

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Année 2013

Thèse n°2101

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Génétique

Présentée et soutenue publiquement le 11 décembre 2013

Par

Fanny MORICE PICARD

Née le 25 septembre 1976 à Mont-Saint-Aignan

**Etude clinique et génétique de l'Albinisme Oculocutané :**  
**Développement d'outils de diagnostic moléculaire et recherche de nouveaux gènes.**

Composition du jury :

Mr le Pr Lluís MONTOLIU  
Mr. le Pr. Patrick CALVAS  
Mr. le Pr. Michel VIDAUD  
Mr. le Pr. Alain TAIEB  
Mr. le Pr. Benoît ARVEILER  
Mr. le Pr. Didier LACOMBE

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Membre invité  
Directeur de thèse

## REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes remerciements :

Aux membres du Jury :

A Monsieur le professeur Lluis Montoliu d'avoir accepté de présider cette thèse,

A Monsieur le professeur Patrick Calvas et Monsieur le professeur Michel Vidaud qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail,

A Monsieur le professeur Alain Taïeb, pour l'intérêt porté à ce travail et la qualité de son enseignement.

A Monsieur le professeur Didier Lacombe, pour avoir accepté de diriger ce travail et m'avoir accueillie au sein de son équipe hospitalière et de recherche.

A Monsieur le professeur Benoit Arveiler, pour m'avoir permis de réaliser ce travail, pour sa disponibilité, les conseils et le soutien qu'il m'a apportés tout au long de cette thèse.

A l'ensemble de l'équipe du laboratoire MRGM et en particulier :

A Delphine, Stéphane qui ont largement contribué à la partie technique de ce travail et à Giovanni, pour ses conseils précieux, mais également à Isabelle et Cyril pour leur écoute. Et pour leur aide et leur bonne humeur : Fanny, Magalie, Estelle, Emeline, Marie-Laure, Julie et Julie, Christelle, Nadège, Emilie.

A l'équipe hospitalière de génétique moléculaire, en particulier à Eulalie pour son implication dans l'activité de diagnostic moléculaire du laboratoire, à Caroline pour ses conseils et son soutien, à Dorothee, Claudio et Patricia.

A Khaled et Hamid pour leur aide dans ce travail.

A toute l'équipe du service de génétique médicale, Sophie, Marie-Ange, Sébastien, Nada, Eva, Emmanuelle, Sonia, Cécile, Guénola, Danièle, Laetitia et Armelle pour leur écoute quotidienne !

A toute l'équipe du service de dermatologie pédiatrique de l'hôpital des Enfants, Christine, Franck, Stéphanie, Florence, Sylvie, Emmanuelle.

## **REMERCIEMENTS**

A Nicolas,

A Charlotte, Clémence et Joseph,

A Emilie et Juliette,

A mes parents,

A tous mes amis.

# TABLE DES MATIERES

<b>PREAMBULE</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>10</b>
<b>I BIOLOGIE DE LA PIGMENTATION HUMAINE</b>	<b>11</b>
<b>I.A LES MELANOCYTES</b>	<b>11</b>
<b>I.B DEVELOPPEMENT DES MELANOCYTES</b>	<b>13</b>
I.b.1 Le développement et la migration des mélanoblastes depuis la crête neurale vers les sites périphériques	13
I.b.2 Régulation génétique de la mélanocytogenèse	15
I.b.3 Différentiation des mélanoblastes en mélanocytes	20
<b>I.C MELANOGENESE ET FORMATION DU MELANOSOME</b>	<b>21</b>
I.c.1 Mélanogenèse	21
I.c.2 Formation du mélanosome	27
<b>I.D TRANSPORT DES MELANOSOMES</b>	<b>30</b>
I.d.1 Transport des mélanosomes dans le mélanocyte	30
I.d.2 Transfert des mélanosomes aux kératinocytes	32
I.d.3 Distribution et dégradation des mélanosomes dans les kératinocytes	33
<b>I.E REGULATION DE LA PIGMENTATION CONSTITUTIONNELLE</b>	<b>33</b>
I.e.1 Contrôle génétique	33
I.e.2 Rayonnements ultraviolets	33
<b>I.F ROLE PHYSIOLOGIQUE DE LA MELANINE</b>	<b>37</b>
I.f .1 Pigmentation constitutionnelle de la peau et des phanères	37
I.f.2. Pigmentation Facultative	39
I.f .3. Action photoprotectrice des mélanines	40
I.f .4 Régulation immunitaire	40
I.f .5 Chélation d'agents toxiques:	40
<b>II PHYSIOPATHOLOGIE DES ANOMALIES GENETIQUES DE LA PIGMENTATION CONSTITUTIONNELLE</b>	<b>42</b>
<b>II.A ANOMALIES DE LA MIGRATION DES MELANOBLASTES DERIVES DE LA CRETE NEURALE</b>	<b>42</b>
II.a.1. Le piebaldisme	42
II.a.2. Le syndrome de Waardenburg (WS)	42
<b>II.B DEF AUT DE LA FORMATION ET DU TRANSPORT DU MELANOSOME</b>	<b>43</b>
II.b.1. Le syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS)	44
II.b.2. Le syndrome de Chediak-Higashi (CHS)	44
II.b.3. Le syndrome de Griscelli-Prunieras (GPS)	45
<b>II.C DEF AULTS DE SYNTHESE DE LA MELANINE</b>	<b>45</b>
<b>III L'ALBINISME OCULO-CUTANE</b>	<b>48</b>
<b>III.A LES SIGNES COMMUNS AUX DIFFERENTS AOC</b>	<b>48</b>
III.a.1 Atteinte cutanéophanéérienne	48

