARN en fait une protéine clef de la régulation de l'expression génique. Son niveau d'ARN et de protéine est stable dans différents types cellulaires. Une variation fine de son activité est susceptible de modifier le profil d'expression de nombreux miARN et par conséquent d'un nombre plus élevé de gènes. Dicer participe également à la régulation de la transcription, à la structure de la chromatine, et à la réparation des dommages de l'ADN. Au delà de la fonction de régulation de l'expression génique, Dicer semble jouer un rôle central dans le maintien de l'intégrité de l'information génétique (Burger and Gullerova, 2015).

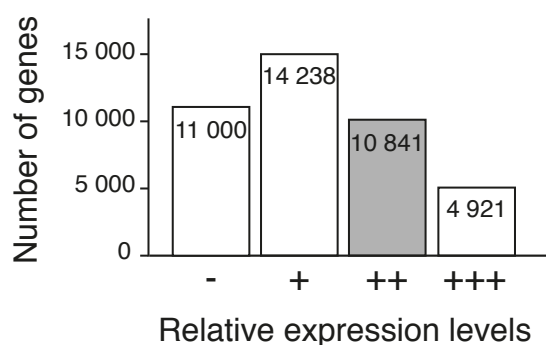
La régulation de l'activité de Dicer est donc cruciale dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. L'activité de Dicer dépend de la régulation de sa transcription, de la régulation du niveau et de la stabilité de son ARNm et de sa protéine, de la localisation de la protéine et de la régulation des partenaires protéiques nécessaires à cette activité. La transcription de Dicer est induite par différents facteurs dont cycline D1 et les facteurs de transcription MITF et P63, et elle est réprimée par la méthyltransférase EZH2 (Yu et al., 2013) (Levy et al., 2010, Su et al., 2010, van den Beucken et al., 2014).

Nous avons montré que Dicer est impliqué dans la pigmentation du poil chez le nouveau-né et l'adulte murins. Dicer est nécessaire à la localisation des mélanocytes dans le bulbe afin qu'ils transfèrent la mélanine aux kératinocytes. Le phénomène de canitie, ou blanchiment du poil, ne semble pas associé à une mutation de Dicer chez l'Homme (Foulkes et al., 2014) mais pourrait être associé à une dérégulation de l'expression ou de l'activité de Dicer dans les mélanocytes. L'objectif de cette partie est d'étudier les mécanismes moléculaires de régulation de la transcription de Dicer dans le lignage mélanocytaire afin de connaître les voies potentielles de régulation de l'activité de Dicer.

## Résultats

### *Les voies PI3K, RSK et GSK3 $\beta$ - $\beta$ -caténine régulent l'expression de Dicer.*

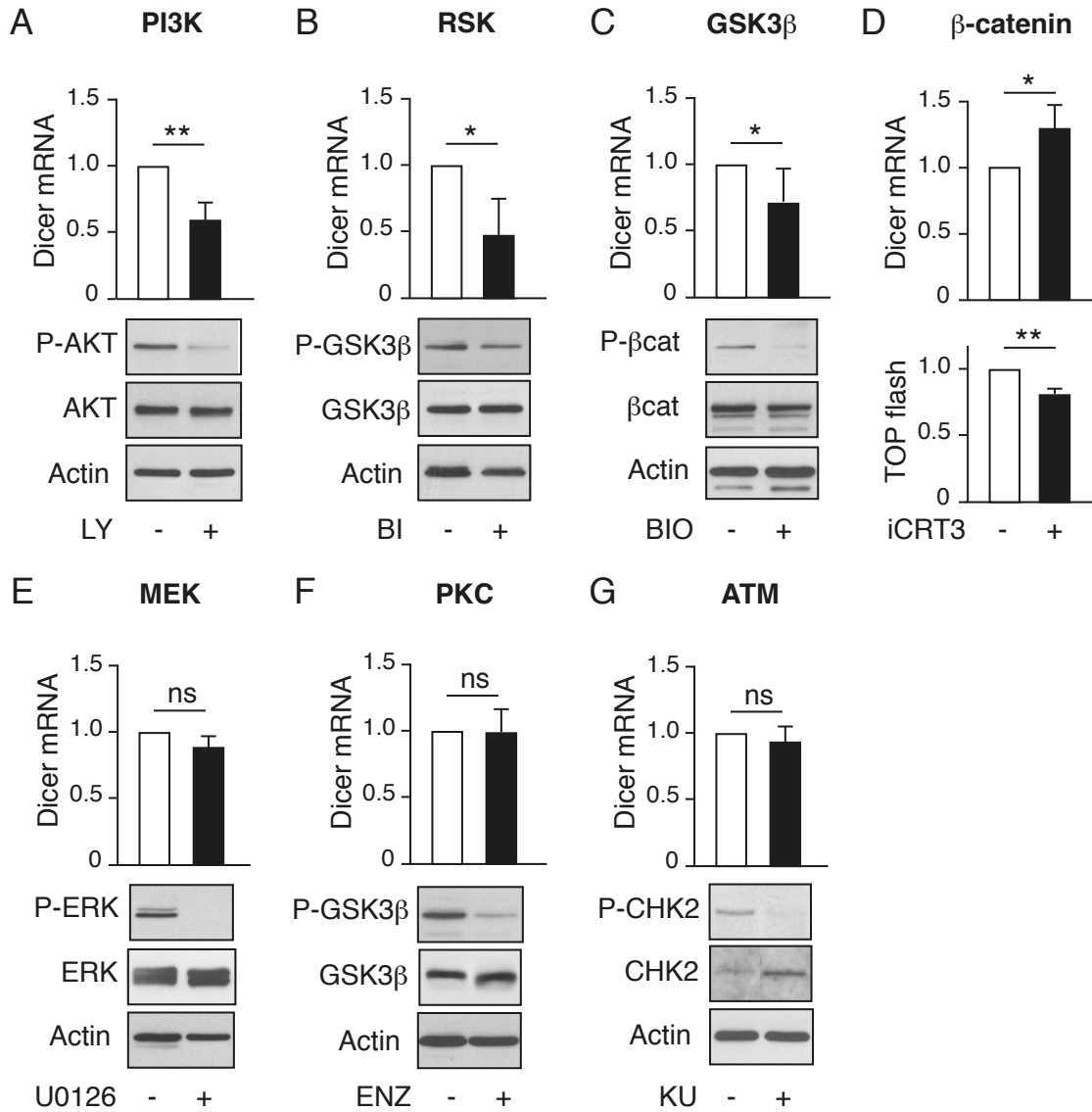
Afin de déterminer des voies de régulation de Dicer dans le lignage mélanocytaire, nous avons utilisé une approche non ciblée. Les cellules de mélanome humain MNT-1 ont été traitées avec des inhibiteurs pharmacologiques de différentes voies de signalisation (MAPK, PI3K, ATM, PKC, RSK) avant d'analyser le niveau d'ARNm de Dicer endogène. Dans les cellules MNT-1, le niveau basal d'ARNm de Dicer donne une valeur Ct d'environ 25 par PCR quantitative (qPCR) ce qui traduit un niveau élevé d'ARN, supporté par l'analyse transcriptomique du niveau d'expression des gènes dans les MNT-1 (Figure 32).



**Figure 32. Position de Dicer dans la classification des gènes en fonction de leur niveau d'expression dans les cellules MNT-1**

Le niveau d'expression relative de 41 000 gènes/sondes a été quantifié par analyse transcriptomique dans les cellules de mélanome humain MNT-1. Quatre classes de gènes ont été construites en fonction du niveau d'expression: très élevé (+++), élevé (++), moyen (+) ou faible (-). Dicer est classé parmi les gènes ayant une expression élevée dans les cellules MNT-1.

Dans chaque expérience, les valeurs Ct sont rapportées à la valeur du contrôle des cellules traitées au DMSO qui est normalisée à 1. Les inhibiteurs de PI3K (LY294002) et de RSK (BI-D1870) réduisent le niveau d'ARNm de Dicer à 0,6 et 0,5 (Figure 33A,B). Par contre, les inhibiteurs de MEK (U0126), ATM (KU55933) et PKC (Enzastaurin) n'affectent pas le niveau d'ARNm de Dicer (Figure 33E,F,G). L'approche pharmacologique indique que les protéines PI3K et RSK participent à la régulation du niveau d'ARNm de Dicer.



**Figure 33. Régulation du niveau d'ARNm de Dicer par PI3K, RSK et GSK3β mais pas par MEK, PKC et ATM**

Niveaux d'ARNm de Dicer endogène dans des cellules de mélanome humain MNT-1 après traitement ou non (DMSO) avec un inhibiteur de PI3K (A), RSK (B), GSK3β (C), β-caténine (D), MEK (E), PKC (F), et ATM (G). Les valeurs Ct obtenues par PCR quantitative ont été rapportées aux valeurs du gène de ménage GAPDH, puis les ratios ont été normalisés par rapport au contrôle non traité par la méthode  $\Delta\Delta Ct$ . Les inhibiteurs ont été utilisés aux concentrations et pour les durées suivantes: inhibiteur de (A) PI3K, LY294002, 50μM pour 6h; (B) RSK, BI-D1870, 20μM pour 6h; (C) GSK3β, BIO, 5μM pour 6h; (D) β-caténine, iCRT3, 10μM pour 6h; (E) MEK, U0126, 10μM pour 6h; (F) PKC, Enzastaurin, 10μM pour 6h; (G) ATM, KU55933, 10μM pour 24h. L'efficacité de chaque inhibiteur a été contrôlée grâce au niveau de phosphorylation de protéines en aval de la cible: P(Ser473)-AKT (ou P-AKT) pour PI3K, P(Ser9)-GSK3β (ou P-GSK3β) pour PKC et RSK, P(Ser33,Thr41,Ser45)-β-caténine (ou P-βcat) pour GSK3β, P(Thr202/Tyr204)-ERK (ou P-ERK) pour MEK, P(Thr68)-CHK2 (ou P-CHK2) pour ATM. L'actine est utilisée comme contrôle de charge. L'efficacité de iCRT3 a été contrôlée grâce au niveau d'activité TOP flash (Korinek et al., 1997) dans une expérience parallèle. La moyenne et l'écart-type sont présentés pour au moins trois expériences indépendantes. Analyse statistique par t-test: \*\*\* p-value <  $10^{-3}$ , \*\* p-value <  $10^{-2}$ , \* p-value <  $5 \cdot 10^{-2}$ , ns :non significatif.

Des voies impliquant PI3K et RSK induisent indirectement la phosphorylation inactivatrice de GSK3 $\beta$  (Sérine 9). Le traitement des cellules MNT-1 avec un inhibiteur de GSK3 $\beta$ , BIO, réduit le niveau d'ARNm de Dicer à 0,7 (Figure 33C) démontrant que GSK3 $\beta$  régule également le niveau d'ARNm de Dicer. La kinase GSK3 $\beta$  phosphoryle et inactive  $\beta$ -caténine sur les Sérines 33, 37 et Thréonine 41. Le co-facteur  $\beta$ -caténine interagit avec des facteurs de transcription, en particulier de la famille LEF/TCF, pour réguler la transcription. Les cellules MNT-1 ont été traitées avec un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle du complexe TCF -  $\beta$ -caténine, iCRT3 (Gonsalves et al., 2011), avant d'analyser le niveau endogène d'ARNm de Dicer. L'inhibiteur iCRT3 augmente le niveau d'ARNm de Dicer à 1,3 par rapport au contrôle (Figure 33D). Les protéines GSK3 $\beta$  et  $\beta$ -caténine participent donc à la régulation du niveau d'ARNm de Dicer.

#### *Répression directe de la transcription de Dicer par $\beta$ -caténine.*

Les voies testées précédemment ont fait ressortir le co-facteur de transcription  $\beta$ -caténine comme un régulateur potentiel du niveau d'ARNm de Dicer. Le lien entre  $\beta$ -caténine et Dicer a été suggéré dans deux expériences de ChIP-seq qui ont montré que  $\beta$ -caténine interagit avec le locus de Dicer. *In vitro* dans des cellules humaines de cancer du colon, le locus Dicer est présent dans la liste de gènes interagissant avec  $\beta$ -caténine (Bottomly et al., 2010). *In vivo* dans des cellules murines des *Nucleus Accubens*, l'interaction de  $\beta$ -caténine avec le locus Dicer a été démontrée (Dias et al., 2014). Afin de confirmer l'interaction directe de  $\beta$ -caténine sur le promoteur de Dicer, une expérience de ChIP a été réalisée sur des cellules humaines de cancer du colon SW620 exprimant un haut niveau de  $\beta$ -caténine. L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) complexée à  $\beta$ -caténine a permis d'amplifier un fragment de 140 pb du promoteur de DICER (Figure 34). Donc  $\beta$ -caténine interagit avec le locus *DICER1*, suggérant que l'action de  $\beta$ -caténine sur Dicer est directe. Les expériences de ChIP ont également pu mettre en évidence l'interaction d'autres facteurs de transcription avec le locus *DICER1*, tels que LEF-1, co-facteur de  $\beta$ -caténine, p53, SOX9 et FOXO1 (Figure 34A).



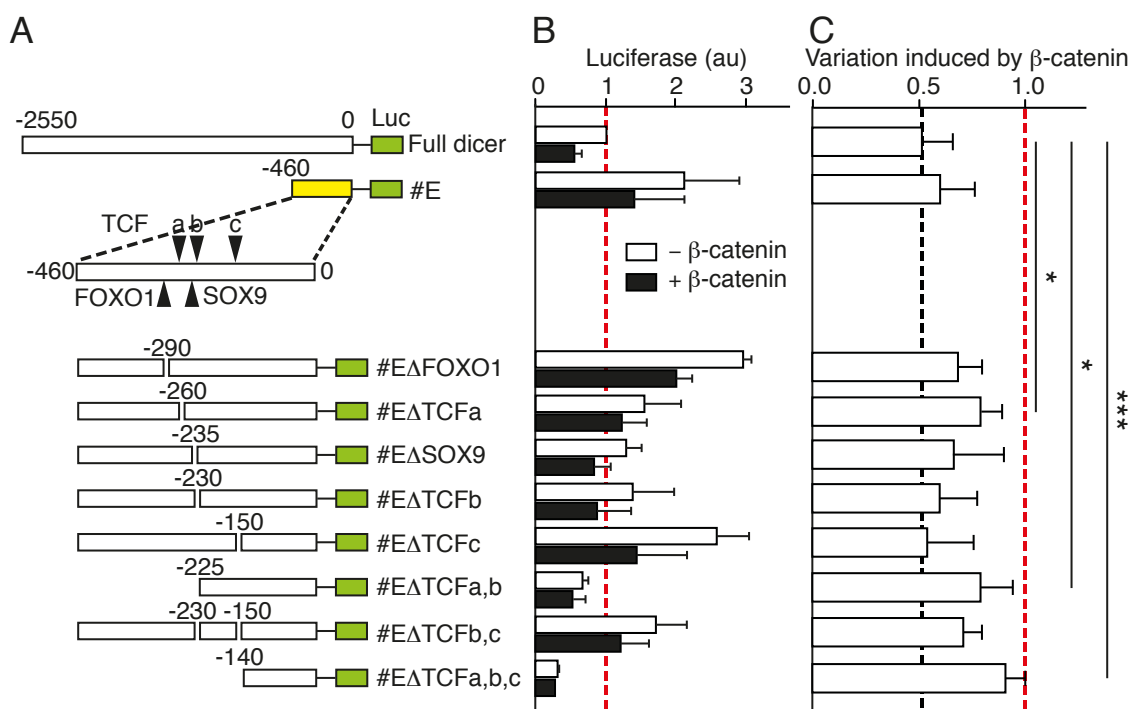


**Figure 34. Immuno-précipitation de facteurs de transcription sur le promoteur de Dicer**  
 (A) Migration de l'ADN amplifié par PCR sur le promoteur de Dicer après immunoprécipitation de la chromatine grâce à des anticorps dirigés contre GFP,  $\beta$ -caténine (b-cat), LEF-1, histone H3 (His H3), p53, SOX9, FOXO1 ou une IgG contrôle (IgG). (B) Localisation des amorces utilisées pour la PCR d'amplification du promoteur de *DICER1* par rapport aux sites putatifs LEF/TCF, SOX9, FOXO1 et au site d'initiation de la transcription (TSS).

#### *Répression de Dicer par $\beta$ -caténine via un site LEF/TCF.*

Le niveau d'ARNm de Dicer dépend du niveau de transcription et de la stabilité de l'ARNm. Afin d'étudier la régulation de la transcription de Dicer, une construction rapporteur exprimant la luciférase sous le contrôle d'une séquence d'environ 2,5 kb du promoteur de Dicer humain (Full dicer) a été transfectée dans les mélanocytes murins Melan-a. Pour déterminer le promoteur minimal de Dicer, le promoteur de Dicer présent dans la construction rapporteur a été digéré par différentes enzymes de restriction en des promoteurs plus courts (Figure 35A). Les différentes constructions ont été transfectées dans les mélanocytes murins Melan-a et le niveau de luciférase exprimé par ces constructions a été analysé en mesurant l'activité luciférase des extraits protéiques. Le plus court promoteur exprimant au moins autant de luciférase que le promoteur total (Full dicer) est dans la construction E (Figure 35B). Le promoteur minimal est donc la séquence de 460 pb en amont du site d'initiation de la transcription indiqué en jaune.





**Figure 36. Répression de l'activité des constructions Dicer::luciférase par β-caténine**  
 (A) Constructions rapporteurs des activités de différentes portions du promoteur de Dicer humain. Les mutations des sites ont été obtenues par suppression des cinq nucléotides de la séquence consensus dans la construction #E par mutagenèse dirigée. (B) Les mélanocytes murins Melan-a ont été co-transfectés avec les différentes constructions rapporteurs, le contrôle *renilla* luciférase et un vecteur exprimant une forme constitutivement active de β-caténine ou le vecteur vide. Les valeurs de *firefly* luciférase sont rapportées aux valeurs de *renilla* luciférase respectives puis normalisées par rapport à la valeur du "Full dicer". (C) La variation induite par β-caténine est le rapport entre l'activité luciférase normalisée en présence de β-caténine et l'activité luciférase normalisée en absence de β-caténine. La moyenne et l'écart-type sont présentés pour au moins trois expériences indépendantes. Analyse statistique par t-test: \*\*\*\* p-value <0,0001, \*\*\* p-value <0,001, \*\* p-value <0,01 \* p-value <0,05. L'absence d'indication statistique représente une différence non significative par rapport au contrôle "Full dicer".