III.a .2. Atteinte ophtalmologique	49
<b>III.B LES METHODES DIAGNOSTIQUES DE L'AOC</b>	<b>50</b>
III.b.1 L'examen clinique	50
III.b.2. Les explorations électrophysiologiques	52
III.b.3. L'imagerie	52
III.b.4. Le diagnostic moléculaire	54
<b>III.C PRISE EN CHARGE DES PATIENTS PRESENTANT UN AOC</b>	<b>55</b>
III.c.1 Photoprotection cutanée	55
III.c.2 Favoriser le développement visuel	55
III.c.3 Perspectives thérapeutiques	56
III.c.4 Conseil génétique	57
<b>III.D LES DIFFERENTS TYPES D'AOC</b>	<b>58</b>
III.d.1. L'AOC de type I	58
III.d.2. L'AOC de type II	60
III.d.3. L'AOC de type III	61
III.d.4. L'AOC de type IV	62
III.d.5. L'AOC de type V	63
III.d.6. L'AOC de type VI	63
III.d.7. L'AOC de type VII	64
<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b>	<b>65</b>
<hr/>	
<b>RESULTATS</b>	<b>67</b>
<hr/>	
<b>I. ETUDE CLINICO-MOLECULAIRE DE L'ALBINISME OCULO-CUTANE</b>	<b>68</b>
<b>I.A INTRODUCTION</b>	<b>68</b>
<b>I.B DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE L'ALBINISME OCULOCUTANE ET DESCRIPTION DE NOUVELLES MUTATIONS DANS LES GENES OCA1-4</b>	<b>68</b>
<b>I.C ETUDE LA MUTATION P.GLY47ASP DE LA TYROSINASE</b>	<b>73</b>
<b>I.D BASE DE DONNEES CLINICOBIOLOGIQUES</b>	<b>75</b>
I.d.1 Méthodologie et résultats préliminaires	75
I.d.2. Discussion	82
<b>I.E ANALYSE DE NOUVEAUX GENES</b>	<b>84</b>
<b>I.F CONCLUSION</b>	<b>87</b>
<b>I.G ARTICLE : MOLECULAR DIAGNOSIS OF OCULOCUTANEOUS ALBINISM : NEW MUTATIONS IN THE OCA1-4 GENES AND PRACTICAL ASPECTS.</b>	<b>88</b>
<b>I.H ARTICLE : GENETIC BASIS OF OCULOCUTANEOUS ALBINISM.</b>	<b>88</b>
<b>I.I ARTICLE : SLC24A5 MUTATIONS ARE ASSOCIATED WITH NON-SYNDROMIC OCULOCUTANEOUS ALBINISM.</b>	<b>88</b>
<b>II. RECHERCHE DE REMANIEMENTS DANS LES GENES D'ALBINISME OCULOCUTANE</b>	<b>89</b>
<b>II.A DONNEES PREALABLES</b>	<b>89</b>
<b>II.B IDENTIFICATION D'UNE DELETION CHEZ DES PATIENTS D'ORIGINE POLONAISE</b>	<b>90</b>
<b>II.C RECHERCHE DE REARRANGEMENTS DES GENES D'AOC</b>	<b>95</b>
<b>II.D IDENTIFICATION D'UN REMANIEMENT IMPLIQUANT <i>GPR143</i></b>	<b>102</b>

<b>II.E DISCUSSION</b>	<b>104</b>
<b>II.F ARTICLE: HIGH RESOLUTION MAPPING OF <i>OCA2</i> INTRAGENIC REARRANGEMENTS AND IDENTIFICATION OF A FOUNDER EFFECT ASSOCIATED WITH A DELETION IN POLISH ALBINO PATIENTS.</b>	<b>105</b>
<b>II.G ARTICLE: HIGH RESOLUTION ARRAY-CGH IN PATIENTS WITH OCULOCUTANEOUS ALBINISM IDENTIFIES NEW DELETIONS OF THE <i>TYR</i>, <i>OCA2</i> AND <i>SLC45A2</i> GENES, AND A COMPLEX REARRANGEMENT OF THE <i>OCA2</i> GENE.</b>	<b>105</b>
<b>III. RECHERCHE DE NOUVEAUX GENES IMPLIQUES DANS L'ALBINISME OCULOCUTANE.</b>	<b>106</b>
<b>III.A INTRODUCTION</b>	<b>106</b>
<b>III.B LA CARTOGRAPHIE PAR HOMOZYGOTIE</b>	<b>106</b>
<b>III.C LE SEQUENÇAGE D'EXOME</b>	<b>108</b>
<b>III.D CONCLUSION</b>	<b>114</b>
<b>IV. ETUDE D'UN REMANIEMENT IMPLIQUANT LES GENES <i>OCA2</i> ET <i>HERC2</i> CHEZ UN PATIENT PRESENTANT UN SYNDROME NEUROLOGIQUE</b>	<b>115</b>
<b>IV.A CONTEXTE</b>	<b>115</b>
<b>IV.B CAS CLINIQUE</b>	<b>115</b>
<b>IV.C PRINCIPAUX RESULTATS</b>	<b>116</b>
<b>IV.D CONCLUSION</b>	<b>121</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>131</b>

## Préambule

---

L'albinisme regroupe un ensemble d'affections héréditaires liées à un défaut de synthèse de la mélanine, pigment élaboré dans les mélanocytes, qui sont les cellules spécialisées de la peau, des cheveux, de l'iris, de l'épithélium pigmenté de la rétine et de l'oreille interne, et associées à un nombre et une structure normale de mélanocytes (Oetting and King, 1999). Les individus avec un AOC ont une sensibilité accrue aux rayonnements UV et une prédisposition aux cancers cutanés. La mélanine est également essentielle au développement de l'œil. La réduction de synthèse de la mélanine pendant le développement de l'œil est associée à un développement incomplet de la fovéa et perturbe le trajet axonal des fibres optiques (Summers, 1996, 2009).

L'albinisme oculo-cutané (AOC) comporte une hypopigmentation cutanéophanérienne généralisée et une atteinte ophtalmologique. Les différents types d'AOC non syndromiques sont de transmission autosomique récessive et présentent des spécificités cliniques, épidémiologiques et moléculaires (Grønskov et al., 2007a). On en connaît quatre types associés à des anomalies géniques spécifiques. Par ailleurs, il existe des albinismes oculaires purs (syndrome de Nettleship-Falls MIM 300500), des syndromes avec hypopigmentation partielle comme le piebaldisme et le syndrome de Waardenburg liés à une anomalie de migration des mélanoblastes de la crête neurale vers la peau, et des albinismes complexes comportant des anomalies non pigmentaires (anomalie de la coagulation, immunodéficience) dont le syndrome d'Hermansky-Pudlak (MIM 203300) et le syndrome de Chediak-Higashi (MIM 214500) associés à une anomalie de formation du mélanosome dans le mélanocyte.