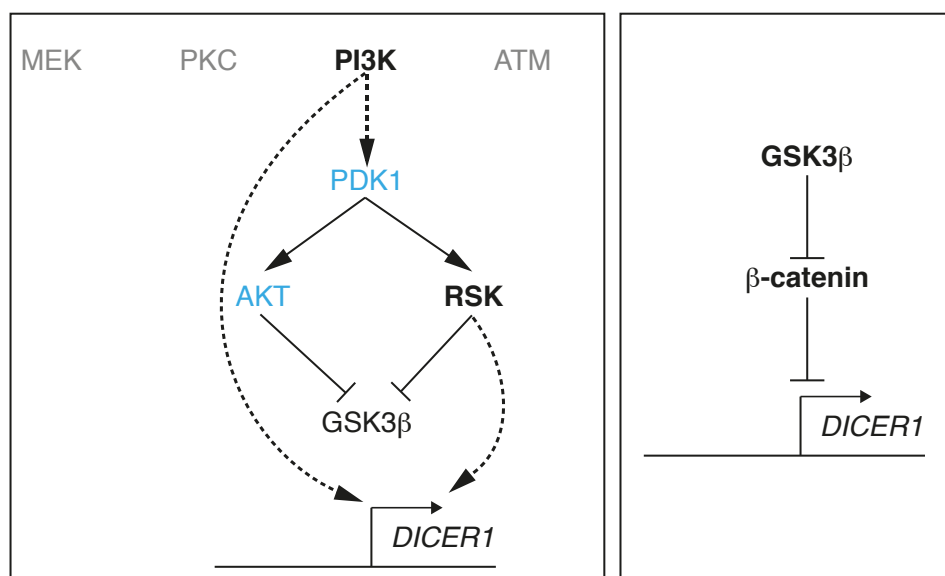
Le co-facteur β-caténine n'est pas capable de se fixer directement à l'ADN et interagit avec des facteurs de transcription pour réguler la transcription. Les facteurs de la famille LEF/TCF sont les partenaires les plus connus de β-caténine. L'analyse *in silico* de la séquence de 2,5 kb du promoteur de Dicer a révélé la présence de nombreux sites putatifs de fixation de LEF/TCF. Ces sites présentent des séquences consensus de cinq nucléotides MAMAG (M=A/C) ou CTKTK (K=G/T). Afin d'étudier l'implication de ces sites dans la répression de la transcription de Dicer par β-caténine, les sites sont mutés un à un et l'action de β-caténine sur l'activité du promoteur contenant le site muté est analysée. Le nombre important de sites putatifs pour LEF/TCF nous a conduits à utiliser la démarche suivante: les sites putatifs pour LEF/TCF ont été localisés sur le promoteur minimal et ces sites ont été supprimés pour analyser leur rôle dans la répression de Dicer par β-caténine.

Ce promoteur minimal contient trois sites putatifs LEF/TCF appelés TCFa, TCFb et TCFc. Pour chacun de ces sites, les cinq nucléotides de la séquence consensus ont été retirés et les constructions obtenues ont été transfectées dans les cellules Melan-a avec ou sans surexpression de  $\beta$ -caténine. Dans le cas des suppressions des sites TCFb (#E $\Delta$ TCFb) ou/et TCF3 (#E $\Delta$ TCFc/#E $\Delta$ TCFb,c),  $\beta$ -caténine réduit toujours l'activité luciférase à environ 0,5 (Figure 36C). Par contre lorsque le site TCFa est supprimé (#E $\Delta$ TCFa),  $\beta$ -caténine ne réduit l'activité luciférase qu'à 0,8 suggérant que ce site est impliqué dans la répression de l'activité du promoteur de Dicer par  $\beta$ -caténine. Lorsque les deux sites TCFa et TCFb sont supprimés (#E $\Delta$ TCFa,b), un résultat similaire est observé. Lorsque les trois sites TCFa, TCFb et TCFc sont supprimés (#E $\Delta$ TCFa,b,c), la répression par  $\beta$ -caténine est presque complètement abolie montrant que les trois sites coopèrent dans la répression de la transcription de Dicer par  $\beta$ -caténine. Cette analyse montre que  $\beta$ -caténine réprime la transcription de Dicer grâce à trois sites LEF/TCF mais que le site TCFa est plus fort.

L'analyse *in silico* a également révélé que le promoteur minimal contient un site putatif pour le facteur de transcription FOXO1 et un site putatif pour le facteur de transcription SOX9, deux facteurs dont les interactions avec le locus *DICER1* ont été mises en évidence par ChIP dans les cellules humaines de cancer de colon. De plus, des études ont montré que des facteurs FOXO et SOX interagissent avec  $\beta$ -caténine et/ou les facteurs TCF pour réguler la transcription (Aktary et al., 2016). Les sites putatifs ont été supprimés et les constructions obtenues ont été transfectées dans les cellules Melan-a avec ou sans surexpression de  $\beta$ -caténine. Dans les deux constructions (#E $\Delta$ FOXO1 et #E $\Delta$ SOX9),  $\beta$ -caténine réduit toujours l'activité luciférase à des niveaux non significativement différents du contrôle Full dicer (Figure 36C). Les sites FOXO1 et SOX9 ne sont donc pas impliqués seuls, dans la répression de la transcription de Dicer par  $\beta$ -caténine.

## Conclusions et perspectives

Nous avons montré que des voies impliquant de façon dépendante ou indépendante PI3K, RSK, GSK3 $\beta$  et  $\beta$ -caténine régulent la transcription de Dicer. Si l'interdépendance de ces voies n'a pas été montrée, de nombreuses études ont confirmé que PI3K induit la phosphorylation de GSK3 $\beta$  (Ser9) via AKT, et active RSK par phosphorylation (Ser227) via PDK1. RSK est également capable de phosphoryler GSK3 $\beta$  (Ser9). Les protéines PI3K et RSK activent la transcription de Dicer mais sont connues pour inactiver GSK3 $\beta$ , alors que GSK3 $\beta$  active la transcription de Dicer. L'action de PI3K et RSK sur Dicer semble donc indépendante de GSK3 $\beta$ . Par contre  $\beta$ -caténine réprime la transcription de Dicer et GSK3 $\beta$  inactive  $\beta$ -caténine donc il est possible que l'action de GSK3 $\beta$  sur la transcription de Dicer soit dépendante de  $\beta$ -caténine. (Figure 37).



**Figure 37. Deux voies indépendantes de régulation de Dicer**

Représentation des différentes voies de signalisation testées pour la régulation de Dicer. Les voies n'affectant pas le niveau d'ARNm de Dicer sont indiquées en gris (MEK, PKC, ATM). Les protéines régulant le niveau d'ARNm de Dicer sont indiquées en gras (PI3K, RSK, GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -caténine). Les protéines non testées sont indiquées en bleu (PDK1, AKT). L'interdépendance des différents facteurs dans ces voies est basée sur la littérature disponible. Les relations directes sont indiquées par des traits pleins. Les relations indirectes sont représentées par des pointillés.

Le rôle de  $\beta$ -caténine dans la régulation de Dicer a été étudié plus en détail.  $\beta$ -caténine interagit avec le locus *DICER1*, ce qui suggère que son action est directe. Cette expérience a été réalisée dans des cellules de cancer du colon, mais conforte l'idée d'une interaction de  $\beta$ -caténine avec le promoteur de Dicer. Il sera nécessaire de confirmer cette interaction dans des cellules du lignage mélanocytaire. La région du promoteur de *DICER1* amplifiée se situe

entre 205 et 345 pb en amont du site d'initiation de la transcription (TSS). Les fragments d'ADN générés par sonication sont d'environ 500 pb, ce qui localise la fixation de  $\beta$ -caténine sur une région entre 845 pb en amont et 295 pb en aval du site TSS.

Dans cette région se situent en particulier le promoteur minimal de 460 pb mis en évidence dans les cellules Melan-a, et les trois sites putatifs pour LEF/TCF impliqués dans la répression de Dicer par  $\beta$ -caténine. Nous avons montré que le site TCFa est important dans la répression de Dicer par  $\beta$ -caténine et que ce site coopère avec les sites TCFb et TCFc dont l'action individuelle est négligeable. Les sites putatifs pour FOXO1 et SOX9 ne sont pas impliqués dans la répression par  $\beta$ -caténine. Les mutations des cinq sites putatifs (FOXO1, TCFa, SOX9, TCFb, TCFc) ont été réalisées par délétion de cinq nucléotides, ce qui peut potentiellement affecter la conformation ou la configuration des régions promotrices adjacentes aux sites. Afin de renforcer les résultats, des mutations ponctuelles des différents sites LEF/TCF, FOXO1 et SOX9 seront réalisées dans le but de modifier la séquence consensus sans modifier la conformation du promoteur.

L'ensemble de ces résultats suggère que PI3K et RSK induisent ensemble ou séparément l'expression de Dicer alors que MEK, PKC et ATM ne l'affectent pas. Par une voie distincte, GSK3 $\beta$  induit l'expression de Dicer par inactivation de  $\beta$ -caténine qui réprime la transcription de Dicer en interagissant avec un facteur TCF directement sur le promoteur de Dicer grâce à un site LEF/TCF. Cette conclusion laisse plusieurs inconnues dont les facteurs de transcription en aval de PI3K et RSK et les voies en amont de GSK3 $\beta$ , impliquées dans la régulation de l'expression de Dicer.

## 2. Régulation de $\beta$ -caténine et Dicer par les UVB dans le lignage mélanocytaire et leur implication dans la réponse au stress des UV

### 2.1. Les UVB répriment la migration des mélanocytes via l'activation de $\beta$ -caténine

#### Contexte et objectifs

Les rayonnements ultraviolets (UV) terrestres proviennent des rayonnements solaires qui sont divisés en trois catégories suivant leur longueur d'onde: UVA, UVB, UVC. Les UVC et une partie des UVB, filtrés par l'atmosphère n'atteignent pas la surface de la Terre. Une partie des UVB et les UVA atteignent la surface terrestre et affectent la matière qu'ils rencontrent, dont la peau. Les UVA traversent l'épiderme, irradiant à la fois le derme et l'épiderme, alors que les UVB n'affectent que l'épiderme.

Les mélanocytes, cellules pigmentaires de la peau, se situent dans l'épiderme, à la fois dans la lame basale et dans les follicules pileux, et sont donc irradiés par les UVA et les UVB. La mélanine, synthétisée par les mélanocytes et transmise aux kératinocytes de l'épiderme, a pour fonction principale la protection contre les rayonnements UV. La transformation maligne des mélanocytes peut entraîner la formation de mélanomes.

Le facteur multifonctionnel  $\beta$ -caténine a un rôle crucial dans la mise en place et le fonctionnement des mélanocytes. Au niveau moléculaire,  $\beta$ -caténine participe à l'adhésion cellule-cellule, à la signalisation cellulaire et à la régulation de l'expression génique au niveau transcriptionnel (Aktary et al., 2016). Au niveau cellulaire, l'absence de  $\beta$ -caténine dans le lignage mélanocytaire bloque la prolifération des mélanoblastes et conduit à la naissance d'une souris blanche (Luciani et al., 2011). Paradoxalement,  $\beta$ -caténine réprime la prolifération et la migration des mélanocytes, mais induit l'immortalisation et la formation de métastases des cellules de mélanome (Delmas et al., 2007, Gallagher et al., 2013). L'activation de  $\beta$ -caténine a d'ailleurs été observée dans 30% des mélanomes humains où  $\beta$ -caténine est localisé dans le noyau et/ou cytoplasme des cellules (Rimm et al., 1999). Cependant,  $\beta$ -caténine n'est muté que dans 3 à 5% des mélanomes, suggérant que l'activation de  $\beta$ -caténine est indépendante de modifications génétiques. Nous avons supposé que les UV, facteur de risque majeur dans le mélanome, seraient un facteur non-génétique, ou allogénétique, d'activation de  $\beta$ -caténine. L'objectif de cette partie est d'étudier l'effet des UV sur l'activité de  $\beta$ -caténine et d'évaluer son rôle dans la réponse des mélanocytes aux UV.

## Résumé en français

L'exposition de la peau aux rayonnements ultraviolets (UV) peut avoir des effets bénéfiques ou délétères: elle peut entraîner, par exemple, l'augmentation de la pigmentation et de la synthèse de vitamine D, mais aussi l'inflammation et des cancers cutanés. Les UVB peuvent induire des altérations génétiques et épigénétiques et avoir des effets réversibles associés à des modifications post-transcriptionnelles ou de l'expression génique.  $\beta$ -caténine est l'un des principaux facteurs du développement des mélanocytes; bien que peu muté dans les mélanomes, ses localisations et activités cellulaires sont fréquemment altérées. Nous avons ici évalué les conséquences des UVB sur  $\beta$ -caténine dans le lignage mélanocytaire. Nous avons rapporté que *in vivo*, les UVB induisent la relocalisation cytoplasmique/nucléaire de  $\beta$ -caténine dans les mélanocytes de peau de nouveau-nés murins et d'adultes humains. Dans des lignées de mélanocytes murins et de cellules de mélanomes humains *in vitro*, les UVB augmentent la stabilité de  $\beta$ -caténine, son accumulation dans le noyau et son activité co-transcriptionnelle, induisant la répression de la motilité et de la vitesse cellulaire. L'activation de la signalisation  $\beta$ -caténine par les UVB et son effet sur la migration sont accrus par un inhibiteur de GSK3 $\beta$ , et réduits par un inhibiteur de  $\beta$ -caténine. Pour conclure, les UVB répriment la migration des mélanocytes et ce en régulant l'axe GSK3- $\beta$ -caténine.



## Article

### **UVB represses melanocyte cell migration and acts through $\beta$ -catenin.**

Juliette U. Bertrand<sup>1,2,3\*</sup>, Valérie Petit<sup>1,2,3\*</sup>, Elke Hacker<sup>4</sup>, Irina Berlin<sup>1,2,3</sup>, Nicholas K. Hayward<sup>4</sup>, Marie Pouteaux<sup>1,2,3</sup>, Evelyne Sage<sup>1,2,3</sup>, David C. Whiteman<sup>4</sup> & Lionel Larue<sup>1,2,3#</sup>.

<sup>1</sup> Institut Curie, PSL Research University, INSERM U1021, Normal and Pathological Development of Melanocytes, Orsay, France,

<sup>2</sup> Univ Paris-Sud, Univ Paris-Saclay, CNRS UMR 3347, Orsay, France,

<sup>3</sup> Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Orsay, France

<sup>4</sup> Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Queensland, Australia

\* These authors contributed equally to this work.

# Corresponding author: Lionel LARUE

e-mail: [lionel.larue@curie.fr](mailto:lionel.larue@curie.fr) ; Tel: +33 169867107; Fax: +33 169867109

Key words : BIO inhibitor, CHIR99021 inhibitor, human skin, iCRT3 inhibitor, mouse skin, p38



## 2. Régulation de $\beta$ -caténine et Dicer par les UVB dans le lignage mélanocytaire et leur implication dans la réponse au stress des UV

### 2.2. Les UVB répriment l'expression de Dicer via $\beta$ -caténine

#### Contexte et objectifs

Les UVB solaires constituent un stress pour les cellules de la peau et induisent des effets bénéfiques, tels que la synthèse de vitamine D, et délétères, tels que l'inflammation et la formation de cancers cutanés. Les mélanocytes de l'épiderme sont irradiés par les UVB solaires qui activent la mélanogenèse et peuvent induire la formation de mélanomes. L'utilisation d'UVB artificiels dans le traitement du vitiligo induit la re-pigmentation progressive des régions dépigmentées de l'épiderme appauvries en mélanocytes.

Nous avons montré, dans la partie 1 des résultats, que la mise en place et le fonctionnement du lignage mélanocytaire sont dépendants de Dicer. L'absence de Dicer dans les mélanoblastes induit une hypopigmentation à la naissance et un blanchiment progressif. L'absence de Dicer dans les mélanocytes affecte leur localisation dans la papille dermique du bulbe et induit la formation de poils blancs. En conditions normales, l'expression de Dicer est régulée positivement par PI3K et RSK et négativement par  $\beta$ -caténine dans le lignage mélanocytaire. La régulation de Dicer par des facteurs internes ou externes est susceptible de moduler la pigmentation du poil.

L'expression de Dicer est régulée par différents stress dans différents lignages cellulaires *in vitro*. Son expression est réprimée par les phorbols esters, l'interféron  $\alpha$ , la privation de sérum et l'hypoxie dans différents types cellulaires; elle est induite par l'interféron  $\gamma$  dans une lignée de trophoblastes humains (Wiesen and Tomasi, 2009). De plus, Dicer participe au recrutement de la machinerie du NER, qui répare les dommages induits par les UVB, en favorisant l'ouverture de la chromatine (Chitale and Richly, 2017). Nous nous sommes demandé si l'expression de Dicer est également régulée par le stress des UVB.

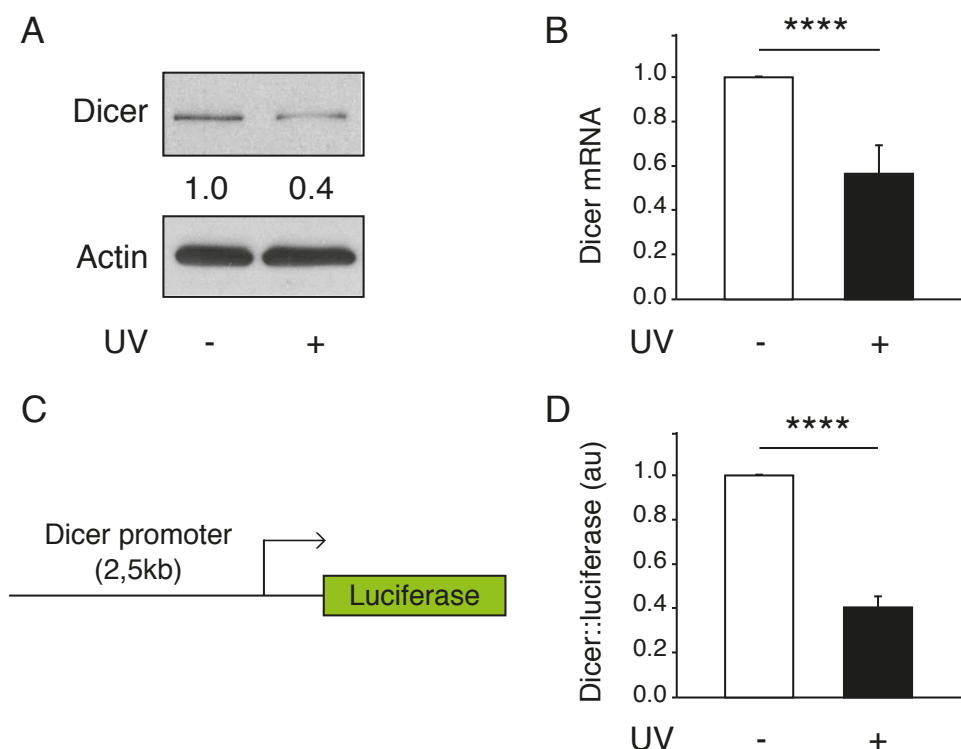
Dans l'article précédent, nous avons montré que les UVB induisent la localisation nucléaire de  $\beta$ -caténine et augmentent son activité transcriptionnelle dans le lignage mélanocytaire. Dans la partie 1 des résultats, nous avons également mis en évidence une voie de répression de la transcription de Dicer par  $\beta$ -caténine via un site LEF/TCF. Nous faisons l'hypothèse suivante: les UVB activent  $\beta$ -caténine qui réprime la transcription de Dicer; les

UVB réprimeraient ainsi la transcription de Dicer dans le lignage mélanocytaire. L'objectif de cette partie est donc d'étudier si l'expression de Dicer est régulée par les UVB dans le lignage mélanocytaire et de vérifier l'implication potentielle de  $\beta$ -caténine dans cette régulation. Dans l'éventualité d'une régulation de Dicer par les UVB, le rôle de cette régulation dans la réponse au stress sera analysé dans le lignage mélanocytaire.