La fonction essentielle de la mélanine est la photoprotection. Les sujets avec AOC des populations d'Afrique noire présentent tous des dommages actiniques à un âge précoce et des carcinomes cutanés avec une fréquence d'environ 30 % dès l'âge de 30 ans d'après les différentes études (Mabula et al., 2012; de Vijlder et al., 2012). La mélanine joue un rôle de photoprotection par un mécanisme soit directe par diffraction ou réflexion du rayonnement UV (phénomène de capping des mélanosomes se regroupant au-dessus du noyau des kératinocytes et des mélanocytes protégeant ainsi l'ADN de la cellule), soit indirecte par piégeage de radicaux libres et détoxification par chélation d'agents chimiques et pharmacologiques susceptibles de s'accumuler dans les tissus (Gibbs et al., 2000).

Sur le plan épidémiologique, l'albinisme est une affection universelle. Elle est la plus fréquente des hypopigmentations généralisées héréditaires, avec une prévalence générale

de 1/17 000. Cependant elle varie d'une forme à l'autre et d'un continent à l'autre. La forme la plus fréquente à travers le monde est le type 1 (Grønskov et al., 2007a). Aux États-Unis d'Amérique, sa fréquence pour l'ensemble de la population est d'environ 1/36 000, plus élevée chez les Afro-Américains (1/12 000)(Lee et al., 1994). Sur le continent africain elle peut atteindre 1/1 000 (Okoro, 1975). L'AOC1 est peu commun chez les Noirs-africains et Afro-américains et plus fréquent chez les blancs (Caucasiens). L'AOC3 a initialement été décrit chez les Noirs-africains et Afro-américains mais des cas ont été rapportés ensuite chez des Caucasiens et des patients asiatiques (Forsheew et al., 2005; Rooryck et al., 2006; Yamada et al., 2011; Zhang et al., 2011). L'AOC4 est la forme la plus commune des AOC tyrosinase positif au Japon (Inagaki et al., 2004). Récemment des mutations du gène *C10orf11* ont été impliquées dans une forme d'albinisme oculocutanée chez des patients originaires des îles Faroe (Grønskov et al., 2013a). Enfin un patient avec un albinisme oculocutané présentant des mutations du gène *SLC24A5* a été décrit (Wei et al., 2013a).

Les différentes revues de la littérature ainsi que les données de notre laboratoire montre qu'environ 15% des patients avec un albinisme oculocutané restent sans diagnostic moléculaire (Rooryck et al., 2008a). Ceci suggère que les mutations se trouvent dans les régions non explorées des gènes connus et ne sont pas détectés par les techniques classiques ou bien qu'il existe d'autres gènes responsables d'albinisme oculocutané chez ces patients.

Le but de cette thèse est d'étudier les aspects cliniques et moléculaires de l'albinisme oculocutané et de rechercher de nouveaux mécanismes moléculaires et de nouveaux gènes impliqués dans l'albinisme.

Notre travail a consisté en la constitution d'une base de données clinicobiologique. Nous avons analysé les phénotypes des patients AOC selon leur génotype et les signes cliniques des patients AOC sans diagnostic moléculaire. Nous avons développé les techniques de diagnostic moléculaire de l'AOC afin d'augmenter le taux de détection de mutation (puce CGH array à façon, séquençage des gènes dans leur intégralité incluant séquences régulatrices, régions 5' et 3' UTR, introns). D'autre part la recherche de nouveaux gènes candidats a été menée par cartographie d'homozygotie et séquençage d'exome chez des patients présentant un AOC typique sans mutation dans les gènes connus.

Nous présenterons ce travail en deux parties.

Dans la première partie, nous aborderons la biologie de la pigmentation humaine, son embryogenèse, ses mécanismes et les gènes impliqués dans le développement du système pigmentaire et dans sa régulation. Nous décrirons ensuite les affections génétiques

présentant une hypopigmentation en développant en particulier les aspects cliniques et moléculaires des albinismes oculocutanés.

Dans la deuxième partie, seront présentés les différents travaux réalisés en décrivant les données de l'étude clinico-moléculaire de l'AOC, de l'analyse des gènes d'AOC avec l'utilisation de la *puce custom* haute-résolution, et ceux de l'étude de gènes candidats impliqués dans l'albinisme oculocutané.

# Introduction

# I Biologie de la pigmentation humaine

---

La mélanine, principal pigment influençant la couleur de la peau, est synthétisée dans des cellules spécialisées : les mélanocytes et les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.

L'acquisition d'une pigmentation est un processus complexe, qui nécessite que le système pigmentaire se développe correctement au niveau embryonnaire et que tous les éléments impliqués dans le processus de pigmentation (mélanogénèse, biogénèse et transport des mélanosomes, et finalement transfert des mélanosomes aux kératinocytes) soit fonctionnel.

La pigmentation mélanique est génétiquement prédéterminée.

Cependant elle peut être régulée par les rayonnements ultraviolets (UV), ainsi que par de nombreux agents (hormones, peptides, médiateurs chimiques) qui sont capables de stimuler ou d'inhiber la pigmentation cutanée. On peut distinguer une pigmentation constitutionnelle et une pigmentation facultative.

La différenciation des mélanocytes ou mélanocytogénèse est couramment subdivisée en quatre étapes :

- Le développement et la migration des mélanoblastes depuis la crête neurale vers les sites périphériques
- La différenciation des mélanoblastes en mélanocytes,
- La survie et la prolifération des mélanocytes,
- La synthèse de la mélanine ou mélanogénèse.

## I.a Les mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques pigmentogènes, issues de la crête neurale, situées principalement au niveau de la couche basale de l'épiderme. Ils assurent la pigmentation de la peau. Ils se divisent peu sauf sous l'effet de stimulations telles que la stimulation ultraviolette.