## Résultats

### Répression de Dicer par les UVB.

Afin d'étudier la régulation de Dicer par les UVB, différentes lignées cellulaires du lignage mélanocytaire (mélanome humain MNT-1, Lu1205, Mel501, WM852, mélanocytes murins Melan-a) ont été irradiées *in vitro* avec une dose de 25 mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB produits par une lampe VL-330.

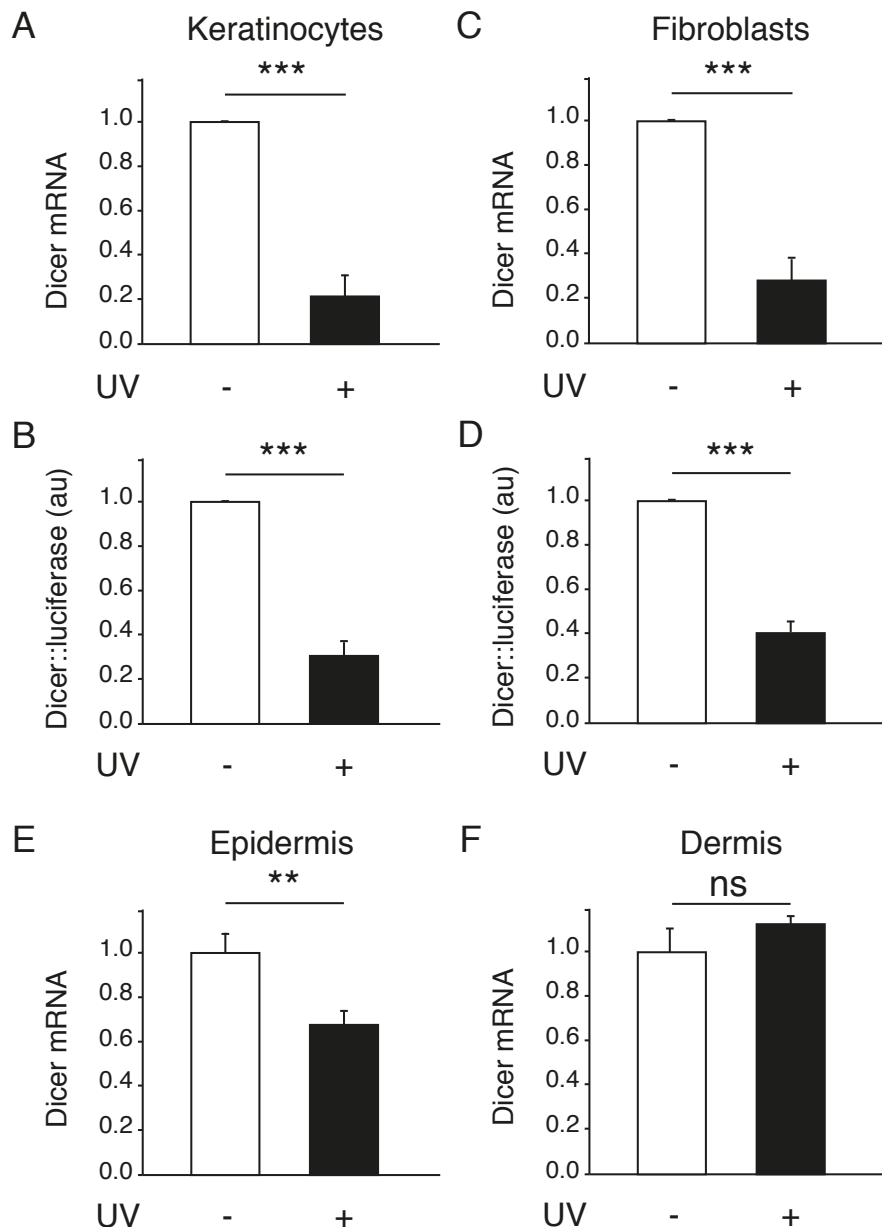


**Figure 38. Répression de Dicer par les UVB dans le lignage mélanocytaire**

(A) Niveaux protéiques de DICER endogène dans des cellules MNT-1 15h après irradiation (+) ou non (-) avec 25 mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB. L'actine est utilisée comme contrôle de charge. Quantification avec imageJ du niveau de Dicer normalisé par rapport au niveau d'actine correspondant. (B) Niveaux d'ARNm de *DICER1* endogène dans des cellules MNT-1 15h après irradiation (+) ou non (-) avec 25 mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB. Les valeurs Ct (de l'ordre de 25) obtenues par PCR quantitative ont été rapportées aux valeurs du gène de ménage *GAPDH* puis les ratios ont été normalisés par rapport au contrôle non irradié par la méthode  $\Delta\Delta C_t$ . (C) Construction rapporteur (Dicer::luc) exprimant la luciférase *firefly* sous le contrôle du promoteur humain de Dicer (2,5 kb). (D) Activité luciférase dans des cellules de mélanome humain MNT-1 après irradiation UVB ou non. Les cellules ont été irradiées (+) ou non (-) avec 25 mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB 33h après transfection avec Dicer::luc et lysées 15h après irradiation, soit 48h après transfection. Les valeurs de luciférase *firefly* sont rapportées aux valeurs de luciférase *renilla* respectives puis les ratios ont été normalisés par rapport au contrôle non irradié. au, unité arbitraire. La moyenne et l'écart-type sont présentés pour au moins trois expériences indépendantes. Analyses statistiques par t-test: \*\*\*\* p-value < 10<sup>-4</sup>.

Une diminution du niveau de protéine et d'ARNm de Dicer a été observée 15h après irradiation de cellules de mélanome humain MNT-1 (Figure 38A,B). L'activité du promoteur

de Dicer a été rapportée grâce à une construction luciférase contenant une séquence d'environ 2,5 kb en amont du site d'initiation de la transcription de *DICER1* (Figure 38C). L'activité du promoteur de Dicer est également réduite 15h après irradiation UVB de cellules de mélanome humain MNT-1 (Figure 38D). Des résultats similaires ont été observés dans des mélanocytes murins Melan-a irradiés avec 25 mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB, dans des cellules de mélanome humain MNT-1, Lu1205, Mel501, WM852 et dans des mélanocytes murins Melan-a irradiés avec 100 mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB.



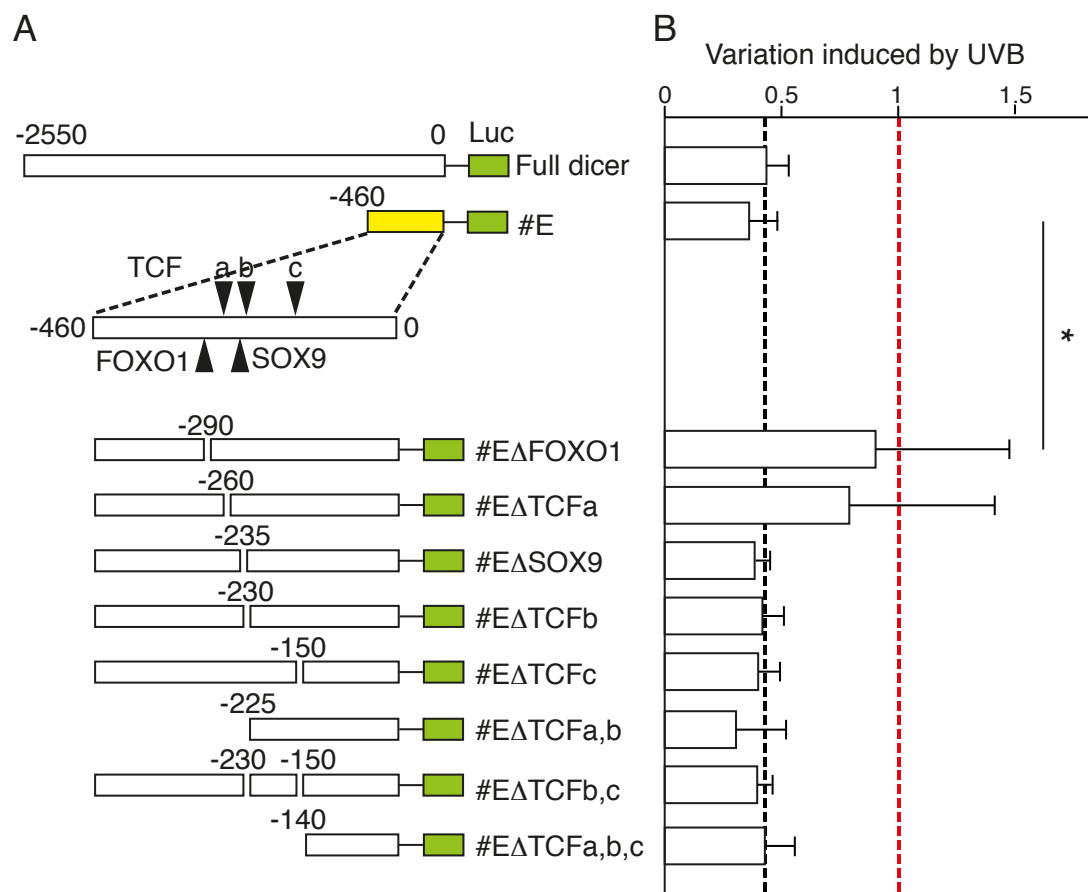
**Figure 39. Répression de Dicer par les UVB dans des cellules non mélanocytaires**  
(A,C,E,F) Niveaux d'ARNm de *Dicer1* endogène dans des kératinocytes XB2 (A) et des fibroblastes NIH3T3 (C) murins 15h après irradiation (+) ou non (-) avec 100mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB et dans l'épiderme (E) et le derme (F) de peaux de souris 15h après irradiation (+) ou non (-) avec 100mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB. Les valeurs Ct obtenues par PCR quantitative ont été rapportées aux valeurs du gène de

ménage *Hprt* puis les ratios ont été normalisés par rapport au contrôle non irradié par la méthode  $\Delta\Delta Ct$ . (B,D) Activité luciférase de la construction Dicer::luc transfectée dans des kératinocytes XB2 (B) et des fibroblastes NIH3T3 (D) après irradiation UVB ou non. Les cellules ont été irradiées (+) ou non (-) avec 100mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB 33h après transfection avec Dicer::luc et lysées 15h après irradiation, soit 48h après transfection. Les valeurs de luciférase *firefly* sont rapportées aux valeurs de luciférase *renilla* respectives puis les ratios ont été normalisés par rapport au contrôle non irradié. au, unité arbitraire. La moyenne et l'écart-type sont présentés pour au moins trois expériences indépendantes. Analyse statistique par t-test: \*\*\* p-value < 10<sup>-3</sup>, \*\* p-value < 10<sup>-2</sup>, ns :non significatif.

La diminution du niveau d'ARNm de Dicer et de l'activité de son promoteur a été observée *in vitro* dans des kératinocytes XB2 (Figure 39A,B) et fibroblastes NIH3T3 (Figure 39C,D) murins 15h après irradiation avec 100 mJ/cm<sup>2</sup>. La répression de Dicer par les UVB n'est pas spécifique au lignage mélanocytaire et semble donc indépendante de M-Mitf. Une diminution du niveau d'ARNm de Dicer a également été observée 15h après irradiation de souriceaux (P1) avec 100 mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB, dans l'épiderme composé majoritairement de kératinocytes. Aucune variation du niveau d'ARNm de Dicer n'a été observée dans le derme des souriceaux irradiés, rappelant que les UVB ne pénètrent pas dans le derme (Figure 39E,F).

#### *Répression de la transcription de Dicer via des sites LEF/TCF et FOXO1.*

Sachant que  $\beta$ -caténine est activée par les UVB et que  $\beta$ -caténine réprime la transcription de Dicer via un site LEF/TCF, nous avons supposé que les UVB répriment la transcription de Dicer via  $\beta$ -caténine et un site LEF/TCF. Afin de vérifier cette hypothèse, la construction rapporteur (Full dicer) et la construction contenant le promoteur minimal de Dicer mis en évidence dans la partie 1 des résultats (#E) ont été transfectées dans les cellules de mélanome humain MNT-1 avant irradiation avec 25 mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB. L'activité luciférase de chacune des constructions a été analysée 15h après irradiation, révélant une diminution à 0,4 dans les cellules irradiées par rapport aux cellules contrôles (Figure 40B). Ce résultat confirme que le promoteur minimal est également réprimé par les UVB.



**Figure 40. Répression de l'activité du promoteur de Dicer par les UVB via des sites FOXO et TCF**

(A) Constructions rapporteurs des activités de différentes portions du promoteur de Dicer humain. (B) Les cellules de mélanome humain MNT-1 ont été co-transfectées avec les différentes constructions rapporteurs exprimant la *firefly* luciférase et un vecteur contrôle exprimant la *renilla* luciférase. Les cellules ont été irradiées ou non avec 25mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB 33h après transfection et lysées 15h après irradiation, soit 48h après transfection. Les valeurs de *firefly* luciférase sont rapportées aux valeurs de *renilla* luciférase respectives puis les ratios ont été normalisés par rapport à la valeur du "Full dicer - UV". La valeur de répression par les UVB est le rapport entre l'activité luciférase normalisée après irradiation et l'activité luciférase normalisée en absence d'irradiation. La moyenne et l'écart-type sont présentés pour au moins trois expériences indépendantes. Analyses statistiques par t-test: \* p-value < 0,05. L'absence d'indication statistique représente une différence non significative par rapport au contrôle "Full dicer".

Le promoteur minimal contient trois sites putatifs pour LEF/TCF appelés TCFa, TCFb et TCFc (Figure 40A). Chacun de ces sites a été muté par délétion des cinq nucléotides de la séquence consensus et les constructions obtenues ont été transfectées dans les cellules MNT-1. Ces cellules ont ensuite été irradiées ou non avec 25 mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB et l'activité luciférase de chacune des constructions a été analysée 15h après irradiation. Lorsque les sites TCFb ou TCFc sont supprimés, les UVB réduisent l'activité luciférase de la même façon que dans la construction Full dicer à 0,4 suggérant que ces sites ne sont pas impliqués dans la répression de Dicer par les UVB (Figure 40B). Par contre quand le site TCFa est supprimé, la



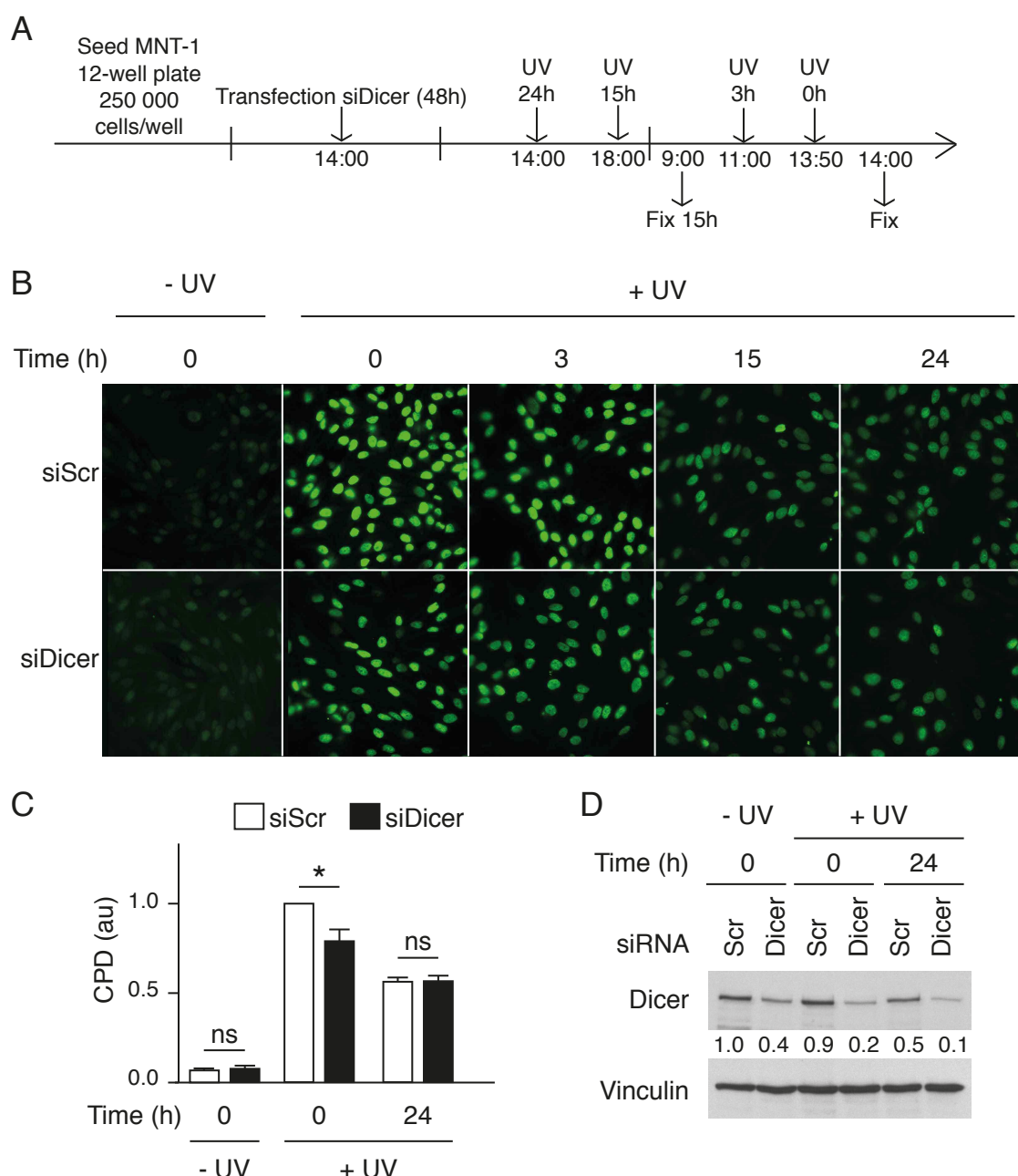
répression de l'activité luciférase par les UVB semble abolie, montrant que le site TCFA est nécessaire à la répression de Dicer par les UVB (Figure 40B). Ce même site TCFA est impliqué dans la répression de la transcription de Dicer par  $\beta$ -caténine. Ce résultat montre que les UVB répriment Dicer via  $\beta$ -caténine et le site TCFA.

Le promoteur minimal de Dicer contient également un site putatif pour FOXO1 et un site putatif pour SOX9 (Figure 40A). Il a été montré que des facteurs FOXO et SOX participent à des complexes de régulation transcriptionnelle impliquant  $\beta$ -caténine et éventuellement TCF (Aktary et al., 2016). De plus, un autre facteur de la famille FOXO, FOXO4, est activé par  $\beta$ -caténine en réponse à un stress oxydatif (Essers et al., 2005) et le facteur SOX9 est activé par les UVB (Passeron et al., 2007). La littérature, ainsi que les résultats du ChIP de FOXO1 et SOX9 ayant révélé leur interaction avec le locus *DICER1*, ont amené l'hypothèse que un ou deux de ces sites pourraient être impliqués dans la répression de Dicer par les UVB.