Le système mélanocytaire comprend en plus de ce compartiment épidermique majoritaire, un compartiment folliculaire et un compartiment très minoritaire correspondant aux mélanocytes des muqueuses et des yeux. La masse mélanocytaire active et fonctionnelle de la peau peut être estimée de 1 à 1,5 cm<sup>3</sup> chez un individu adulte.

Au niveau de la couche basale de l'épiderme, il y a 1 mélanocyte pour 5 à 10 kératinocytes. Les mélanocytes forment avec les kératinocytes voisins des unités épidermiques de mélanisation. Chaque mélanocyte établit ainsi des contacts avec une moyenne de 30 à 40 kératinocytes. C'est au sein de cette unité que les mélanosomes, organelles contenant la mélanine sont transférés au kératinocyte.

Le positionnement des mélanocytes dans l'épiderme est stabilisé par des interactions avec les kératinocytes et certains constituants de la membrane basale faisant intervenir plusieurs intégrines. La cadhérine-E, exprimée in vitro par les mélanocytes et les kératinocytes, semble jouer un rôle important dans les interactions mélanocyte-kératinocyte.

Il existe une variation de la densité des mélanocytes d'une région à l'autre du tégument. Ainsi les zones comme la face, les avant-bras et la région génitale (2 000/mm<sup>2</sup>) ont une densité mélanocytaire plus importante que le reste du corps (900-1 500/mm<sup>2</sup>).

La différence existant entre les divers phototypes ne provient pas du nombre de mélanocytes mais de leur activité pigmentogène et du transfert de la mélanine au sein de chaque UEM. Le mode de distribution de ces mélanosomes dans les kératinocytes aurait aussi une influence sur la coloration finale du tégument (Fitzpatrick et al, 1979).

Des facteurs génétiques et environnementaux (exposition aux UV) font varier la densité mélanocytaire, ainsi que la sénescence et certains facteurs hormonaux.

Les mélanocytes du compartiment folliculaire sont localisés au niveau de l'infundibulum de la paroi de la tige pileaire et dans la partie supérieure du bulbe pileaire au contact du sommet de la papille dermique. Les phases du cycle pileaire influencent la croissance et l'activité mélanogénique des mélanocytes. Comme dans l'épiderme, le nombre de mélanocytes folliculaires va en décroissant avec l'âge, entraînant à partir de la troisième décennie un grisonnement, puis à terme un blanchiment complet de la chevelure. Une apoptose mélanocytaire impliquant la famille d'oncogènes Bcl-2 pourrait intervenir dans ce phénomène de dépopulation mélanocytaire.

## **I.b Développement des mélanocytes**

### **I.b.1 Le développement et la migration des mélanoblastes depuis la crête neurale vers les sites périphériques**

#### **I.b.1.1. Le développement des mélanoblastes**

Les mélanocytes ont pour précurseurs les mélanoblastes, cellules dérivées de la crête neurale. Toutes les cellules pigmentées à l'exception des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) de l'oeil dérivent de la crête neurale.

Les crêtes neurales sont des structures transitoires des embryons de vertébrés, qui apparaissent à la jonction entre l'ectoderme et le tube neural (Figure 2).

Les cellules de la crête neurale s'individualisent lors de la fermeture de la gouttière neurale et migrent ensuite le long de voies définies jusqu'à des régions spécifiques de l'embryon, où elles terminent leur différenciation pour former outre les cellules pigmentaires, plusieurs lignées cellulaires, telles que des cellules de gliales, certains neurones (ganglions spinaux, ganglions entériques), les cellules de la médullosurrénale et certaines cellules osseuses et mésenchymateuses du squelette facial (Le Douarin and Dupin, 1993).

La destinée des cellules de la crête neurale est restreinte en fonction de leur site d'origine le long de l'axe neural. Des cellules de crêtes neurales sont déterminées en tant que mélanoblastes dans la zone de migration constituée par l'espace situé entre la surface dorsale du tube neural, les somites et l'épiderme.

La spécification est un processus par lequel une cellule indifférenciée commence à exprimer des marqueurs et à développer le comportement spécifique d'un de ses dérivés potentiels. La spécification des cellules de la crête neurale détermine la voie de migration. Cette différence de comportement migratoire est influencée par l'expression de molécules signales et de récepteurs à la surface cellulaire (Le Douarin and Dupin, 1993).

#### **I.b.1.2. La migration des mélanoblastes**

Dès la sortie du tube neural, les deux populations cellulaires neurogéniques et mélanogéniques dérivées de la crête neurale ont des propriétés migratoires distinctes. Les cellules de la crête neurale neurogéniques migrent ventralement le long du tube neural puis à travers les somites jusqu'à leur site où elles forment les ganglions. Les cellules de la crête neurale mélanogéniques migrent selon une voie dorsolatérale entre l'ectoderme et le dermomyotome (occasionnellement quelques mélanoblastes passent par une voie ventrale).

Dès la huitième semaine de vie embryonnaire chez l'homme, ils vont pénétrer et proliférer dans le mésoderme sous-épidermique, puis coloniser l'épiderme et les follicules pileux.

Des mélanoblastes, en empruntant les mêmes voies de migration, vont également coloniser certaines structures oculaires (choroïde, stroma ciliaire et irien), auditives (organe vestibulaire, strie vasculaire du canal cochléaire) et nerveuses (leptoméninges).

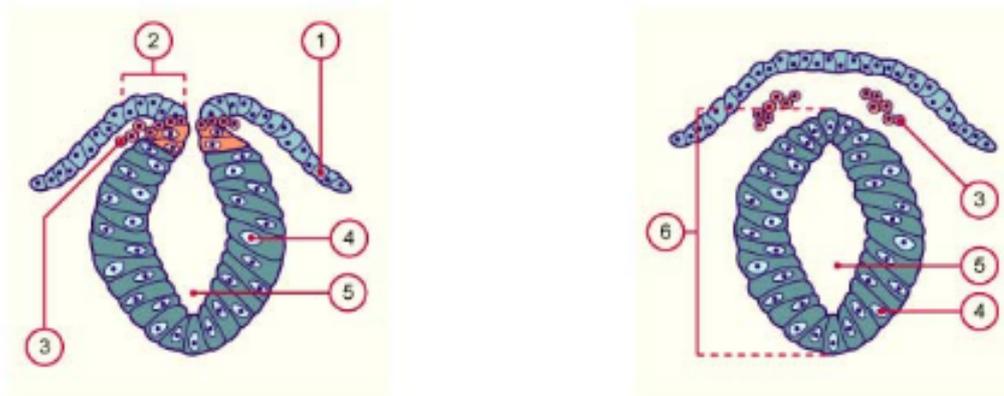


Figure 2. Schéma du développement des crêtes neurales et de la formation à partir de la plaque neurale du tube neural. Replis de la plaque neurale qui forme la gouttière neurale puis s'individualise en tube neural. (d'après [www.embryology.ch/francais/vcns/tubecrete04.html](http://www.embryology.ch/francais/vcns/tubecrete04.html))