Les deux sites putatifs pour FOXO1 et SOX9 ont été mutés par délétion de cinq nucléotides et les constructions obtenues ont été transfectées dans les cellules MNT-1 avant irradiation ou non avec 25 mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB. Lorsque le site FOXO1 est supprimé, la répression de l'activité luciférase par les UVB est abolie (Figure 40A,B), montrant que le site FOXO1 est impliqué dans la répression de Dicer par les UVB. Par contre le site SOX9 n'est pas impliqué dans la régulation de l'activité du promoteur de Dicer par les UVB (Figure 40B). Cette expérience montre que le site de FOXO1 pourrait être impliqué dans la répression de Dicer par les UVB, mais des expériences complémentaires sont nécessaires pour mettre en évidence la régulation de FOXO1 par les UVB dans le lignage mélanocytaire, l'interaction de FOXO1 avec le promoteur de Dicer en condition de stress UVB, le rôle du facteur FOXO1 dans la répression de Dicer, et l'éventuelle présence de FOXO1 dans un complexe protéique avec  $\beta$ -caténine.

#### *Conséquences cellulaires de la réduction du niveau de Dicer dans le lignage mélanocytaire.*

Nous avons montré dans la partie 1 des résultats que la réduction du niveau de Dicer grâce à un siARN dirigé contre Dicer augmente le niveau de mélanine des mélanocytes murins Melan-a ou des cellules de mélanome humain MNT-1, et réduit la migration et l'invasion des cellules Melan-a *in vitro*. Les UVB induisent des dommages de l'ADN, principalement des CPD et 6-4PP. Nous nous sommes demandé si le niveau de Dicer affecte la formation ou la réparation de ces dommages.



**Figure 41. Réduction des CPD induits par les UVB après diminution de l'expression de Dicer**

(A) Représentation temporelle du schéma de l'expérience. (B,C) Immunomarquage (B) et quantification par ELISA (C) du niveau des CPD 48h après transfection d'un siARN dirigé contre Dicer (siDicer) ou contre une séquence non spécifique (siScr) dans des cellules de mélanome humain MNT-1 non irradiées (- UV) ou 10 min (0), 3h (3), 15h (15) ou 24h (24) après irradiation avec 25mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB (+ UV). (D) Niveau de protéine de Dicer dans des cellules de mélanome humain MNT-1 transfectées avec un siARN dirigé contre Dicer (siDicer) ou contre une séquence non spécifique (siScr). La vinculine est utilisée comme contrôle de charge. Quantification avec ImageJ du niveau de Dicer normalisé par rapport au niveau de vinculine correspondant. La moyenne et l'écart-type sont présentés pour au moins trois expériences indépendantes. Analyses statistiques par t-test: \* p-value <0,05, ns : non significatif.

Le niveau d'ARNm et de protéine de Dicer a été réduit *in vitro* grâce à un siARN dirigé contre Dicer dans les cellules MNT-1 avant irradiation avec 25 mJ/cm<sup>2</sup> d'UVB (Figure 41D). Les cellules ont été collectées à différents temps après irradiation, mais toujours 48h après transfection du siARN (Figure 41A). Le niveau de CPD a été analysé par immunomarquage sur cellules fixées et par ELISA sur l'ADN extrait des cellules. En condition contrôle (siScr), l'absence d'irradiation est associée à une absence de CPD. Le marquage des CPD est maximal après irradiation (10 min et 3h) puis décroît (15h et 24h) (Figure 41B,C). La même tendance est observée dans les cellules siDicer mais le marquage maximal des CPD à 10 min est inférieur au contrôle (Figure 41B,C). Sachant que la réparation des CPD est un processus lent, ce résultat suggère un effet protecteur du siDicer relativement à la formation des CPD dans les cellules MNT-1 et non un effet sur leur réparation.

## Conclusions et perspectives

Nous avons montré que les UVB répriment l'expression de Dicer en inhibant sa transcription. Une diminution de l'ARNm est observée dès 5h après irradiation mais la diminution de la protéine est observée 15h après irradiation. Cette observation suggère (i) que la protéine Dicer est relativement stable et (ii) que la régulation de Dicer par les UVB est une réponse lente au stress. La répression de Dicer par les UVB n'est pas spécifique des mélanocytes puisqu'elle a été observée dans des kératinocytes *in vitro* et *in vivo* dans l'épiderme. La répression de Dicer observée *in vitro* dans les fibroblastes n'est pas retrouvée *in vivo* dans le derme, tout simplement parce que les UVB sont filtrés par l'épiderme et n'atteignent pas le derme.

Plus précisément, au niveau du promoteur de Dicer, nous avons montré que les UVB répriment la transcription de Dicer grâce à un site LEF/TCF et à un site FOXO1. Sachant que  $\beta$ -caténine réprime directement la transcription de Dicer par ce même site LEF/TCF et que l'activité co-transcriptionnelle de  $\beta$ -caténine est augmentée par les UVB, ce résultat indique que  $\beta$ -caténine réprime la transcription de Dicer en réponse aux UVB. L'activation de  $\beta$ -caténine a également été observée dans des kératinocytes en culture, ce qui conforte l'idée que ce mécanisme serait commun aux cellules de l'épiderme.

L'implication du site FOXO1 dans la répression de Dicer suggère deux mécanismes possibles: (i) FOXO1 participe au même complexe que LEF/TCF et réprime la transcription de Dicer en présence de  $\beta$ -caténine, (ii) FOXO1 réprime la transcription de Dicer indépendamment de  $\beta$ -caténine. La régulation de ces deux mécanismes par les UVB peut être (a) uniquement dépendante de  $\beta$ -caténine, FOXO1, constitutivement présent, n'aurait une fonction répressive qu'en présence de  $\beta$ -caténine, ou (b) indépendante de  $\beta$ -caténine, c'est-à-dire que FOXO1 serait activé par une voie indépendante de  $\beta$ -caténine après UVB. Ces hypothèses amènent donc quatre voies de régulation possibles. Les résultats obtenus soutiennent l'hypothèse (i) plutôt que l'hypothèse (ii) car la suppression de l'un ou l'autre des sites TCFa ou FOXO1 abolit totalement la répression par les UVB, montrant que ces deux sites coopèrent et sont nécessaires ensemble pour la répression. Les résultats actuels ne permettent pas de conclure sur les hypothèses (a) et (b).

Nous avons enfin questionné le sens biologique de la répression de Dicer par les UVB dans les mélanocytes. Différents processus cellulaires ont été analysés dans la partie 1 des résultats, en particulier la diminution du niveau de Dicer dans les mélanocytes augmente la quantité de mélanine et diminue la migration et l'invasion des cellules. Il est bien connu que les UV augmentent la synthèse de mélanine grâce à l'induction de l'expression de MITF et des enzymes de la mélanogenèse, mais l'implication de Dicer dans cette réponse n'a pas été mise en évidence. Nous avons également observé que les UVB réduisent la migration des mélanocytes, tout comme  $\beta$ -caténine, ce qui est cohérent avec la réduction de migration observée après réduction du niveau de Dicer. Dicer pourrait donc être impliqué dans la répression de migration de mélanocytes observée après irradiation.

La diminution du niveau de Dicer protège également les mélanocytes des dommages de l'ADN induits par les UVB. Aucun mécanisme n'est actuellement connu pour augmenter l'efficacité de réparation du NER, donc l'effet d'une diminution de Dicer sur la machinerie de réparation est difficile à comprendre. L'hypothèse la plus simple pour expliquer cette protection contre les dommages de l'ADN repose sur la corrélation entre la diminution du niveau de Dicer et l'augmentation de la mélanine qui protège les cellules contre les rayonnements UV. Biologiquement, la répression de Dicer pourrait être justifiée dans un contexte d'irradiations successives: la première irradiation réprime l'expression de Dicer dont le niveau diminue avec un effet protecteur pour les irradiations suivantes.

## DISCUSSION



## DISCUSSION

L'objectif de cette thèse était de comprendre le rôle et la régulation de Dicer dans le lignage mélanocytaire dans des conditions normales et de stress UVB. J'ai montré que Dicer est nécessaire à la mise en place et au fonctionnement du lignage mélanocytaire dans un mutant murin de Dicer. L'absence de Dicer dans le lignage mélanocytaire adulte entraîne la localisation anormale des mélanocytes de la papille dermique dans le follicule pileux *in vivo*, associée à la formation de poils blancs, responsables d'une hypopigmentation du pelage. *In vitro*, une réduction du niveau de Dicer réprime la migration et l'invasion des mélanocytes en culture et augmente la quantité de mélanine par mélanocyte. L'expression de Dicer est régulée par modulation de l'activité de PI3K, RSK, GSK3 $\beta$  et  $\beta$ -caténine *in vitro* en condition normale. La protéine  $\beta$ -caténine interagit avec le promoteur de Dicer et réprime sa transcription via des sites LEF/TCF. En condition de stress UVB,  $\beta$ -caténine est relocalisée de la membrane vers le noyau des mélanocytes où elle régule l'expression génique par interaction avec les facteurs LEF/TCF, entre autres, et réprime la migration des mélanocytes *in vitro*. Après irradiation, la transcription de Dicer est réprimée via des sites LEF/TCF et FOXO1. La diminution de Dicer *in vitro* protège les cellules des dommages CPD induits par les UVB.

### 1. Rôle de Dicer en conditions normales et de stress UVB

#### 1.1. Dicer dans la pigmentation

La fonction de la protéine Dicer dans différents lignages cellulaires a été associée à l'apoptose et à la mise en place de ces lignages (Andl et al., 2006, Cobb et al., 2005, Harfe et al., 2005, Lyle et al., 2014, Nowakowski et al., 2013, Pang et al., 2014, Saurat et al., 2013, Yi et al., 2006). Nous avons montré que Dicer est nécessaire à l'établissement embryonnaire du lignage mélanocytaire, à la localisation appropriée des mélanocytes différenciés du follicule pileux et que Dicer régule la migration et la différenciation des mélanocytes.

L'invalidation de Dicer dans le lignage mélanocytaire pendant le développement embryonnaire entraîne un pelage blanc et l'absence de mélanocytes chez la souris adulte (Levy et al., 2010). Nous avons confirmé cette observation avec un autre mutant inductible de

Dicer (Murchison et al., 2005) et avons observé plus précisément que la perte de pigmentation est progressive de la naissance jusqu'à l'âge adulte suggérant que la disparition des mélanocytes n'est pas liée à l'apoptose des mélanoblastes. Cette disparition peut être causée par un épuisement précoce des McSC, ou une perte de leur capacité à se différencier en mélanocytes. Le transgène rapporteur Dct::LacZ permet de suivre le lignage mélanocytaire en particulier pendant le développement embryonnaire. Un mutant murin exprimant ce transgène a été utilisé dans les travaux de Levy et al. (2010) pour mettre en évidence l'absence de mélanocytes chez le mutant de Dicer adulte. Afin d'élucider les mécanismes embryonnaires liés à la disparition des mélanocytes adultes, nous allons suivre le lignage mélanocytaire chez l'embryon (Dct::LacZ<sup>/o</sup> ; Tyr::Cre<sup>/o</sup> ; Dicer F/F) et son contrôle afin d'observer une éventuelle différence dans le nombre des mélanoblastes pouvant expliquer l'épuisement rapide du *pool* de McSC.

Afin d'étudier le rôle de Dicer plus précisément dans le fonctionnement des mélanocytes adultes, Dicer a été invalidé à la naissance. Dans ce cas, souris mutantes et contrôles possèdent le même nombre de mélanoblastes à la naissance. L'hypopigmentation est observée dès le premier cycle pileux embryonnaire avec un phénotype "poivre et sel" caractérisé par un mélange de poils noirs et blancs. L'observation phénotypique d'hypopigmentation indique une anomalie de fonctionnement du lignage mélanocytaire mais ne permet pas de distinguer les mécanismes cellulaires associés: diminution du nombre de mélanocytes dans le bulbe ou défaut de mélanogenèse. Les cellules du lignage mélanocytaire peuvent être localisées sur coupes de peau grâce au mutant rapporteur Dct::LacZ, nécessitant la génération d'un triple mutant, ou par immunomarquage dirigé directement contre Dct. Dans une optique de rapidité, nous avons réalisé un immunomarquage contre Dct sur coupes de peau afin de localiser les cellules du lignage mélanocytaire dans les follicules pileux des souris mutantes et contrôles. La présence de cellules Dct<sup>+</sup> dans les follicules de poils blancs en anagène tardive contredit l'hypothèse que toutes les cellules mélanocytaires meurent par apoptose en absence de Dicer. Bien que la structure générale des follicules de poils blancs soit conservée, l'anomalie de localisation des mélanocytes dans ces follicules indique que Dicer est important dans la migration des mélanocytes différenciés ou en différenciation vers la papille dermique du bulbe. Dans la littérature, des phénotypes similaires de localisation anormale des mélanocytes du follicule ont été observés chez d'autres mutants murins. L'invalidation de Notch dans le lignage mélanocytaire induit une différenciation précoce des McSC en mélanocytes



pigmentés dans le bulge associée à une hypopigmentation partielle, puis un épuisement des McSC associé à un pelage blanc. De plus, la localisation ectopique de mélanocytes différenciés pigmentés est observée dans le derme autour du follicule ou de la racine du poil, probablement issus des mélanocytes précocement différenciés dans le bulge (Aubin-Houzelstein et al., 2008). L'invalidation de *Nfib* dans les cellules souches *Sox9*<sup>+</sup> n'affecte pas la pigmentation du poil mais entraîne l'accumulation et la différenciation ectopique de mélanocytes en télogène du cycle pileux. Cette étude a mis en évidence *Edn2*, comme cible transcriptionnelle de *NFIB*, impliquée dans la prolifération et la différenciation ectopique (Chang et al., 2013).

Il est important de noter que l'hypopigmentation observée chez le mutant de *Dicer* est phénotypique mais non cellulaire. Nous avons montré, *in vitro*, que la diminution du niveau de *Dicer* dans les mélanocytes augmente le niveau de mélanine. L'hypopigmentation des poils mutants est due à un défaut de localisation et non pas à un défaut de mélanogenèse puisque les mélanocytes sont pigmentés. Il est d'ailleurs possible qu'une différenciation ectopique se produise *in vivo* dans des régions anormales du follicule à certains stades du cycle pileux, comme chez les mutants de *Notch* et *Nfib* (Aubin-Houzelstein et al., 2008, Chang et al., 2013). Cette hypothèse devra être confirmée par un test TTA (Tyramide-based tyrosinase assay), rapportant l'activité de l'enzyme tyrosinase, à différents stades du cycle pileux chez les souris mutantes et sauvages.

L'ensemble de cette étude *in vivo* s'est principalement focalisé sur le rôle de *Dicer* dans la pigmentation du poil de souris. La structure du poil murin étant similaire à celle du poil humain, cette étude peut être rapprochée du phénotype de blanchiment du poil ou du cheveu humain. L'absence ou la sous-expression de *Dicer* dans les mélanocytes pourrait ainsi induire chez l'Homme un phénotype "poivre et sel" par des mécanismes similaires à ceux observés chez la souris. L'hypopigmentation est également observée sur la queue des souris mutantes *Dicer* avec un blanchiment important. L'épiderme de la queue est composé de structures différenciées formées principalement de kératinocytes en écailles. Dans l'épiderme de la queue de souris, comme dans les oreilles, les pattes de souris ou l'épiderme humain, les mélanocytes sont interfolliculaires. Cette structure étant plus proche de l'épiderme humain, l'hypopigmentation de la queue suggère que l'absence de *Dicer* pourrait également induire chez l'Homme une dépigmentation de l'épiderme. Le mécanisme de blanchiment de la queue n'a pas été analysé. En supposant que les mélanocytes folliculaires ont un fonctionnement

proche des mélanocytes interfolliculaires, il est possible que l'absence de Dicer affecte la localisation des mélanocytes différenciés interfolliculaires de l'épiderme de souris et par extension de l'épiderme humain.

Cependant, aucune mutation homozygote de *DICER* n'est observée chez l'Homme puisqu'induisant probablement une létalité. Les mutations hétérozygotes de *DICER1* sont associées au syndrome *DICER1* qui est caractérisé par des tumeurs pédiatriques mais n'inclut pas de symptômes pigmentaires (Foulkes et al., 2014). Aucune modification génétique ne permet d'extrapoler sur l'Homme le phénotype observé chez la souris. Des modifications épigénétiques, ou plus simplement, des dérégulations transitoires de l'expression de Dicer pourraient être à l'origine d'hypopigmentations transitoires des poils, cheveux ou épiderme chez l'Homme. Dicer est réprimé par différents stress, et différents phénotypes d'hypopigmentation, tels que la canitie ou le vitiligo, sont connus pour être induits par des stress. Il est donc possible que Dicer intervienne dans l'initiation de ces processus.

## 1.2. Dicer dans la migration

Nous avons également observé *in vitro* que la migration des mélanocytes est réduite après diminution du niveau de Dicer, d'où notre hypothèse que l'anomalie de localisation des mélanocytes du mutant murin de Dicer est associée à un défaut de migration des TAC ou des mélanocytes différenciés. La migration de mélanocytes *in vivo* est bien plus complexe que celle des mélanocytes *in vitro*. Deux caractéristiques sont à envisager: (i) la capacité des cellules à migrer qui dépend de la formation de structures cellulaires permettant la fixation à la matrice et aux cellules adjacentes, et (ii) l'orientation prise qui dépend de la communication avec les cellules dans un environnement plus ou moins proche. Les mécanismes moléculaires de la migration des mélanocytes *in vivo* ne sont pas totalement compris puisque l'étude de la migration a principalement été réalisée *in vitro* sur des modèles 2D et 3D. La migration 3D, plus proche de la migration des mélanocytes *in vivo*, suit deux modes mésenchymateux ou amiboïdes (Friedl and Wolf, 2010). La migration mésenchymateuse, mécanisme orienté, est basée sur la formation de protrusions, lamellipodes ou filopodes, par extension membranaire et adhésion, puis traction du corps cellulaire. Les protéines impliquées dans la régulation de la polymérisation ou de la dynamique du cytosquelette d'actine, comme Rac et Cdc42, ainsi que les protéines d'interaction avec la matrice extracellulaire et les cellules environnantes, comme les intégrines et les cadhérines,

sont nécessaires à ce type de migration. La migration amiboïde, associée à une morphologie arrondie, est basée sur la formation de *blebs*, extensions sphériques membranaires dépourvues d'actine, et permet à la cellule de s'insérer dans les cavités naturelles de la matrice (Domingues et al., 2013, Petit and Larue, 2016).

Dicer, par sa fonction dans la maturation des microARN, participe à la régulation de l'expression de molécules d'ancrage telles que les intégrines et cadhérines. Dans le lignage mélanocytaire, des microARN ont principalement été associés à l'invasion des cellules de mélanomes et peu à l'invasion des mélanocytes non transformés. Ainsi les miR-125b, miR-145, miR-211, miR-451a, miR-675 sont impliqués dans la migration, l'EMT, la progression ou l'invasion des cellules de mélanomes (Babapoor et al., 2014, Dynoodt et al., 2013, Kim et al., 2014, Margue et al., 2013, Rambow et al., 2016). De plus, des microARN sont transportés par les mélanosomes issus de cellules de mélanomes vers des fibroblastes dermiques et permettent l'invasion des cellules de mélanomes vers ces niches dermiques (Dror et al., 2016).