Légende :

- |  |                      |
|--|----------------------|
| 1. épiblaste                                 | 4. Neuroépithélium   |
| 2. bourrelets neuraux                        | 5. canal épendymaire |
| 3. cellules des crêtes neurales en migration | 6. tube neural       |

## I.b.2 Régulation génétique de la mélanocytogenèse

La mélanocytogenèse est une suite d'étapes complexes qui fait intervenir de nombreux gènes. La compréhension de ses mécanismes a été guidée par l'étude de lignées de souris présentant différents troubles de la pigmentation et dont la sélection a permis le clonage de gènes intervenant dans la mélanogenèse de la Souris et de l'Homme.

Lors de l'embryogenèse et en période post-natale, les mélanoblastes expriment une série de gènes de développement. Ces gènes appartiennent à deux catégories : des gènes codant des facteurs de transcription et des gènes intervenant dans des voies de signalisation impliquées dans la communication intercellulaire. Ils peuvent intervenir dans la survie des cellules du lignage mélanocytaire et/ou une ou plusieurs étapes de leur développement : leur détermination, leur migration, leur prolifération, la colonisation des différents tissus cibles, et enfin leur différenciation en mélanocytes (Erickson and Goins, 1995).

Les principaux sont les gènes codant les facteurs de transcription *MITF* (*Microphthalmia-associated transcription factor*), *PAX3* (*paired box gene 3*) et *SOX10* (*SRY-box containing gene 10*) ainsi que des gènes intervenant dans les voies de signalisation du récepteur à activité tyrosine-kinase *KIT* et celle du récepteur EDRNB (endothelin receptor type B). Ces gènes sont exprimés séquentiellement par les mélanoblastes au cours de leur différenciation (Aubin-Houzelstein et al., 2008).

### I.b.2.1. Les facteurs de Transcriptions

Microphthalmia (MITF) :

C'est une protéine appartenant à une famille de facteurs de transcription impliqués dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaire et dans la régulation du développement. Il s'agit d'une protéine intégratrice clé dans la cascade régulatrice de la pigmentation (Widlund and Fisher, 2003).

L'étude de ce gène a été réalisée initialement chez la Souris à partir des mutants microphthalmia qui lui ont donné son nom : *Microphthalmia-associated transcription factor* (*Mitf*). Chez l'Homme, le gène *MITF* est localisé en 3p12.3-p14.1 et s'étend sur 230 kilobases (kb). Il inclut 13 exons. 5 promoteurs alternatifs ont été décrits induisant la production de 9 isoformes différentes. Cette organisation est conservée chez la Souris et l'homme.

Différents gènes régulent l'expression de MITF :

- SOX10, en combinaison avec PAX3, régule l'expression de *MITF*

SOX10 se lie au promoteur de *MITF* et se comporte comme un activateur fort de l'expression de *MITF*. Une forme mutée de la protéine SOX10 réprime de façon dominante négative l'expression de *MITF*. Il semble que l'activation de l'expression de *MITF* par SOX10 était stimulée par PAX3. Cette transactivation est directe : le promoteur de *MITF* comporte plusieurs sites de fixation pour SOX10. Le promoteur de *MITF* comporte également un site de liaison à PAX3. Ainsi, les facteurs de transcription SOX10 et PAX3 interviennent en synergie dans l'établissement de l'expression de *MITF* dans les cellules du lignage mélanocytaire.

- Interactions entre *KIT* et *MITF*

Chez la Souris, il a été montré que *Kit* et *Mitf* interagissaient génétiquement. Des cultures de crêtes neurales de souris ont permis de montrer que l'initiation de l'expression du gène *Mitf* était indépendante de KIT mais que la différenciation des mélanoblastes en mélanocytes était dépendante de KIT. De plus, le promoteur du gène *Kit* contient une M-box (boîte M) et l'expression de *Kit* peut être induite par MITF via la boîte M. Dans les mélanoblastes, MITF est requis pour augmenter l'expression de *Kit* mais pas pour l'initier. De plus, dans les mélanocytes normaux et issus de mélanomes en culture, la voie de signalisation KIT/KITL conduit à une augmentation de la phosphorylation de MITF (Hou and Pavan, 2008).

Une fois phosphorylé, MITF s'associe au co-activateur transcriptionnel p300 pour activer la transcription de gènes cibles (Sato et al., 1997). D'autres expériences ont montré que la phosphorylation de MITF entraînait sa dégradation.

Ainsi KIT et MITF ont donc des interactions très complexes. MITF semble nécessaire pour le maintien de l'expression de *Kit* dans les mélanoblastes. La voie de signalisation KIT/KITL semble quant à elle moduler l'activité et la stabilité de MITF dans les mélanocytes en culture.

- Régulation de l'expression de *MITF* par le signal *WNT*/βcatenin (Goding, 2000)

Il a été montré que la protéine WNT pouvait réguler l'expression de MITF. La présence d'un signal *Wnt* entraîne une augmentation de la concentration en β-caténine dans la cellule. La β-caténine est transloquée vers le noyau où elle forme un complexe avec les membres de la famille de facteurs de transcription *LEF* (*Lymphoid Enhancer Factor*). Comme *Sox10*, les protéines de la famille Lef appartiennent à un groupe de protéines de régulation possédant une boîte de type *High Mobility Group*. La présence de *Lef1* seul, sans expression de *WNT* et donc sans β-caténine a un effet répresseur de *MITF* tandis que le

complexe  $\beta$ -catenines/Lef1 augmente son expression. L'expression de *WNT* aurait donc un rôle de dé-répression sur *LEF1* (Slominski et al., 2004).

- Régulation de l'expression de *MITF* par l'AMPc (Bertolotto et al., 1998)

Dans le mélanocyte, la fixation de l' $\alpha$ MSH (*Melanocyte Stimulating Hormone*) sur son récepteur MC1R (*Melanocortin 1 Receptor*) induit l'élévation d'un second messager : l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique ou AMP cyclique). L'isolement du promoteur de *MITF* a révélé la présence d'un élément de réponse à l'AMPc appelé CRE (*cAMP Response Element*). Une élévation du niveau d'AMPc entraînerait l'augmentation de la concentration cellulaire en MITF.

L'action de l'AMPc serait indirecte, une cascade de phosphorylations aboutissant à la phosphorylation de CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*) permettrait la fixation de celui-ci sur CRE et la stimulation de l'expression de *MITF*.

FOXD3 :

FOXD3 est un facteur de transcription. Il réprime la transcription de *Mitf* durant les phases précoces de la migration des cellules de la crête neurale et généralement réprime la spécification des mélanoblastes et la mélanogenèse. Il a été montré que FoxD3 régulait ainsi le switch entre les cellules gliales dérivées de la crête neurale et cellules mélanocytaires (Thomas and Erickson, 2009). L'expression de FoxD3 est régulé par les voies Wnt et BMP.

PAX3 :

C'est un facteur de transcription dont l'action n'est pas clairement établie. Une interaction PAX3-MITF serait en jeu : PAX3 stimulerait l'expression de MITF en se liant directement sur son promoteur (Bondurand et al., 2000).

Le gène *PAX3* appartient à la famille des gènes *PAX* qui sont hautement conservés. Cette famille code des facteurs de transcription caractérisés par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN, le domaine *paired*. Certaines protéines PAX dont la protéine PAX3, possèdent un autre domaine de liaison à l'ADN, l'homéodomaine. Ce domaine permet la reconnaissance de la séquence palindromique 5'-TAAT(N)2-3ATTA-3' par les protéines dimérisées. Entre le domaine *paired* et l'homéodomaine, un domaine composé de huit acides aminés a été identifié sur toutes les protéines PAX, excepté PAX4 et PAX6. Des délétions de cet octapeptide suggèrent que ce domaine est impliqué dans une activité

d'inhibition de la transcription, alors que la partie carboxy-terminale des protéines PAX serait un domaine d'activation de la transcription.

Des études portant sur des mutants de Souris *Pax3* ont montré que *PAX3* est requis pour la migration et la prolifération des mélanoblastes, ainsi que pour leur différenciation en mélanocytes (Hornyak et al., 2001).

SOX10 :

SOX10 est un facteur de transcription impliqué dans le développement et la survie des mélanoblastes, qui agit indirectement sur ces cellules en stimulant l'expression du MITF en coopération avec PAX3. Cette action passe ainsi par la transactivation concomitante par SOX10 et PAX3 du promoteur du gène du MITF (Bondurand et al., 2000).

*SOX10* appartient à la famille des gènes SOX. Les protéines SOX sont des facteurs de transcription caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN homologue au domaine HMG (*High Mobility Group*) du gène *SRY* qui détermine le sexe chez les Mammifères. Vingt protéines SOX ont été identifiées chez les Mammifères, elles sont largement exprimées durant l'embryogenèse. Les protéines SOX ont été classées dans différents groupes en fonction des acides aminés de leur domaine HMG. La protéine SOX10 fait partie du sous-groupe E avec les protéines SOX8 et SOX9. Les protéines SOX possèdent une capacité très forte à se lier à l'ADN. Elles sont impliquées dans l'architecture de la conformation tridimensionnelle du complexe ADN-multiprotéines sur les promoteurs et les séquences régulatrices, conduisant ainsi à la transcription des gènes. Les protéines SOX sont impliquées dans de nombreux processus du développement, dont la détermination sexuelle et le développement des crêtes neurales. Elles interviennent dans le devenir des cellules au cours du développement. Les protéines SOX sont largement exprimées lors de l'embryogenèse. Chez l'adulte, elles sont exprimées dans une large variété de tissus et de types cellulaires et chacun des gènes codant les protéines SOX a un profil d'expression précis. Au cours du développement, *SOX10* est exprimé dans les ganglions sympathiques dorsaux et craniaux, dans les ganglions entériques, ainsi que dans les cellules localisées dans la voie de migration dorso-latérale empruntées par les mélanoblastes en migration. Toujours à l'aide de mutants de souris, il a été montré que *SOX10* interviendrait dans la survie précoce et la détermination tardive des mélanoblastes (Potterf et al., 2001).

## I.b.2.2. Les gènes intervenant dans les voies de signalisation

### c-Kit :

C-Kit est un récepteur membranaire exprimé à la surface des mélanoblastes. Son ligand le stem cell factor (SCF) ou mast cell growth factor (MGF). Ceci fait évoquer un rôle du couple c-Kit/SCF dans la migration et/ou la survie des mélanoblastes via une fonction antiapoptotique (Steel et al., 1992).

La voie de signalisation KIT/KITL est impliquée dans la migration, la prolifération et/ou la survie de quatre types cellulaires différents : les mélanoblastes issus des crêtes neurales, les cellules hématopoïétiques dont les érythrocytes et les mastocytes, les cellules germinales et les cellules interstitielles de Cajal. Les rôles de cette voie de signalisation ont été découverts pour ces quatre types cellulaires par l'étude des modèles murins mutants *Kit* et *Kitl*. Le protooncogène *KIT* code un récepteur trans-membranaire appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (Chabot et al., 1988).