Si le rôle de Dicer n'est pas évoqué dans les articles étudiant la fonction de miARN dans le mélanome, Dicer est bien impliqué dans le phénotype invasif de cellules cancéreuses. L'invalidation homozygote de Dicer dans un modèle murin *Pten*<sup>-/-</sup> de cancer de la prostate ralentit la croissance tumorale. Par contre l'invalidation hétérozygote de Dicer sur un fond *Pten*<sup>-/-</sup>, associée à une diminution du niveau d'ARN de Dicer et de microARN, réduit la taille des tumeurs primaires mais augmente l'invasion et l'obstruction des vésicules séminales par des cellules tumorales (Zhang et al., 2014). Chez les deux mutants homozygotes et hétérozygotes de Dicer sont observées des variations d'expression des protéines de l'EMT, de l'adhésion, de la migration cellulaire (E-cadhérine, Vimentine) et de la matrice extracellulaire (Col5a, Col6a, Mmp7). L'ensemble de ces études suggère que les microARN et Dicer sont impliqués dans la migration et/ou l'invasion des cellules de mélanomes. Il est possible que des mécanismes similaires soient utilisés par les mélanocytes non transformés pour acquérir leur localisation propre dans le follicule pileux.

### 1.3. Dicer dans la mélanomagenèse

Malgré des corrélations parfois contradictoires sur le niveau de Dicer dans différents cancers, le rôle de Dicer dans la tumorigenèse est soulevé par le syndrome DICER1. Ce syndrome, récemment défini, est caractérisé par un risque accru de plusieurs tumeurs pédiatriques rares,

telles que les blastomes pleuropulmonaires, chez les porteurs d'un allèle muté inactif du gène *DICER1* (Foulkes et al., 2014). Cependant, le rôle de Dicer dans le développement de ces tumeurs pédiatriques n'a pas encore été élucidé et son implication dans l'initiation ou la progression tumorale impliquerait des mécanismes cellulaires différents dont la prolifération et la sortie de sénescence pour l'initiation ou la migration/invasion et la formation de métastases pour la progression. La pénétrance incomplète de ce syndrome rend difficile l'établissement d'un modèle animal puisqu'il est très probable que d'autres gènes et facteurs environnementaux encore indéterminés interfèrent avec ce phénotype et soient nécessaires au développement des tumeurs.

Le mélanome n'est pas une tumeur caractéristique du syndrome *DICER1*, mais des études contradictoires indiquent des variations du niveau de Dicer dans des mélanomes humains chez l'adulte (Cheng et al., 2015, Jafarnejad et al., 2013, Ma et al., 2011). Une étude récente a révélé que *DICER1* fait partie des 26 gènes significativement mutés dans une cohorte de mélanomes cutanés, accraux et mucosaux (N. Hayward, communication personnelle). Bien que les quatre groupes (BRAF, NRAS, NF1, triple WT) publiés par l'étude du TCGA soient retrouvés dans cette étude, les résultats y sont sensiblement différents de ceux du TCGA probablement à cause de deux différences majeures: le type d'échantillon de mélanomes (cutané-accral-mucosal vs cutané uniquement) et la technologie de séquençage utilisée (whole genome vs whole exome) (Cancer Genome Atlas, 2015, Hayward et al., 2017). Il serait intéressant de savoir à quel groupe appartiennent les mélanomes possédant des mutations de *DICER1* afin de développer un modèle murin cohérent d'étude du rôle de Dicer dans la mélanomagenèse. Aucune étude n'a évalué le rôle de Dicer dans la formation de mélanomes *in vivo* sur modèle murin. Les modèles murins de mélanome utilisent couramment des fonds NRAS ou BRAF muté. L'inactivation homozygote ou hétérozygote de Dicer à la naissance, sur un fond NRAS ou BRAF muté, permettrait d'analyser le rôle de Dicer dans l'initiation du mélanome. L'inactivation de Dicer une fois la tumeur formée permettrait d'analyser le rôle de Dicer dans la progression du mélanome.

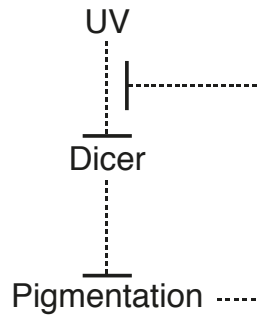
#### 1.4. Dicer dans la protection contre les UV

Dans la deuxième partie, nous avons montré que l'expression de Dicer est réprimée par les UVB. De plus, nos expériences ont révélé qu'une diminution du niveau de Dicer diminue la migration des mélanocytes, augmente le niveau de mélanine *in vitro*, et induit une

localisation anormale des mélanocytes *in vivo*. Nous pouvons nous demander quel est le sens biologique d'une telle répression de Dicer par les UVB au regard du rôle de Dicer mis en évidence précédemment.

A long terme, les UV augmentent la synthèse de mélanine par régulation de MITF via différentes voies impliquant MC1R ou p38 (Galibert et al., 2001, Millington, 2006, Passeron et al., 2007). Il est possible que Dicer participe également à la régulation de la synthèse de mélanine suite à une irradiation UVB. En effet, les UVB répriment l'expression de Dicer, qui induit par la suite une augmentation du niveau de la mélanine. Cette réponse serait une réponse lente puisque la réduction du niveau protéique de Dicer *in vitro* est observée 15h après irradiation UVB et l'augmentation du niveau de mélanine après diminution du niveau de Dicer est observée 48h après transfection du siARN *in vitro*. Le mécanisme moléculaire impliqué dans l'augmentation de la pigmentation découlant d'une réduction du niveau de Dicer fait probablement intervenir des miARN répresseurs de la synthèse de mélanine, ciblant les enzymes de la mélanogenèse ou les protéines de maturation des mélanosomes. Certains de ces miARN (miR-25, miR-434, miR-145) sont en effet connus pour être régulés par les UV (Dynoodt et al., 2013, Syed et al., 2013).

Nous avons également montré que la diminution du niveau de Dicer dans les mélanocytes réduit la quantité de dommages CPD induits par une irradiation UVB. L'augmentation de la quantité de mélanine cellulaire réduit la dose d'UVB reçue par les cellules, ce qui est cohérent avec la diminution de CPD observée dans les mélanocytes exprimant un niveau réduit de Dicer. Cette boucle permet donc un rétrocontrôle *a posteriori* de la dose d'UVB reçue par la cellule et protège la cellule de potentielles irradiations futures (Figure 42). L'accumulation de dommages de l'ADN a également été observée *in vivo* chez un mutant de Dicer en absence d'irradiation. L'invalidation de Dicer dans les kératinocytes entraîne alors une augmentation du marquage  $\gamma$ H2AX caractéristique des dommages DSB de l'ADN dans l'épiderme des souris adultes (Lyle et al., 2014). Plusieurs études récentes soutiennent également le rôle direct de Dicer dans la réparation des dommages (Chitale and Richly, 2017, Francia et al., 2012, Wei et al., 2012). La fonction de Dicer dans la protection des dommages de l'ADN dans les mélanocytes pourrait donc suivre deux mécanismes: un mécanisme indirect via l'augmentation de la pigmentation et un mécanisme direct par son rôle dans la formation ou la réparation des dommages.



**Figure 42. Hypothèse sur le rôle biologique de Dicer dans la réponse aux UVB**

Ces observations *in vitro* doivent être confirmées *in vivo*. L'irradiation de souris doit se faire à la naissance ou sur souris épilées ou rasées. D'après les deux mécanismes suggérés ci-dessus, l'irradiation UVB des souris Dicer F/F pourrait avoir deux effets opposés. Les mélanocytes des souris mutantes pour Dicer, qui produisent probablement plus de mélanine, pourraient être protégés des UV ce qui réduirait le nombre de lésions mélanocytaires par rapport au contrôle. Mais, paradoxalement, il est également possible que l'absence de Dicer cumulée avec l'irradiation UV induise une accumulation de dommages de l'ADN comme observé dans les kératinocytes (Lyle et al., 2014) et augmente le nombre de lésions mélanocytaires et cutanées.

## 2. Mécanismes de régulation de Dicer dans le lignage mélanocytaire

### 2.1. Voies de régulation de Dicer en condition normale

La régulation de l'expression et de l'activité de Dicer comporte différents niveaux : niveau de transcription, niveau d'ARN, niveau de protéine, état et localisation de la protéine. Plusieurs facteurs régulent la transcription de Dicer de façon activatrice, comme SOX4, MITF, p63 et Cycline D1 (Jafarnejad et al., 2013, Levy et al., 2010, Su et al., 2010, Yu et al., 2013), ou répressive, comme EZH2 (van den Beucken et al., 2014). Nous nous sommes principalement concentrés sur la régulation du niveau d'ARN en cherchant des voies de signalisation impliquées dans la régulation de Dicer, afin de comprendre les mécanismes susceptibles d'affecter le niveau de Dicer et d'induire les phénotypes évoqués dans la partie précédente.

Différentes voies ont été testées grâce à des inhibiteurs de MEK, PI3K, PKC, ATM et RSK, mettant en évidence les rôles activateurs de PI3K et RSK sur le niveau d'ARN de Dicer. Parmi les MAPK, des inhibiteurs de p38 et JNK ont également été utilisés cependant

les réductions de phosphorylation de p38 et JNK, sensées être induites par les inhibiteurs (Galibert et al., 2001, Wang et al., 2012), n'ont pu être observées. Le traitement des mélanocytes avec ces inhibiteurs, comme décrit dans des publications (Galibert et al., 2001), n'affecte pas le niveau d'ARN de Dicer, mais le manque de contrôle ne permet pas de déterminer si l'absence d'effet de l'inhibiteur est due à une absence réelle d'effet de la voie sur le niveau de Dicer ou à l'inefficacité de l'inhibiteur.

En aval de PI3K et RSK nous avons décidé d'analyser la voie GSK3 $\beta$ - $\beta$ -caténine. Cette voie est impliquée dans la régulation de Dicer mais dans un sens opposé aux voies PI3K et RSK, ce qui suggère l'existence d'au moins deux voies de régulation antagonistes de Dicer: PI3K et/ou RSK et GSK3 $\beta$ - $\beta$ -caténine. La voie PI3K/AKT régule de nombreuses cibles dont BAX, mTOR et FOXO, réprimant l'apoptose et induisant la traduction et la prolifération. C'est pourquoi PI3K est généralement décrit comme un pro-oncogène favorisant la survie cellulaire. La fonction principale des protéines RSK est de réguler la traduction par interaction avec les ribosomes, mais la kinase RSK phosphoryle également des protéines aux fonctions de plus en plus variées (Anjum and Blenis, 2008). D'autres voies auraient ainsi pu être explorées en aval de PI3K et RSK. Par exemple, l'implication des facteurs de transcription FOXO et p53, réprimés par AKT, et NF $\kappa$ B, activé par AKT et RSK, aurait pu être testée (Schouten et al., 1997, Strozyk and Kulms, 2013).

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques doit toujours considérer les éventuels effets non-spécifiques de ces molécules par rapport à leurs cibles. L'inhibiteur de PI3K, LY294002, réprime l'activité des isoformes PI3K  $\alpha$ ,  $\delta$  et  $\beta$  avec des IC<sub>50</sub> *in vitro* de 0,5  $\mu$ M, 0,57  $\mu$ M et 0,97  $\mu$ M et affecte également de manière moins spécifique d'autres kinases dont CK2, GSK3 $\beta$  et mTOR (Gharbi et al., 2007). L'inhibiteur de RSK, BI-D1870, réprime l'activité de RSK1, RSK2, RSK3 et RSK4 (p90<sup>S6K</sup>) avec des IC<sub>50</sub> *in vitro* de 10 à 30 nM, et réprime également PLK, Aurora B et CK1 avec des IC<sub>50</sub> *in vitro* de 100 à 500 nM (Sapkota et al., 2007). Sachant que GSK3 $\beta$  et CK1 régulent l'activité de  $\beta$ -caténine et que GSK3 $\beta$ - $\beta$ -caténine régule Dicer, il serait possible que les inhibiteurs LY294002 et BI-D1870 agissent directement sur GSK3 $\beta$  ou CK1 et non pas sur PI3K et RSK. D'après cette hypothèse, sachant que l'efficacité de LY294002 et BI-D1870 d'inhibition de GSK3 $\beta$  et CK1 est faible, l'effet sur le niveau de Dicer serait moindre par rapport à celui de BIO, l'inhibiteur de GSK3 $\beta$ . Ce n'est pas le cas. LY294002 et BI-D1870 réduisent même plus fortement le niveau d'ARN de Dicer que BIO, suggérant que les cibles de LY294002 et BI-D1870 impliquées sont

réprimées fortement. Ceci suggère qu'un ou plusieurs isoformes de PI3K et de RSK sont impliqués dans le maintien du niveau de Dicer. L'inhibiteur de GSK3, BIO, réprime l'activité des isoformes GSK3  $\alpha$  et  $\beta$  avec des IC50 *in vitro* d'environ 5nM en bloquant le site de fixation de l'ATP (Meijer et al., 2003). Ce mécanisme de répression est commun à d'autres kinases dont l'activité est inhibée moins fortement comme les kinases JAK avec des IC50 de 30 à 500 nM (Liu et al., 2011), et CDK avec des IC50 de 80 à 300 nM (Meijer et al., 2003). L'inhibiteur de  $\beta$ -caténine, iCRT3, réprime l'activité transcriptionnelle de  $\beta$ -caténine sur un rapporteur TOP flash dans des cellules en culture avec un IC50 de 8,2 nM (Gonsalves et al., 2011). La spécificité de cet inhibiteur a pour l'instant été peu étudiée. Il semble que l'inhibiteur réprime l'interaction de  $\beta$ -caténine avec TCF4 mais également avec E-cadhérine.

Afin d'étudier les mécanismes de régulation de l'expression de Dicer, nous avons utilisé les cellules de mélanome humain MNT-1. Ces cellules ont d'abord été choisies car elles expriment une forme sauvage de  $\beta$ -caténine. De plus, ces cellules de mélanome pigmentées nous ont permis de suivre le niveau de mélanine après réduction du niveau de Dicer avec un siARN. Nous avons supposé que les mécanismes mis en évidence dans les cellules MNT-1 sont conservés dans les cellules exprimant les acteurs des voies impliquées dans la régulation de Dicer. Afin de le vérifier, nous devons démontrer l'implication des voies PI3K, RSK et GSK3 $\beta$ - $\beta$ -caténine dans d'autres cellules du lignage mélanocytaire. Pour se rapprocher d'un modèle non transformé, nous vérifierons l'implication de ces voies dans les mélanocytes humains Hermes et dans les mélanocytes murins Melan-a.

## 2.2. Répression de Dicer par $\beta$ -caténine

Nous avons mis en évidence que la transcription de Dicer est réprimée par  $\beta$ -caténine via des sites LEF/TCF dans le lignage mélanocytaire. Une étude récente vient de montrer, dans un autre modèle cellulaire, la répression de Dicer par  $\beta$ -caténine dans des cellules de cancer ovarien, sans détailler le mécanisme moléculaire impliqué. Dans des cellules de cancer ovarien fortement métastatiques, exprimant un niveau élevé de  $\beta$ -caténine, la diminution du niveau de  $\beta$ -caténine, avec un siARN, augmente le niveau protéique de Dicer. Dans des cellules de cancer ovarien faiblement métastatiques, exprimant un niveau bas de  $\beta$ -caténine, la surexpression d'une forme constitutivement active de  $\beta$ -caténine réduit le niveau protéique de Dicer (To et al., 2017).



La fonction transcriptionnelle de  $\beta$ -caténine a longtemps été décrite comme activatrice, suivant un mécanisme mis en évidence principalement en réponse au signal Wnt. Les facteurs LEF/TCF en complexe avec Groucho répriment la transcription des gènes Wnt, alors qu'après stimulation Wnt, les facteurs LEF/TCF en complexe avec  $\beta$ -caténine activent la transcription des gènes Wnt. Nous savons maintenant que  $\beta$ -caténine n'est pas régulé uniquement par les signaux Wnt et que sa fonction transcriptionnelle n'est pas uniquement activatrice (Aktary et al., 2016).  $\beta$ -caténine réprime, par exemple, la transcription du gène CDKN2A dans les mélanocytes et cellules de mélanomes en culture (Delmas et al., 2007). Dicer est donc un autre exemple de gène réprimé par  $\beta$ -caténine, grâce à LEF/TCF.

Le mécanisme de répression de la transcription par  $\beta$ -caténine commence à être élucidé grâce à une étude récente démontrant les différences fonctionnelles de deux formes de  $\beta$ -caténine acétylée (K49) activatrice ou tri-méthylée (K49) répressive. La forme acétylée interagirait avec les facteurs LEF/TCF et CBP pour induire la transcription, alors que la forme méthylée interagirait avec EZH2 et SUZ12 pour réprimer la transcription (Hoffmeyer et al., 2017). Dans le cas de Dicer, la fonction répressive de  $\beta$ -caténine est dépendante d'au moins un site LEF/TCF, ce qui suggère un troisième mécanisme de régulation, répresseur et dépendant de LEF/TCF et  $\beta$ -caténine. Cependant, la présence de LEF/TCF dans le complexe répresseur  $\beta$ -caténine-EZH2-SUZ12 n'a pas été analysée par Hoffmeyer et al., il est donc possible que LEF/TCF fasse également partie de ce complexe. De plus, une étude a montré que EZH2 réprime la transcription de Dicer dans des cellules MCF7 et HMLER de cancer du sein (van den Beucken et al., 2014). L'implication de  $\beta$ -caténine n'a pas été analysée dans cette étude, laissant la possibilité que  $\beta$ -caténine participe à la répression de Dicer par EZH2. L'hypothèse la plus probable semble donc qu'un complexe  $\beta$ -caténine-EZH2-LEF/TCF réprime la transcription de Dicer dans les cellules MNT-1.

### 2.3. Répression de Dicer par $\beta$ -caténine et FOXO en condition de stress UVB

Nous avons montré que la transcription de Dicer est réprimée par les UVB. La fonction biologique de cette répression a été évoquée dans la partie 1.4 de cette discussion mais le mécanisme moléculaire n'a pas été discuté. Le mécanisme de répression de Dicer par les UVB peut faire intervenir une activation, par les UVB, des voies répressives de Dicer mises en évidence en condition normale. Nous avons en effet montré que  $\beta$ -caténine est activée par les UVB via GSK3 $\beta$ , entre autres. L'activation de  $\beta$ -caténine par les UVB augmente sa

localisation nucléaire et augmenterait la formation du complexe répresseur  $\beta$ -caténine-EZH2-LEF/TCF dans le noyau.

Un site FOXO1 est également impliqué dans la répression de Dicer par les UVB. FOXO1 peut avoir soit une action conjointe avec  $\beta$ -caténine en participant au complexe  $\beta$ -caténine-EZH2-LEF/TCF, soit une action additive en formant un deuxième complexe répressif. Dans des cellules endothéliales de souris KO pour VE-cadhérine, FOXO1 interagit avec  $\beta$ -caténine pour réprimer la transcription du gène *Claudin-5* (Taddei et al., 2008), renforçant l'hypothèse que FOXO1 participe à un complexe transcriptionnel répresseur avec  $\beta$ -caténine. Chez les invertébrés, un complexe FOXO- $\beta$ -caténine induit la transcription de gènes cibles de FOXO mais réprime la transcription de cibles de LEF/TC (Hoogeboom et al., 2008), suggérant que FOXO interagit avec des sites LEF/TCF pour réprimer la transcription en présence de  $\beta$ -caténine. Les données de la littérature actuelle incitent donc à émettre l'hypothèse de la formation d'un complexe FOXO- $\beta$ -caténine-LEF/TCF répresseur de la transcription de Dicer après irradiation par les UVB. La présence d'EZH2 dans ce complexe est possible mais aucune étude n'a décrit de complexe régulateur EZH2-FOXO. Afin de vérifier l'hypothèse, le rôle de FOXO dans la répression de Dicer en réponse aux UVB, conjointement avec  $\beta$ -caténine doit être exploré en inactivant ou diminuant le niveau de FOXO1 dans des cellules irradiées.

Il est possible que FOXO1 soit activé par les UVB via  $\beta$ -caténine puisqu'il a été montré que  $\beta$ -caténine active FOXO4 en réponse à un stress oxydatif (Essers et al., 2005). Mais les facteurs FOXO, dont FOXO1, sont également régulés par la voie PI3K/AKT. La phosphorylation de FOXO1 par AKT favorise sa localisation cytoplasmique et sa dégradation par le protéasome réprimant ainsi son activité transcriptionnelle (Biggs et al., 1999, Tzivion et al., 2011). Ces deux mécanismes confirment que les voies PI3K et GSK3 $\beta$ - $\beta$ -caténine sont antagonistes également dans la réponse aux UVB: après UVB, PI3K, via la répression de FOXO1, induirait la transcription de Dicer, alors que GSK3 $\beta$ - $\beta$ -caténine réprime la transcription de Dicer. Nous avons montré que le site FOXO du promoteur minimal de Dicer n'est pas impliqué dans la régulation de Dicer en condition normale mais est impliqué après un stress UVB. De plus, l'inhibiteur de PI3K réprime la transcription de Dicer. La répression de FOXO1 par PI3K/AKT expliquerait ainsi l'effet de l'inhibiteur de PI3K en conditions normales. FOXO1 ne régulerait donc pas Dicer en condition normale mais réprimerait sa transcription après irradiation UVB ou après un signal inhibiteur de PI3K.

PI3K et RSK sont activés par les UV (Ibuki and Goto, 2000, Kabuyama et al., 1998, Nomura et al., 2001, Zhang et al., 2001). Or AKT réprime l'activité transcriptionnelle de FOXO1 suggérant que cette voie n'est pas impliquée dans la répression de Dicer par les UVB. Pourtant, une étude a montré dans des cellules tumorales de poumon et du sein, que les UV induisent une re-localisation nucléaire de FOXO3a qui est retardée lors d'un traitement avec des inhibiteurs de MEK (U0126) et PI3K (Wortmannin) (Wang et al., 2012), indiquant qu'un mécanisme probablement indépendant d'AKT active FOXO en réponse aux UV.

Pour revenir sur l'activation de  $\beta$ -caténine par les UVB, nous avons observé *in vivo* et *in vitro* la relocalisation nucléaire et l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de  $\beta$ -caténine. La construction rapporteur TOP flash utilisée témoigne de l'interaction de  $\beta$ -caténine avec les sites LEF/TCF, suggérant que l'activation de  $\beta$ -caténine par les UVB est également dépendante de LEF/TCF. D'autres facteurs pourraient participer au complexe transcriptionnel induit par les UVB. Cette activation est dépendante de GSK3 $\beta$  mais d'autres voies semblent impliquées. Dans les mélanocytes, une voie dépendante de MC1R pourrait déstabiliser la protéine PTEN (Cao et al., 2013), ce qui augmenterait la localisation nucléaire de  $\beta$ -caténine par interaction avec CAV1 (Conde-Perez et al., 2015).

La régulation de Dicer et  $\beta$ -caténine par les UVB semble basée sur un mécanisme moléculaire non spécifique des mélanocytes puisqu'*in vitro* elle est observée dans différents types cellulaires. Cependant, *in vivo*, l'activation de  $\beta$ -caténine est restreinte aux mélanocytes, probablement plus sensibles aux rayonnements UVB. La répression de Dicer est observée dans les kératinocytes et les mélanocytes, suggérant (i) un mécanisme commun, ou (ii) deux mécanismes distincts indépendants, via deux facteurs de transcriptions par exemple, ou (iii) deux mécanismes distincts interdépendants: un mécanisme autonome pour les mélanocytes, en réponse à l'activation de  $\beta$ -caténine, et un mécanisme non autonome pour les kératinocytes, induit par la réponse des mélanocytes.

La répression de migration induite par les UVB est cohérente avec la diminution de migration induite par  $\beta$ -caténine (Gallagher et al., 2013) et la diminution de migration observée après diminution du niveau de Dicer. Cette expérience *in vitro* permet de suivre un mécanisme de migration 2D artificiel, mais faisant intervenir des acteurs protéiques proches du mode de migration 3D mésenchymateux. Il serait donc intéressant de vérifier si la migration des mélanocytes *in vivo* est également affectée par les UVB, en particulier lors de la migration des TAC en anagène précoce, qui semble affectée par l'absence de Dicer dans

notre modèle *in vivo*. L'une des hypothèses biologiques de cette observation est que la migration des mélanocytes est ralentie par les UVB afin de favoriser la réponse pigmentaire et la synthèse des enzymes de la mélanogenèse nécessaires à la protection des cellules contre ces rayonnements. Les UVB sont également utilisés dans le traitement du vitiligo par NB-UVB et induisent la repigmentation des régions dépigmentées, en activant *in vitro* la prolifération et la migration (Wu et al., 2004). Cependant si l'efficacité de cette thérapie reste plus élevée que la thérapie PUVA, les résultats chez les patients restent parfois aléatoires, suggérant que des facteurs, pour l'instant inconnus, interviennent. Sachant que la voie Wnt est réduite chez un certain nombre de patients vitiligo (Regazzetti et al., 2015), il est possible que l'efficacité de migration induite par le traitement NB-UVB dépende du statut, du niveau et du potentiel d'activation de  $\beta$ -caténine.

## BIBLIOGRAPHIE



## BIBLIOGRAPHIE

- Abitua PB, Wagner E, Navarrete IA, Levine M. Identification of a rudimentary neural crest in a non-vertebrate chordate. *Nature* 2012;492(7427):104-7.
- Abrisqueta M, Herraiz C, Perez Oliva AB, Sanchez-Laorden BL, Olivares C, Jimenez-Cervantes C, et al. Differential and competitive regulation of human melanocortin 1 receptor signaling by beta-arrestin isoforms. *Journal of cell science* 2013;126(Pt 16):3724-37.
- Ackermann J, Fruttschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer research* 2005;65(10):4005-11.
- Adameyko I, Lallemand F, Aquino JB, Pereira JA, Topilko P, Muller T, et al. Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* 2009;139(2):366-79.
- Aktary Z, Bertrand JU, Larue L. The WNT-less wonder: WNT-independent beta-catenin signaling. *Pigment cell & melanoma research* 2016.
- Aktary Z, Pasdar M. Plakoglobin: role in tumorigenesis and metastasis. *Int J Cell Biol* 2012;2012:189521.
- Aktary Z, Pasdar M. Plakoglobin represses SATB1 expression and decreases in vitro proliferation, migration and invasion. *PloS one* 2013;8(11):e78388.
- Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation research* 2011;717(1-2):1-8.
- Alonso L, Fuchs E. The hair cycle. *Journal of cell science* 2006;119(Pt 3):391-3.
- Andl T, Murchison EP, Liu F, Zhang Y, Yunta-Gonzalez M, Tobias JW, et al. The miRNA-processing enzyme dicer is essential for the morphogenesis and maintenance of hair follicles. *Curr Biol* 2006;16(10):1041-9.
- Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008;9(10):747-58.
- Archambault M, Yaar M, Gilchrist BA. Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. *The Journal of investigative dermatology* 1995;104(5):859-67.
- Asada S, Takahashi T, Isodono K, Adachi A, Imoto H, Ogata T, et al. Downregulation of Dicer expression by serum withdrawal sensitizes human endothelial cells to apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295(6):H2512-21.
- Atlante A, Calissano P, Bobba A, Azzariti A, Marra E, Passarella S. Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(47):37159-66.
- Aubin-Houzelstein G, Djian-Zaouche J, Bernex F, Gadin S, Delmas V, Larue L, et al. Melanoblasts' proper location and timed differentiation depend on Notch/RBP-J signaling in postnatal hair follicles. *The Journal of investigative dermatology* 2008;128(11):2686-95.
- Babapoor S, Fleming E, Wu R, Dadras SS. A novel miR-451a isomiR, associated with amelanotypic phenotype, acts as a tumor suppressor in melanoma by retarding cell migration and invasion. *PloS one* 2014;9(9):e107502.
- Bald T, Quast T, Landsberg J, Rogava M, Glodde N, Lopez-Ramos D, et al. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature* 2014;507(7490):109-13.

- Baron Y, Corre S, Mouchet N, Vaulont S, Prince S, Galibert MD. USF-1 is critical for maintaining genome integrity in response to UV-induced DNA photolesions. *PLoS Genet* 2012;8(1):e1002470.
- Bellono NW, Kammel LG, Zimmerman AL, Oancea E. UV light phototransduction activates transient receptor potential A1 ion channels in human melanocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110(6):2383-8.
- Bennasser Y, Chable-Bessia C, Triboulet R, Gibbings D, Gwizdek C, Dargemont C, et al. Competition for XPO5 binding between Dicer mRNA, pre-miRNA and viral RNA regulates human Dicer levels. *Nat Struct Mol Biol* 2011;18(3):323-7.
- Bennett DC, Cooper PJ, Dexter TJ, Devlin LM, Heasman J, Nester B. Cloned mouse melanocyte lines carrying the germline mutations albino and brown: complementation in culture. *Development* 1989;105(2):379-85.
- Bennett MF, Robinson MK, Baron ED, Cooper KD. Skin immune systems and inflammation: protector of the skin or promoter of aging? *J Investig Dermatol Symp Proc* 2008;13(1):15-9.
- Berlin I, Luciani F, Gallagher SJ, Rambow F, Conde-Perez A, Colombo S, et al. General strategy to analyse coat colour phenotypes in mice. *Pigment cell & melanoma research* 2012;25(1):117-9.
- Bernstein DA, Vyas VK, Weinberg DE, Drinnenberg IA, Bartel DP, Fink GR. *Candida albicans* Dicer (CaDcr1) is required for efficient ribosomal and spliceosomal RNA maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012;109(2):523-8.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics* 2003;35(3):215-7.
- Bertrand JU, Petit V, Hacker E, Berlin I, Hayward NK, Pouteaux M, et al. UVB represses melanocyte cell migration and acts through beta-catenin. *Exp Dermatol* 2017.
- Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Archives of dermatology* 2003;139(12):1620-4; discussion 4.
- Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *The Journal of investigative dermatology* 2006;126(12):2565-75.
- Biggs WH, 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(13):7421-6.
- Bijlsma R, Loeschcke V. Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *J Evol Biol* 2005;18(4):744-9.
- Bin BH, Bhin J, Yang SH, Shin M, Nam YJ, Choi DH, et al. Membrane-Associated Transporter Protein (MATP) Regulates Melanosomal pH and Influences Tyrosinase Activity. *PloS one* 2015;10(6):e0129273.
- Bivik CA, Larsson PK, Kagedal KM, Rosdahl IK, Ollinger KM. UVA/B-induced apoptosis in human melanocytes involves translocation of cathepsins and Bcl-2 family members. *The Journal of investigative dermatology* 2006;126(5):1119-27.
- Bode AM, Dong Z. Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci STKE* 2003;2003(167):RE2.
- Bonaventure J, Domingues MJ, Larue L. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. *Pigment cell & melanoma research* 2013;26(3):316-25.
- Boniol M, Autier P, Boyle P, Gandini S. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 2012;345:e4757.



- Bosenberg M, Muthusamy V, Curley DP, Wang Z, Hobbs C, Nelson B, et al. Characterization of melanocyte-specific inducible Cre recombinase transgenic mice. *Genesis* 2006;44(5):262-7.
- Bottomly D, Kyler SL, McWeeney SK, Yochum GS. Identification of {beta}-catenin binding regions in colon cancer cells using ChIP-Seq. *Nucleic acids research* 2010;38(17):5735-45.
- Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008;9(4):297-308.
- Brault V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, McMahon AP, et al. Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* 2001;128(8):1253-64.
- Brenner M, Coelho SG, Beer JZ, Miller SA, Wolber R, Smuda C, et al. Long-lasting molecular changes in human skin after repetitive in situ UV irradiation. *The Journal of investigative dermatology* 2009;129(4):1002-11.
- Bryja V, Gradl D, Schambony A, Arenas E, Schulte G. Beta-arrestin is a necessary component of Wnt/beta-catenin signaling in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104(16):6690-5.
- Burger K, Gullerova M. Swiss army knives: non-canonical functions of nuclear Drosha and Dicer. *Nature reviews Molecular cell biology* 2015;16(7):417-30.
- Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment cell research* 2000;13(2):60-9.
- Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem Photobiol* 2015;91(1):140-55.
- Cadet J, Mouret S, Ravanat JL, Douki T. Photoinduced damage to cellular DNA: direct and photosensitized reactions. *Photochem Photobiol* 2012;88(5):1048-65.
- Calses PC, Dhillon KK, Tucker N, Chi Y, Huang JW, Kawasumi M, et al. DGCR8 Mediates Repair of UV-Induced DNA Damage Independently of RNA Processing. *Cell Rep* 2017;19(1):162-74.
- Cancer Genome Atlas N. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 2015;161(7):1681-96.
- Cao J, Wan L, Hacker E, Dai X, Lenna S, Jimenez-Cervantes C, et al. MC1R is a potent regulator of PTEN after UV exposure in melanocytes. *Mol Cell* 2013;51(4):409-22.
- Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992;360(6401):258-61.
- Cerutti H, Casas-Mollano JA. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet* 2006;50(2):81-99.
- Chang CY, Pasolli HA, Giannopoulou EG, Guasch G, Gronostajski RM, Elemento O, et al. NFIB is a governor of epithelial-melanocyte stem cell behaviour in a shared niche. *Nature* 2013;495(7439):98-102.
- Chen N, Ma W, Huang C, Dong Z. Translocation of protein kinase Cepsilon and protein kinase Cdelta to membrane is required for ultraviolet B-induced activation of mitogen-activated protein kinases and apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 1999;274(22):15389-94.
- Cheng Y, Lu J, Chen G, Ardekani GS, Rotte A, Martinka M, et al. Stage-specific prognostic biomarkers in melanoma. *Oncotarget* 2015;6(6):4180-9.
- Cheung M, Briscoe J. Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development* 2003;130(23):5681-93.

- Chitale S, Richly H. DICER and ZRF1 contribute to chromatin decondensation during nucleotide excision repair. *Nucleic acids research* 2017.
- Chou WC, Takeo M, Rabbani P, Hu H, Lee W, Chung YR, et al. Direct migration of follicular melanocyte stem cells to the epidermis after wounding or UVB irradiation is dependent on Mc1r signaling. *Nat Med* 2013;19(7):924-9.
- Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry Dt, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human pathology* 1984;15(12):1147-65.
- Clydesdale GJ, Dandie GW, Muller HK. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol* 2001;79(6):547-68.
- Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, Hertweck A, O'Connor E, Godwin J, et al. T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *The Journal of experimental medicine* 2005;201(9):1367-73.
- Coblentz WW. The Copenhagen Meeting of the Second International Congress on Light. *Science* 1932;76(1975):412-5.
- Colombo S, Berlin I, Delmas V, Larue L. Classical and non-classical melanocytes in vertebrates. In: Riley PA, Borovansky J, editors. *Melanins and melanosomes*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co; 2011. p. 21-51.
- Conde-Perez A, Gros G, Longvert C, Pedersen M, Petit V, Aktary Z, et al. A caveolin-dependent and PI3K/AKT-independent role of PTEN in beta-catenin transcriptional activity. *Nat Commun* 2015;6:8093.
- Cordelieres FP, Petit V, Kumasaka M, Debeir O, Letort V, Gallagher SJ, et al. Automated cell tracking and analysis in phase-contrast videos (iTrack4U): development of Java software based on combined mean-shift processes. *PloS one* 2013;8(11):e81266.
- Corre S, Primot A, Sviderskaya E, Bennett DC, Vaulont S, Goding CR, et al. UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *The Journal of biological chemistry* 2004;279(49):51226-33.
- Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, et al. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 1995;81(7):1137-46.
- Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J* 2007;21(4):976-94.
- Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Canguilhem B, Favier A, Cadet J, et al. Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA repair* 2005;4(7):836-44.
- Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, et al. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 2007;128(5):853-64.
- Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol* 2005;23(7):1473-82.
- Danen EH, de Vries TJ, Morandini R, Ghanem GG, Ruiter DJ, van Muijen GN. E-cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Res* 1996;6(2):127-31.
- Danielian PS, Muccino D, Rowitch DH, Michael SK, McMahon AP. Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol* 1998;8(24):1323-6.
- Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE, Jr., et al. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature genetics* 2009;41(5):544-52.

- de Boer J, Andressoo JO, de Wit J, Huijman J, Beems RB, van Steeg H, et al. Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science* 2002;296(5571):1276-9.
- del Barrio MG, Nieto MA. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development* 2002;129(7):1583-93.
- Delevoe C, Giordano F, van Niel G, Raposo G. [Biogenesis of melanosomes - the chessboard of pigmentation]. *Medecine sciences : M/S* 2011;27(2):153-62.
- Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M, et al. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes & Development* 2007;21(22):2923-35.
- Delmas V, Martinozzi S, Bourgeois Y, Holzenberger M, Larue L. Cre-mediated recombination in the skin melanocyte lineage. *Genesis* 2003;36(2):73-80.
- DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6 Suppl):1689S-96S.
- Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V, et al. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 2009;15(4):294-303.
- Dias C, Feng J, Sun H, Shao NY, Mazei-Robison MS, Damez-Werno D, et al. beta-catenin mediates stress resilience through Dicer1/microRNA regulation. *Nature* 2014;516(7529):51-5.
- Diffey BL. What is light? *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002;18(2):68-74.
- Domingues MJ, Larue L, Bonaventure J. [Migration of melanocytic lineage-derived cells]. *Medecine sciences : M/S* 2013;29(3):287-92.
- Domingues MJ, Rambow F, Job B, Papon L, Liu W, Larue L, et al. beta-catenin inhibitor ICAT modulates the invasive motility of melanoma cells. *Cancer research* 2014;74(7):1983-95.
- Dore JF, Chignol MC. Tanning salons and skin cancer. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2012;11(1):30-7.
- Dottori M, Gross MK, Labosky P, Goulding M. The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate. *Development* 2001;128(21):4127-38.
- Douki T, Perdiz D, Grof P, Kuluncsics Z, Moustacchi E, Cadet J, et al. Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role. *Photochem Photobiol* 1999;70(2):184-90.
- Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry* 2003;42(30):9221-6.
- Douki T, Sage E. Dewar valence isomers, the third type of environmentally relevant DNA photoproducts induced by solar radiation. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2016;15(1):24-30.
- Drake M, Furuta T, Suen KM, Gonzalez G, Liu B, Kalia A, et al. A requirement for ERK-dependent Dicer phosphorylation in coordinating oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. *Dev Cell* 2014;31(5):614-28.
- Dror S, Sander L, Schwartz H, Sheinboim D, Barzilai A, Dishon Y, et al. Melanoma miRNA trafficking controls tumour primary niche formation. *Nature cell biology* 2016;18(9):1006-17.