Le gène *KITL* code le ligand de la protéine KIT, appelée KITL, MGF (*Mast cell Growth Factor*) ou SCF (*Stem Cell factor*). La protéine KITL existe sous forme soluble ou associée à la membrane plasmique des cellules. Le mécanisme de transduction du signal par le couple KIT/KITL est analogue à celui des autres récepteurs à activité tyrosine-kinase, activant la voie des Ras-MAP Kinases. Durant l'embryogenèse, la migration et la localisation des précurseurs des mélanoblastes sont guidés par la voie de signalisation KIT/KITL. En l'absence des protéines KIT ou KITL fonctionnelles (étude de mutants nuls *Kit* de Souris), les précurseurs des mélanocytes semblent stopper leur migration et disparaissent peu de temps après. La voie de signalisation KIT/KITL est donc impliquée dans la migration des précurseurs des mélanocytes, puis dans leur survie.

### Endothéline-3 (EDN3):

Les endothélines appartiennent à une famille de peptides de 21 acides aminés composée de trois membres. Elles ont une activité vasoconstrictrice. Chez la Souris, les trois endothélines sont codées par les gènes *Edn1*, *Edn2* et *Edn3* (endothélines 1, 2 et 3). Chacun de ces gènes codent une pré-pro-endothéline qui est convertie en endothéline par protéolyse. Les précurseurs des endothélines sont clivés par deux protéases pour produire les endothélines matures et actives. Les pré-proendothélines sont clivées par des endopeptidases pour former des intermédiaires biologiquement inactifs appelés grosses-endothélines. Les grosses-endothélines sont ensuite clivées par des enzymes de conversion de l'endothéline : *Endothelin Enzyme Convertase* (ECE) pour donner la forme active de l'endothéline.

Les endothélines actives se lient à deux récepteurs distincts : EDNRA (Récepteur de type A de l'endothéline) et EDNRB (Récepteur de type B à l'endothéline) qui appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les récepteurs sont codés respectivement par les gènes *Ednra* et *Ednrb* chez la Souris. La protéine EDNRB peut lier EDN1, EDN2 et EDN3 avec une même affinité, alors que la protéine EDNRA lie préférentiellement EDN1 et EDN2.

Le couple EDN1/EDNRA est essentiel au développement des tissus céphaliques dérivés des cellules des crêtes neurales chez la Souris. Au contraire, le couple EDN3/EDNRB est essentiel au développement des mélanocytes et des neurones entériques. Il a été montré, chez la Souris, que l'EDN3 était *in vitro* un puissant mitogène des cellules pluripotentes des crêtes neurales et un inducteur de la différenciation de ces cellules vers les lignées mélanocytaire et gliale et que la voie EDN3/EDNRB était nécessaire à la migration des mélanoblastes.

#### **I.b.3 Différenciation des mélanoblastes en mélanocytes**

La différenciation mélanocytaire est marquée par l'acquisition d'une activité tyrosinase, la présence de mélanosomes matures dans le cytoplasme et la formation de dendrites. Les mélanosomes sont des lysosomes modifiés, spécifiques des mélanocytes. Le mélanocyte conserve un potentiel mitotique après différenciation.

## **I.c Mélanogenèse et formation du mélanosome**

### **I.c.1 Mélanogenèse**

#### **I.c.1.1. Principaux types de mélanines**

Les mélanines sont des polymères. Il s'agit d'un ensemble de molécules proches présentant différents degrés de polymérisation et d'oxydation (Slominski et al., 2004). Ces propriétés physicochimiques sont utilisées pour classer les mélanines en deux grands types, les eumélanines et les phaeomélanines :

– les eumélanines sont des mélanines de haut poids moléculaire, de couleur brune ou noire, insolubles dans la plupart des solvants. Elles résultent de la polymérisation oxydative de divers précurseurs indoliques à structure cyclique dérivés de la dopaquinone, en particulier la 5,6-dihydroxyindole (DHI). Leur couleur noire ou foncée découle de leur structure cyclique qui piège la lumière ;

– les phaeomélanines sont des mélanines de couleur jaune orangé, solubles dans les bases, ayant des teneurs élevées en azote et en soufre. Elles proviennent de la polymérisation oxydative des cystéinyl-dopas ;

– les mélanines « mixtes » : la classification biochimique des mélanines en deux types bien distincts est schématique. Une copolymérisation impliquant des monomères d'eumélanines et de phaeomélanines peut survenir *in vivo*, avec un mélange en quantité variable des deux types de pigments.

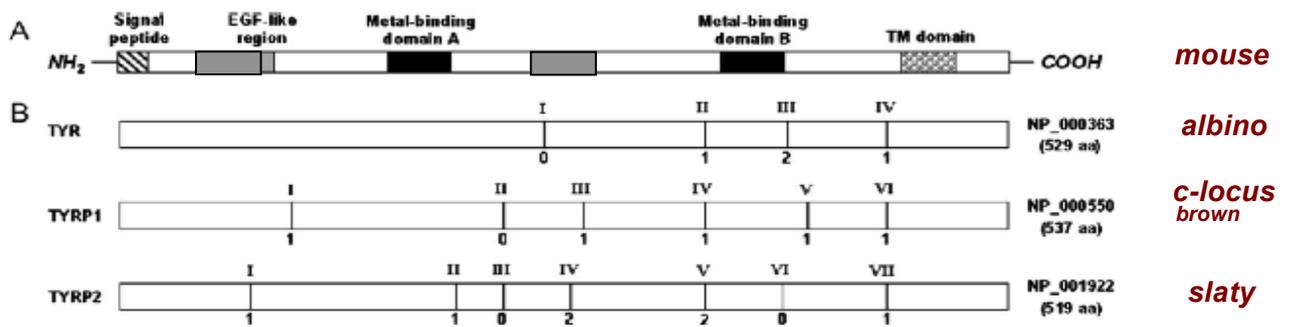
#### **I.c.1.2. Biosynthèse des mélanines et contrôle enzymatique de la mélanogenèse**

La mélanogenèse résulte d'une succession de réactions catalysées par différentes enzymes dont trois sont bien caractérisées : la tyrosinase, la TRP-1 et la TRP-2.

Ces trois enzymes sont des protéines transmembranaires siégeant dans la paroi des mélanosomes. Elles possèdent environ 40 % d'homologie de séquence. Les régions conservées correspondent aux domaines fonctionnels importants comme la partie C-terminale (peptide signal), le domaine transmembranaire, deux sites de liaison au cuivre et trois régions riches en cystéines impliquées dans le repliement correct et le maintien du domaine N-terminal (Klabunde et al., 1998).