- Duncan LM. The classification of cutaneous melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23(3):501-13, ix.
- Dunn KJ, Williams BO, Li Y, Pavan WJ. Neural crest-directed gene transfer demonstrates Wnt1 role in melanocyte expansion and differentiation during mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(18):10050-5.
- Duteil L, Cardot-Leccia N, Queille-Roussel C, Maubert Y, Harmelin Y, Boukari F, et al. Differences in visible light-induced pigmentation according to wavelengths: a clinical and histological study in comparison with UVB exposure. *Pigment cell & melanoma research* 2014;27(5):822-6.
- Dynoodt P, Mestdagh P, Van Peer G, Vandesompele J, Goossens K, Peelman LJ, et al. Identification of miR-145 as a key regulator of the pigmentary process. *The Journal of investigative dermatology* 2013;133(1):201-9.
- Eichhoff OM, Weeraratna A, Zipser MC, Denat L, Widmer DS, Xu M, et al. Differential LEF1 and TCF4 expression is involved in melanoma cell phenotype switching. *Pigment cell & melanoma research* 2011;24(4):631-42.
- El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglian V. A review of human carcinogens—Part D: radiation. *The Lancet Oncology* 2009;10(8):2.
- Ellison TI, Smith MK, Gilliam AC, MacDonald PN. Inactivation of the vitamin D receptor enhances susceptibility of murine skin to UV-induced tumorigenesis. *The Journal of investigative dermatology* 2008;128(10):2508-17.
- EObeid AS, Kamal-Eldin A, Abdelhalim MA, Haseeb AM. Pharmacological Properties of Melanin and its Function in Health. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2016.
- Emde A, Hornstein E. miRNAs at the interface of cellular stress and disease. *The EMBO journal* 2014;33(13):1428-37.
- Englaro W, Derijard B, Ortonne JP, Ballotti R. Solar ultraviolet light activates extracellular signal-regulated kinases and the ternary complex factor in human normal keratinocytes. *Oncogene* 1998;16(5):661-4.
- Ernfors P. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Exp Cell Res* 2010;316(8):1397-407.
- Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* 2005;308(5725):1181-4.
- Ezzedine K, Eleftheriadou V, Whitton M, van Geel N. Vitiligo. *Lancet* 2015;386(9988):74-84.
- Farrokhi S, Hojjat-Farsangi M, Noohpisheh MK, Tahmasbi R, Rezaei N. Assessment of the immune system in 55 Iranian patients with vitiligo. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 2005;19(6):706-11.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391(6669):806-11.
- Foulkes WD, Priest JR, Duchaine TF. DICER1: mutations, microRNAs and mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2014;14(10):662-72.
- Francia S, Michelini F, Saxena A, Tang D, de Hoon M, Anelli V, et al. Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature* 2012;488(7410):231-5.
- Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 2010;188(1):11-9.

- Fritsche E, Schafer C, Calles C, Bernsmann T, Bernshausen T, Wurm M, et al. Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104(21):8851-6.
- Fukagawa T, Nogami M, Yoshikawa M, Ikeno M, Okazaki T, Takami Y, et al. Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nature cell biology* 2004;6(8):784-91.
- Galibert MD, Carreira S, Goding CR. The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *The EMBO journal* 2001;20(17):5022-31.
- Gallagher SJ, Rambow F, Kumasaka M, Champeval D, Bellacosa A, Delmas V, et al. Beta-catenin inhibits melanocyte migration but induces melanoma metastasis. *Oncogene* 2013;32(17):2230-8.
- Gammill LS, Bronner-Fraser M. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(10):795-805.
- Gandini S, Autier P, Boniol M. Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma. *Prog Biophys Mol Biol* 2011;107(3):362-6.
- Ge X, Zhao X, Nakagawa A, Gong X, Skeen-Gaar RR, Shi Y, et al. A novel mechanism underlies caspase-dependent conversion of the dicer ribonuclease into a deoxyribonuclease during apoptosis. *Cell Res* 2014;24(2):218-32.
- Gharbi SI, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ, Hancox T, Saghir N, Timms JF, et al. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *The Biochemical journal* 2007;404(1):15-21.
- Gonsalves FC, Klein K, Carson BB, Katz S, Ekas LA, Evans S, et al. An RNAi-based chemical genetic screen identifies three small-molecule inhibitors of the Wnt/wingless signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108(15):5954-63.
- Goodall J, Martinozzi S, Dexter TJ, Champeval D, Carreira S, Larue L, et al. Brn-2 expression controls melanoma proliferation and is directly regulated by beta-catenin. *Mol Cell Biol* 2004;24(7):2915-22.
- Goodman MF, Woodgate R. Translesion DNA polymerases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(10):a010363.
- Gracheva E, Chitale S, Wilhelm T, Rapp A, Byrne J, Stadler J, et al. ZRF1 mediates remodeling of E3 ligases at DNA lesion sites during nucleotide excision repair. *J Cell Biol* 2016;213(2):185-200.
- Green SA, Simoes-Costa M, Bronner ME. Evolution of vertebrates as viewed from the crest. *Nature* 2015;520(7548):474-82.
- Grulich AE, Bataille V, Swerdlow AJ, Newton-Bishop JA, Cuzick J, Hersey P, et al. Naevi and pigmentary characteristics as risk factors for melanoma in a high-risk population: a case-control study in New South Wales, Australia. *International journal of cancer* 1996;67(4):485-91.
- Gudjohansen SA, Atacho DA, Gesbert F, Raposo G, Hurbain I, Larue L, et al. Meningeal Melanocytes in the Mouse: Distribution and Dependence on. *Front Neuroanat* 2015;9:149.
- Guyonneau L, Murisier F, Rossier A, Moulin A, Beermann F. Melanocytes and pigmentation are affected in dopachrome tautomerase knockout mice. *Mol Cell Biol* 2004;24(8):3396-403.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
- Harfe BD, McManus MT, Mansfield JH, Hornstein E, Tabin CJ. The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005;102(31):10898-903.
- Harris ML, Baxter LL, Loftus SK, Pavan WJ. Sox proteins in melanocyte development and melanoma. *Pigment cell & melanoma research* 2010;23(4):496-513.
- Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, Johansson PA, Field MA, Nones K, et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* 2017;545(7653):175-80.
- Hearing VJ. Determination of melanin synthetic pathways. *The Journal of investigative dermatology* 2011;131(E1):E8-E11.
- Hemesath TJ, Price ER, Takemoto C, Badalian T, Fisher DE. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* 1998;391(6664):298-301.
- Hildesheim J, Salvador JM, Hollander MC, Fornace AJ, Jr. Casein kinase 2- and protein kinase A-regulated adenomatous polyposis coli and beta-catenin cellular localization is dependent on p38 MAPK. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(17):17221-6.
- Hill DA, Ivanovich J, Priest JR, Gurnett CA, Dehner LP, Desruisseau D, et al. DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science* 2009;325(5943):965.
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411(6835):366-74.
- Hoffmeyer K, Junghans D, Kanzler B, Kemler R. Trimethylation and Acetylation of beta-Catenin at Lysine 49 Represent Key Elements in ESC Pluripotency. *Cell Rep* 2017;18(12):2815-24.
- Hoogeboom D, Essers MA, Polderman PE, Voets E, Smits LM, Burgering BM. Interaction of FOXO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity. *The Journal of biological chemistry* 2008;283(14):9224-30.
- Hsiao JJ, Fisher DE. The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma. *Arch Biochem Biophys* 2014;563:28-34.
- Huang C, Li J, Chen N, Ma W, Bowden GT, Dong Z. Inhibition of atypical PKC blocks ultraviolet-induced AP-1 activation by specifically inhibiting ERKs activation. *Mol Carcinog* 2000;27(2):65-75.
- Huang T, Liu Y, Huang M, Zhao X, Cheng L. Wnt1-cre-mediated conditional loss of Dicer results in malformation of the midbrain and cerebellum and failure of neural crest and dopaminergic differentiation in mice. *J Mol Cell Biol* 2010;2(3):152-63.
- Hyter S, Coleman DJ, Ganguli-Indra G, Merrill GF, Ma S, Yanagisawa M, et al. Endothelin-1 is a transcriptional target of p53 in epidermal keratinocytes and regulates ultraviolet-induced melanocyte homeostasis. *Pigment cell & melanoma research* 2013;26(2):247-58.
- Ibuki Y, Goto R. Suppression of apoptosis by UVB irradiation: survival signaling via PI3-kinase/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279(3):872-8.
- Ikeya M, Lee SM, Johnson JE, McMahon AP, Takada S. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* 1997;389(6654):966-70.
- International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet I, skin c. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *International journal of cancer* 2007;120(5):1116-22.
- Irvin-Wilson CV, Chaudhuri G. Alternative initiation and splicing in dicer gene expression in human breast cells. *Breast Cancer Res* 2005;7(4):R563-9.
- Jafarnejad SM, Ardekani GS, Ghaffari M, Martinka M, Li G. Sox4-mediated Dicer expression is critical for suppression of melanoma cell invasion. *Oncogene* 2013;32(17):2131-9.

- Jagirdar K, Yin K, Harrison M, Lim W, Muscat GE, Sturm RA, et al. The NR4A2 nuclear receptor is recruited to novel nuclear foci in response to UV irradiation and participates in nucleotide excision repair. *PloS one* 2013;8(11):e78075.
- Jamal S, Schneider RJ. UV-induction of keratinocyte endothelin-1 downregulates E-cadherin in melanocytes and melanoma cells. *J Clin Invest* 2002;110(4):443-52.
- Jarrett SG, Wolf Horrell EM, Boulanger MC, D'Orazio JA. Defining the Contribution of MC1R Physiological Ligands to ATR Phosphorylation at Ser435, a Predictor of DNA Repair in Melanocytes. *The Journal of investigative dermatology* 2015;135(12):3086-95.
- Jean C, Blanc A, Prade-Houdellier N, Ysebaert L, Hernandez-Pigeon H, Al Saati T, et al. Epidermal growth factor receptor/beta-catenin/T-cell factor 4/matrix metalloproteinase 1: a new pathway for regulating keratinocyte invasiveness after UVA irradiation. *Cancer research* 2009;69(8):3291-9.
- Jeffery G, Brem G, Montoliu L. Correction of retinal abnormalities found in albinism by introduction of a functional tyrosinase gene in transgenic mice and rabbits. *Brain Res Dev Brain Res* 1997;99(1):95-102.
- Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* 2003;22(20):3099-112.
- Jiang YJ, Bikle DD. LncRNA profiling reveals new mechanism for VDR protection against skin cancer formation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;144 Pt A:87-90.
- Jux B, Kadow S, Luecke S, Rannug A, Krutmann J, Esser C. The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation-induced skin tanning. *The Journal of investigative dermatology* 2011;131(1):203-10.
- Kabuyama Y, Hamaya M, Homma Y. Wavelength specific activation of PI 3-kinase by UVB irradiation. *FEBS Lett* 1998;441(2):297-301.
- Kamada S, Shimono A, Shinto Y, Tsujimura T, Takahashi T, Noda T, et al. bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. *Cancer research* 1995;55(2):354-9.
- Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004;432(7015):316-23.
- Kauser S, Thody AJ, Schallreuter KU, Gummer CL, Tobin DJ. beta-Endorphin as a regulator of human hair follicle melanocyte biology. *The Journal of investigative dermatology* 2004;123(1):184-95.
- Kelsh RN, Harris ML, Colanesi S, Erickson CA. Stripes and belly-spots -- a review of pigment cell morphogenesis in vertebrates. *Seminars in cell & developmental biology* 2009;20(1):90-104.
- Kim NH, Choi SH, Lee TR, Lee CH, Lee AY. Cadherin 11, a miR-675 target, induces N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in melasma. *The Journal of investigative dermatology* 2014;134(12):2967-76.
- Kobayashi T, Imokawa G, Bennett DC, Hearing VJ. Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein). *The Journal of biological chemistry* 1998;273(48):31801-5.
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 1997;275(5307):1784-7.
- Kottler VA, Kunstner A, Scharlt M. Pheomelanin in fish? *Pigment cell & melanoma research* 2015;28(3):355-6.
- Kraemer A, Chen IP, Henning S, Faust A, Volkmer B, Atkinson MJ, et al. UVA and UVB irradiation differentially regulate microRNA expression in human primary keratinocytes. *PloS one* 2013;8(12):e83392.

- Krutmann J, Morita A, Chung JH. Sun exposure: what molecular photodermatology tells us about its good and bad sides. *The Journal of investigative dermatology* 2012;132(3 Pt 2):976-84.
- Kubo JT, Henderson MT, Desai M, Wactawski-Wende J, Stefanick ML, Tang JY. Alcohol consumption and risk of melanoma and non-melanoma skin cancer in the Women's Health Initiative. *Cancer Causes Control* 2014;25(1):1-10.
- Kulesa H, Turk G, Hogan BL. Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *The EMBO journal* 2000;19(24):6664-74.
- Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Pokornowska M, Urbanowicz A, Tworak A, Mickiewicz A, et al. The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities. *Nucleic acids research* 2015;43(9):4365-80.
- Larriba MJ, Valle N, Palmer HG, Ordonez-Moran P, Alvarez-Diaz S, Becker KF, et al. The inhibition of Wnt/beta-catenin signalling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 is abrogated by Snail1 in human colon cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2007;14(1):141-51.
- Larue L, Kumasaka M, Goding CR. Beta-catenin in the melanocyte lineage. *Pigment cell research* 2003;16(3):312-7.
- Laressergues D, Couzigou JM, Clemente HS, Martinez Y, Dunand C, Becard G, et al. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature* 2015;520(7545):90-3.
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013;499(7457):214-8.
- Le Poole IC, Mutis T, van den Wijngaard RM, Westerhof W, Ottenhoff T, de Vries RR, et al. A novel, antigen-presenting function of melanocytes and its possible relationship to hypopigmentary disorders. *J Immunol* 1993;151(12):7284-92.
- Lee CH, Wu SB, Hong CH, Yu HS, Wei YH. Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. *Int J Mol Sci* 2013;14(3):6414-35.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75(5):843-54.
- Levine A, McGovern VJ, Mishima Y, Oettle AG. Terminology of vertebrate melanin-containing cells, their precursors, and related cells: a report of the nomenclature committee of the Sixth International Pigment Cell Conference. . (eds) GDPaOM, editor: Springer, Berlin, 1966.
- Levy C, Khaled M, Robinson KC, Veguilla RA, Chen PH, Yokoyama S, et al. Lineage-specific transcriptional regulation of DICER by MITF in melanocytes. *Cell* 2010;141(6):994-1005.
- Li L, Fukunaga-Kalabis M, Yu H, Xu X, Kong J, Lee JT, et al. Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. *Journal of cell science* 2010;123(Pt 6):853-60.
- Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 2007;445(7130):843-50.
- Lindahl T. The Intrinsic Fragility of DNA (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie* 2016;55(30):8528-34.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002;108(6):837-47.



- Liu L, Nam S, Tian Y, Yang F, Wu J, Wang Y, et al. 6-Bromoindirubin-3'-oxime inhibits JAK/STAT3 signaling and induces apoptosis of human melanoma cells. *Cancer research* 2011;71(11):3972-9.
- Lopez-Camarillo C, Ocampo EA, Casamichana ML, Perez-Plasencia C, Alvarez-Sanchez E, Marchat LA. Protein Kinases and Transcription Factors Activation in Response to UV-Radiation of Skin: Implications for Carcinogenesis. *International journal of molecular sciences* 2012;13(1):142-72.
- Lowry WE, Blanpain C, Nowak JA, Guasch G, Lewis L, Fuchs E. Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev* 2005;19(13):1596-611.
- Luciani F, Champeval D, Herbet A, Denat L, Aylaj B, Martinozzi S, et al. Biological and mathematical modeling of melanocyte development. *Development* 2011;138(18):3943-54.
- Lyle S, Hoover K, Colpan C, Zhu Z, Matijasevic Z, Jones SN. Dicer cooperates with p53 to suppress DNA damage and skin carcinogenesis in mice. *PloS one* 2014;9(6):e100920.
- Ma Z, Swede H, Cassarino D, Fleming E, Fire A, Dadras SS. Up-regulated Dicer expression in patients with cutaneous melanoma. *PloS one* 2011;6(6):e20494.
- MacKenzie MA, Jordan SA, Budd PS, Jackson IJ. Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev Biol* 1997;192(1):99-107.
- MacRae IJ, Doudna JA. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 2007;17(1):138-45.
- MacRae IJ, Zhou K, Doudna JA. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14(10):934-40.
- Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 2006;311(5758):195-8.
- Mahmoud BH, Ruvolo E, Hexsel CL, Liu Y, Owen MR, Kollias N, et al. Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. *The Journal of investigative dermatology* 2010;130(8):2092-7.
- Maksimovic S, Nakatani M, Baba Y, Nelson AM, Marshall KL, Wellnitz SA, et al. Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature* 2014;509(7502):617-21.
- Manga P, Boissy RE, Pifko-Hirst S, Zhou BK, Orlow SJ. Mislocalization of melanosomal proteins in melanocytes from mice with oculocutaneous albinism type 2. *Exp Eye Res* 2001;72(6):695-710.
- Margue C, Philippidou D, Reinsbach SE, Schmitt M, Behrmann I, Kreis S. New target genes of MITF-induced microRNA-211 contribute to melanoma cell invasion. *PloS one* 2013;8(9):e73473.
- Marieb EN HK. Anatomie et physiologie humaine. 4e édition ed: Paris : Pearson. : ERPI., 2010.
- Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, et al. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell* 2010;141(7):1195-207.
- McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 2002;109(6):707-18.
- McKeown SJ, Lee VM, Bronner-Fraser M, Newgreen DF, Farlie PG. Sox10 overexpression induces neural crest-like cells from all dorsoventral levels of the neural tube but inhibits differentiation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2005;233(2):430-44.

- Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, et al. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chemistry & biology* 2003;10(12):1255-66.
- Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006;355(1):51-65.
- Millington GW. Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors. *Clin Exp Dermatol* 2006;31(3):407-12.
- Miravet S, Piedra J, Castano J, Raurell I, Franci C, Dunach M, et al. Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 2003;23(20):7391-402.
- Montoliu L, Gronskov K, Wei AH, Martinez-Garcia M, Fernandez A, Arveiler B, et al. Increasing the complexity: new genes and new types of albinism. *Pigment cell & melanoma research* 2014;27(1):11-8.
- Mori MA, Raghavan P, Thomou T, Boucher J, Robida-Stubbs S, Macotela Y, et al. Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metab* 2012;16(3):336-47.
- Much C, Auchynnikava T, Pavlinic D, Buness A, Rappsilber J, Benes V, et al. Endogenous Mouse Dicer Is an Exclusively Cytoplasmic Protein. *PLoS Genet* 2016;12(6):e1006095.
- Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102(34):12135-40.
- Nakagawa A, Shi Y, Kage-Nakadai E, Mitani S, Xue D. Caspase-dependent conversion of Dicer ribonuclease into a death-promoting deoxyribonuclease. *Science* 2010;328(5976):327-34.
- Natarajan VT, Ganju P, Ramkumar A, Grover R, Gokhale RS. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nat Chem Biol* 2014;10(7):542-51.
- Nicholson AW. Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2014;5(1):31-48.
- Nicolaou A, Estdale SE, Tsatmali M, Herrero DP, Thody AJ. Prostaglandin production by melanocytic cells and the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone. *FEBS Lett* 2004;570(1-3):223-6.
- Niedernhofer LJ. Nucleotide excision repair deficient mouse models and neurological disease. *DNA repair* 2008;7(7):1180-9.
- Nishimura EK. Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment cell & melanoma research* 2011;24(3):401-10.
- Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 2002;416(6883):854-60.
- Nomura M, Kaji A, Ma WY, Zhong S, Liu G, Bowden GT, et al. Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates activation of Akt by ultraviolet B irradiation. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(27):25558-67.
- Noonan FP, Zaidi MR, Wolnicka-Glubisz A, Anver MR, Bahn J, Wielgus A, et al. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. *Nature communications* 2012;3:884.
- Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP. The pigmentary system : Physiology and Pathophysiology. New York, NY: Oxford University Press, 1998.
- Nowakowski TJ, Mysiak KS, O'Leary T, Fotaki V, Pratt T, Price DJ. Loss of functional Dicer in mouse radial glia cell-autonomously prolongs cortical neurogenesis. *Dev Biol* 2013;382(2):530-7.

- Okamoto N, Aoto T, Uhara H, Yamazaki S, Akutsu H, Umezawa A, et al. A melanocyte--melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. *Pigment cell & melanoma research* 2014;27(6):1039-50.
- Oren M, Bartek J. The sunny side of p53. *Cell* 2007;128(5):826-8.
- Ozel Turkcu U, Tekin NS, Edgunlu TG, Karakas SC, Oner S. The association of Foxo3a gene polymorphisms with serum Foxo3a levels and oxidative stress markers in vitiligo patients. *Gene* 2013.
- Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, et al. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol* 2001;154(2):369-87.
- Pang X, Hogan EM, Casserly A, Gao G, Gardner PD, Tapper AR. Dicer expression is essential for adult midbrain dopaminergic neuron maintenance and survival. *Mol Cell Neurosci* 2014;58:22-8.
- Panzella L, Leone L, Greco G, Vitiello G, D'Errico G, Napolitano A, et al. Red human hair pheomelanin is a potent pro-oxidant mediating UV-independent contributory mechanisms of melanomagenesis. *Pigment cell & melanoma research* 2014;27(2):244-52.
- Papadopoulou T, Richly H. On-site remodeling at chromatin: How multiprotein complexes are rebuilt during DNA repair and transcriptional activation. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2016;38(11):1130-40.
- Passeron T, Valencia JC, Bertolotto C, Hoashi T, Le Pape E, Takahashi K, et al. SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104(35):13984-9.
- Pelle E, Mammone T, Maes D, Frenkel K. Keratinocytes act as a source of reactive oxygen species by transferring hydrogen peroxide to melanocytes. *The Journal of investigative dermatology* 2005;124(4):793-7.
- Peng Y, Jahroudi N. The NFY transcription factor inhibits von Willebrand factor promoter activation in non-endothelial cells through recruitment of histone deacetylases. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(10):8385-94.
- Perdiz D, Grof P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E, Sage E. Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(35):26732-42.
- Petit V, Larue L. Any route for melanoblasts to colonize the skin! *Exp Dermatol* 2016.
- Pitulescu ME, Schmidt I, Benedito R, Adams RH. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nature protocols* 2010;5(9):1518-34.
- Prasad R, Katiyar SK. Ultraviolet radiation-induced inflammation activates beta-catenin signaling in mouse skin and skin tumors. *International journal of oncology* 2014;44(4):1199-206.
- Premi S, Wallisch S, Mano CM, Weiner AB, Bacchiocchi A, Wakamatsu K, et al. Photochemistry. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science* 2015;347(6224):842-7.
- Quan T, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(9):8079-85.
- Rambow F, Bechadergue A, Luciani F, Gros G, Domingues M, Bonaventure J, et al. Regulation of Melanoma Progression through the TCF4/miR-125b/NEDD9 Cascade. *The Journal of investigative dermatology* 2016;136(6):1229-37.

- Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids* 2010;2010:592980.
- Regazzetti C, Joly F, Marty C, Rivier M, Mehul B, Reiniche P, et al. Transcriptional Analysis of Vitiligo Skin Reveals the Alteration of WNT Pathway: A Promising Target for Repigmenting Vitiligo Patients. *The Journal of investigative dermatology* 2015;135(12):3105-14.
- Rimm DL, Caca K, Hu G, Harrison FB, Fearon ER. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am J Pathol* 1999;154(2):325-9.
- Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 1996;274(5290):1194-7.
- Sachsenmaier C, Radler-Pohl A, Zinck R, Nordheim A, Herrlich P, Rahmsdorf HJ. Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell* 1994;78(6):963-72.
- Saito H, Yasumoto K, Takeda K, Takahashi K, Fukuzaki A, Orikasa S, et al. Melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform activates its own gene promoter through physical interaction with lymphoid-enhancing factor 1. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(32):28787-94.
- Saitoh M, Uzuka M, Sakamoto M. Human hair cycle. *The Journal of investigative dermatology* 1970;54(1):65-81.
- Sancar A. Mechanisms of DNA Repair by Photolyase and Excision Nuclease (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie* 2016;55(30):8502-27.
- Sapkota GP, Cummings L, Newell FS, Armstrong C, Bain J, Frodin M, et al. BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. *The Biochemical journal* 2007;401(1):29-38.
- Sarna T, Pilas B, Land EJ, Truscott TG. Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochimica et biophysica acta* 1986;883(1):162-7.
- Sasaki T, Shimizu N. Evolutionary conservation of a unique amino acid sequence in human DICER protein essential for binding to Argonaute family proteins. *Gene* 2007;396(2):312-20.
- Saurat N, Andersson T, Vasistha NA, Molnar Z, Livesey FJ. Dicer is required for neural stem cell multipotency and lineage progression during cerebral cortex development. *Neural Dev* 2013;8:14.
- Schalk C, Cognat V, Graindorge S, Vincent T, Voinnet O, Molinier J. Small RNA-mediated repair of UV-induced DNA lesions by the DNA DAMAGE-BINDING PROTEIN 2 and ARGONAUTE 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2017;114(14):E2965-E74.
- Schartl M, Larue L, Goda M, Bosenberg MW, Hashimoto H, Kelsh RN. What is a vertebrate pigment cell? *Pigment cell & melanoma research* 2016;29(1):8-14.
- Schepsky A, Bruser K, Gunnarsson GJ, Goodall J, Hallsson JH, Goding CR, et al. The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression. *Mol Cell Biol* 2006;26(23):8914-27.
- Schouten GJ, Vertegaal AC, Whiteside ST, Israel A, Toebes M, Dorsman JC, et al. IkappaB alpha is a target for the mitogen-activated 90 kDa ribosomal S6 kinase. *The EMBO journal* 1997;16(11):3133-44.
- Sha J, Gastman BR, Morris N, Mesinkovska NA, Baron ED, Cooper KD, et al. The Response of microRNAs to Solar UVR in Skin-Resident Melanocytes Differs between Melanoma Patients and Healthy Persons. *PloS one* 2016;11(5):e0154915.

- Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 2016;16(6):345-58.
- Sharma M, Jamieson C, Johnson M, Molloy MP, Henderson BR. Specific armadillo repeat sequences facilitate beta-catenin nuclear transport in live cells via direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358. *The Journal of biological chemistry* 2012;287(2):819-31.
- She QB, Ma WY, Dong Z. Role of MAP kinases in UVB-induced phosphorylation of p53 at serine 20. *Oncogene* 2002a;21(10):1580-9.
- She QB, Ma WY, Zhong S, Dong Z. Activation of JNK1, RSK2, and MSK1 is involved in serine 112 phosphorylation of Bad by ultraviolet B radiation. *The Journal of biological chemistry* 2002b;277(27):24039-48.
- Singh S, Bevan SC, Patil K, Newton DC, Marsden PA. Extensive variation in the 5'-UTR of Dicer mRNAs influences translational efficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335(3):643-50.
- Singh SK, Kurfurst R, Nizard C, Schnebert S, Perrier E, Tobin DJ. Melanin transfer in human skin cells is mediated by filopodia--a model for homotypic and heterotypic lysosome-related organelle transfer. *FASEB J* 2010;24(10):3756-69.
- Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Filipowicz W, Svoboda P. Dicer is associated with ribosomal DNA chromatin in mammalian cells. *PloS one* 2010;5(8):e12175.
- Sirbu BM, Cortez D. DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(8):a012724.
- Smith AG, Luk N, Newton RA, Roberts DW, Sturm RA, Muscat GE. Melanocortin-1 receptor signaling markedly induces the expression of the NR4A nuclear receptor subgroup in melanocytic cells. *The Journal of biological chemistry* 2008;283(18):12564-70.
- Smith KA, Tong X, Abu-Yousif AO, Mikulec CC, Gottardi CJ, Fischer SM, et al. UVB radiation-induced beta-catenin signaling is enhanced by COX-2 expression in keratinocytes. *Mol Carcinog* 2012;51(9):734-45.
- Smits VA, Gillespie DA. DNA damage control: regulation and functions of checkpoint kinase 1. *FEBS J* 2015;282(19):3681-92.
- Spritz RA. Modern vitiligo genetics sheds new light on an ancient disease. *The Journal of dermatology* 2013;40(5):310-8.
- St-Jacques B, Dassule HR, Karavanova I, Botchkarev VA, Li J, Danielian PS, et al. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr Biol* 1998;8(19):1058-68.
- Staal FJ, Luis TC, Tiemessen MM. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol* 2008;8(8):581-93.
- Steingrimsson E, Moore KJ, Lamoreux ML, Ferre-D'Amare AR, Burley SK, Zimring DC, et al. Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nature genetics* 1994;8(3):256-63.
- Strozyk E, Kulms D. The role of AKT/mTOR pathway in stress response to UV-irradiation: implication in skin carcinogenesis by regulation of apoptosis, autophagy and senescence. *Int J Mol Sci* 2013;14(8):15260-85.
- Su X, Chakravarti D, Cho MS, Liu L, Gi YJ, Lin YL, et al. Tap63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature* 2010;467(7318):986-90.
- Svegliati S, Marrone G, Pezone A, Spadoni T, Grieco A, Moroncini G, et al. Oxidative DNA damage induces the ATM-mediated transcriptional suppression of the Wnt inhibitor WIF-1 in systemic sclerosis and fibrosis. *Sci Signal* 2014;7(341):ra84.
- Swope VB, Jameson JA, McFarland KL, Supp DM, Miller WE, McGraw DW, et al. Defining MC1R regulation in human melanocytes by its agonist alpha-melanocortin and

- antagonists agouti signaling protein and beta-defensin 3. *The Journal of investigative dermatology* 2012;132(9):2255-62.
- Syed DN, Khan MI, Shabbir M, Mukhtar H. MicroRNAs in skin response to UV radiation. *Current drug targets* 2013;14(10):1128-34.
- Tada M, Kohno M, Niwano Y. Scavenging or quenching effect of melanin on superoxide anion and singlet oxygen. *J Clin Biochem Nutr* 2010;46(3):224-8.
- Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, et al. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nature cell biology* 2008;10(8):923-34.
- Tadeu AM, Horsley V. Epithelial stem cells in adult skin. *Curr Top Dev Biol* 2014;107:109-31.
- Tadokoro R, Takahashi Y. Intercellular transfer of organelles during body pigmentation. *Current opinion in genetics & development* 2017;45:132-8.
- Taieb A, Alomar A, Bohm M, Dell'anna ML, De Pase A, Eleftheriadou V, et al. Guidelines for the management of vitiligo: the European Dermatology Forum consensus. *Br J Dermatol* 2013;168(1):5-19.
- Takeuchi S, Zhang W, Wakamatsu K, Ito S, Hearing VJ, Kraemer KH, et al. Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101(42):15076-81.
- To SKY, Mak ASC, Eva Fung YM, Che CM, Li SS, Deng W, et al. beta-catenin downregulates Dicer to promote ovarian cancer metastasis. *Oncogene* 2017.
- Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et biophysica acta* 2011;1813(11):1938-45.
- Ugurel S, Rohmel J, Ascierto PA, Flaherty KT, Grob JJ, Hauschild A, et al. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: The impact of novel therapies. *Eur J Cancer* 2016;53:125-34.
- Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of beta-catenin. *The EMBO journal* 2012;31(12):2714-36.
- van den Beucken T, Koch E, Chu K, Rupaimoole R, Prickaerts P, Adriaens M, et al. Hypoxia promotes stem cell phenotypes and poor prognosis through epigenetic regulation of DICER. *Nat Commun* 2014;5:5203.
- Van Laethem A, Garmyn M, Agostinis P. Starting and propagating apoptotic signals in UVB irradiated keratinocytes. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2009;8(3):299-308.
- Van Mater D, Kolligs FT, Dlugosz AA, Fearon ER. 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* 2003;17(10):1219-24.
- Videira IF, Moura DF, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol* 2013;88(1):76-83.
- Viros A, Sanchez-Laorden B, Pedersen M, Furney SJ, Rae J, Hogan K, et al. Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature* 2014;511(7510):478-82.
- Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29(22):3085-96.

- Wagner RY, Luciani F, Cario-Andre M, Rubod A, Petit V, Benzekri L, et al. Altered E-Cadherin Levels and Distribution in Melanocytes Precede Clinical Manifestations of Vitiligo. *The Journal of investigative dermatology* 2015;135(7):1810-9.
- Wan YS, Wang ZQ, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation activates PI 3-kinase/AKT survival pathway via EGF receptors in human skin in vivo. *International journal of oncology* 2001;18(3):461-6.
- Wang X, Chen WR, Xing D. A pathway from JNK through decreased ERK and Akt activities for FOXO3a nuclear translocation in response to UV irradiation. *Journal of cellular physiology* 2012;227(3):1168-78.
- Waster P, Rosdahl I, Ollinger K. Cell fate regulated by nuclear factor-kappaB- and activator protein-1-dependent signalling in human melanocytes exposed to ultraviolet A and ultraviolet B. *Br J Dermatol* 2014;171(6):1336-46.
- Wei W, Ba Z, Gao M, Wu Y, Ma Y, Amiard S, et al. A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell* 2012;149(1):101-12.
- Welker NC, Maity TS, Ye X, Aruscavage PJ, Krauchuk AA, Liu Q, et al. Dicer's helicase domain discriminates dsRNA termini to promote an altered reaction mode. *Mol Cell* 2011;41(5):589-99.
- White E, Schlackow M, Kamieniarz-Gdula K, Proudfoot NJ, Gullerova M. Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol* 2014;21(6):552-9.
- Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control* 2001;12(1):69-82.
- Wiesen JL, Tomasi TB. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol Immunol* 2009;46(6):1222-8.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993;75(5):855-62.
- Wilkie AL, Jordan SA, Jackson IJ. Neural crest progenitors of the melanocyte lineage: coat colour patterns revisited. *Development* 2002;129(14):3349-57.
- Woo SH, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, Baba Y, Qiu Z, et al. Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature* 2014;509(7502):622-6.
- Wostenberg C, Lary JW, Sahu D, Acevedo R, Quarles KA, Cole JL, et al. The role of human Dicer-dsRBD in processing small regulatory RNAs. *PloS one* 2012;7(12):e51829.
- Wu CS, Yu CL, Wu CS, Lan CC, Yu HS. Narrow-band ultraviolet-B stimulates proliferation and migration of cultured melanocytes. *Exp Dermatol* 2004;13(12):755-63.
- Yajima I, Belloir E, Bourgeois Y, Kumasaka M, Delmas V, Larue L. Spatiotemporal gene control by the Cre-ERT2 system in melanocytes. *Genesis* 2006;44(1):34-43.
- Yajima I, Larue L. The location of heart melanocytes is specified and the level of pigmentation in the heart may correlate with coat color. *Pigment cell & melanoma research* 2008;21(4):471-6.
- Yamada T, Hasegawa S, Inoue Y, Date Y, Yamamoto N, Mizutani H, et al. Wnt/beta-catenin and kit signaling sequentially regulate melanocyte stem cell differentiation in UVB-induced epidermal pigmentation. *The Journal of investigative dermatology* 2013;133(12):2753-62.
- Yamamura K, Kamada S, Ito S, Nakagawa K, Ichihashi M, Tsujimoto Y. Accelerated disappearance of melanocytes in bcl-2-deficient mice. *Cancer research* 1996;56(15):3546-50.
- Yang W, Xia Y, Ji H, Zheng Y, Liang J, Huang W, et al. Nuclear PKM2 regulates beta-catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature* 2011;480(7375):118-22.

- Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovsky A, et al. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nature genetics* 2006;38(3):356-62.
- Yoon MK, Ha JH, Lee MS, Chi SW. Structure and apoptotic function of p73. *BMB Rep* 2015;48(2):81-90.
- Yu M, Bell RH, Ho MM, Leung G, Haegert A, Carr N, et al. Deficiency in nucleotide excision repair family gene activity, especially ERCC3, is associated with non-pigmented hair fiber growth. *PloS one* 2012;7(5):e34185.
- Yu Z, Wang L, Wang C, Ju X, Wang M, Chen K, et al. Cyclin D1 induction of Dicer governs microRNA processing and expression in breast cancer. *Nat Commun* 2013;4:2812.
- Zbytek B, Carlson JA, Granese J, Ross J, Mihm MC, Jr., Slominski A. Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert review of dermatology* 2008;3(5):569-85.
- Zhang B, Chen H, Zhang L, Dakhova O, Zhang Y, Lewis MT, et al. A dosage-dependent pleiotropic role of Dicer in prostate cancer growth and metastasis. *Oncogene* 2014;33(24):3099-108.
- Zhang H, Hou W, Henrot L, Schnebert S, Dumas M, Heusele C, et al. Modelling epidermis homeostasis and psoriasis pathogenesis. *J R Soc Interface* 2015;12(103).
- Zhang Y, Zhong S, Dong Z, Chen N, Bode AM, Ma W, et al. UVA induces Ser381 phosphorylation of p90RSK/MAPKAP-K1 via ERK and JNK pathways. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(18):14572-80.
- Zhao ZM, Reynolds AB, Gaucher EA. The evolutionary history of the catenin gene family during metazoan evolution. *BMC Evol Biol* 2011;11:198.
- Zhong JL, Yang L, Lu F, Xiao H, Xu R, Wang L, et al. UVA, UVB and UVC induce differential response signaling pathways converged on the eIF2alpha phosphorylation. *Photochem Photobiol* 2011;87(5):1092-104.



## ANNEXE

**Z Aktary\*, JU Bertrand\*, and L Larue. The WNT-less wonder: WNT-independent  $\beta$ -catenin signaling. *Pigment Cell Melanoma Res* 2016;29:524-540.**