Elles sont synthétisées sous forme de protéines d'environ 55 kDa, qui vont maturer et subir des modifications post traductionnelles dans l'appareil de Golgi, avant d'être délivrées aux mélanosomes sous forme de protéines matures glycosylées d'environ 75 kDa (Kwon, 1993). La transcription et la fonction des 3 enzymes (tyrosinase, THI, PAH) sont régulées par le 3',5'-cyclic adénosine monophosphate (cAMP) cAMP response element. Ainsi, l'AMPc est un régulateur clé de la mélanogenèse. Les récepteurs qui stimulent la synthèse d'AMPc incluent le MC1R, b-MSH/MC4R, le récepteur b2-adrénergique, le récepteur muscarinique (Schallreuter et al., 2008).

- La tyrosinase est codée par le locus albino de la souris ; le gène est localisé sur le chromosome 11 chez l'homme. Elle catalyse les deux premières réactions de la voie de synthèse des mélanines, l'hydroxylation de la tyrosine en dopa et l'oxydation de la dopa en dopaquinone (Körner and Pawelek, 1982). Elle constitue ainsi l'enzyme limitante de la mélanogenèse. Une activité DHI oxydase lui a également été associée (Hearing, 1987).
- La TRP-1 est codée par le locus Brown de la souris (chromosome 9 chez l'homme). Sa fonction principale est d'oxyder l'acide 5,6-DHI-2 carboxylique (DHICA) en acide indole-5,6-quinone-2 carboxylique (Manga et al., 2000). Tyrp1 a également un rôle important dans la stabilisation de la tyrosinase dans les mélanosomes (Jiménez-Cervantes et al., 1998; Kobayashi et al., 1994; Winder et al., 1994).
- La TRP-2 ou dopachrome tautomérase (DCT) est codée par le locus slaty de la souris (chromosome 13 chez l'homme). Elle possède la capacité d'isomériser la dopachrome en DHICA. En l'absence de TRP-2, la dopachrome peut cependant être spontanément convertie en 5,6-DHI.



**Figure 5. Comparaison des structures exon-intron des gènes de la famille tyrosinase** (d'après (Sturm et al., 2001). En haut, illustration schématique de la structure générique des membres de la famille tyrosinase montrant la position du peptide signal (SS), de la région Epidermal Growth factor-like (EGF), des deux domaines catalytiques (Metal-binding A et B), de la région riche en cystéines (Cys-rich) et du domaine transmembranaire (TM). En dessous figurent des représentations des protéines TYR, TYRP1 et TYRP2 (DCT) avec les exons symbolisés par des boîtes. La numérotation des introns dans la partie codante est indiquée en chiffre romain au-dessus des jonctions, et la phase des introns en-dessous. Les interruptions de phases sont notées 0 – entre deux codons, 1 – entre le premier et le second nucléotide du codon, 2 – entre le deuxième et le troisième nucléotide du codon.

La synthèse de mélanine a pour substrat un acide aminé, la tyrosine, transformée par oxydation successivement en 3-4 dopa, puis en dopaquinone en présence d'oxygène moléculaire sous l'action de la tyrosinase. Les voies de synthèse divergent à partir de la synthèse de la dopaquinone, impliquant TRP-1 et TRP-2 dans l'eumélanogénèse, et l'incorporation de dérivés soufrés dans la phaeomélanogénèse. La synthèse de phéomélanines dépend de la concentration en cystine. La dopaquinone est comme les autres quinones un composé très réactif et ainsi :

1/ En l'absence de groupements thiols (cystéine et/ou glutathion, GSH), la dopaquinone subit une réaction de cyclisation intramoléculaire pour donner naissance au leucodopachrome, molécule incolore possédant un noyau orthodiphénolique (forme réduite)(Riley, 1999). Le leucodopachrome est ensuite oxydé en dopachrome, molécule colorée possédant un noyau orthodiquinonique. Puis une réaction d'oxydo-réduction se produit entre ces deux composés pour donner naissance à la dopa (diphénol) et au dopachrome (diquinone) colorée (d' Ischia et al., 2013).

- Le dopachrome ainsi formé peut suivre deux voies : la première est sa transformation en acide 5,6-Di-Hydroxy-Indole-2 Carboxylique (DHICA) sous l'action de la dopachrome tautomérase ou TRP -2. Ce composé est ensuite oxydé en DHIC-quinone sous l'action de la DHIC-oxydase ou TRP-1. TRP-1 joue également un rôle important dans la stabilité de la

tyrosinase. La polymérisation des molécules de DHIC-quinone conduit aux eumélanines brunes, solubles en raison du caractère hydrophile des groupements carboxyliques.

- L'activité du TRP1 ou du TRP2 joue un rôle important dans la qualité et la quantité des eumélanines produites. La deuxième voie est la décarboxylation du dopachrome en 5,6-Di-Hydroxy-Indole (DHI) qui sera oxydé par la tyrosinase en DHI-quinone. La polymérisation des molécules de DHI-quinone conduit aux eumélanines noires, insolubles en raison de l'absence de groupements carboxyliques. Les eumélanines mixtes sont des polymères très hétérogènes consistant en un mélange de résidus de DHI et de DHIC sous forme réduite incolore (orthodiphénol) et oxydée colorée (orthodiquinone) unis par des liaisons C-C très solides entre les carbones 2, 4 et 7 de DHI et les carbones 4 et 7 du DHIC.

2/ En présence de groupements thiols, la dopaquinone donne naissance à des produits d'addition, principalement la 5-S-cystéinyldopa (5-S-CD). L'oxydation ultérieure des molécules de 5-S-CD conduit aux phéomélanines via la production d'intermédiaires benzothiaziniques. La formation des phéomélanines ne nécessite que l'activité de la tyrosinase.

Le point le plus critique dans la commutation entre eumélanine et phéomélanine est le suivant : la réaction d'addition entre la cystéine et la dopaquinone se déroule plus vite que la réaction de cyclisation intramoléculaire. Ces aspects cinétiques indiquent que la phéomélanogénèse se produit préférentiellement lorsque la cystéine est présente, même à de faibles concentrations (Benathan et al., 1999).

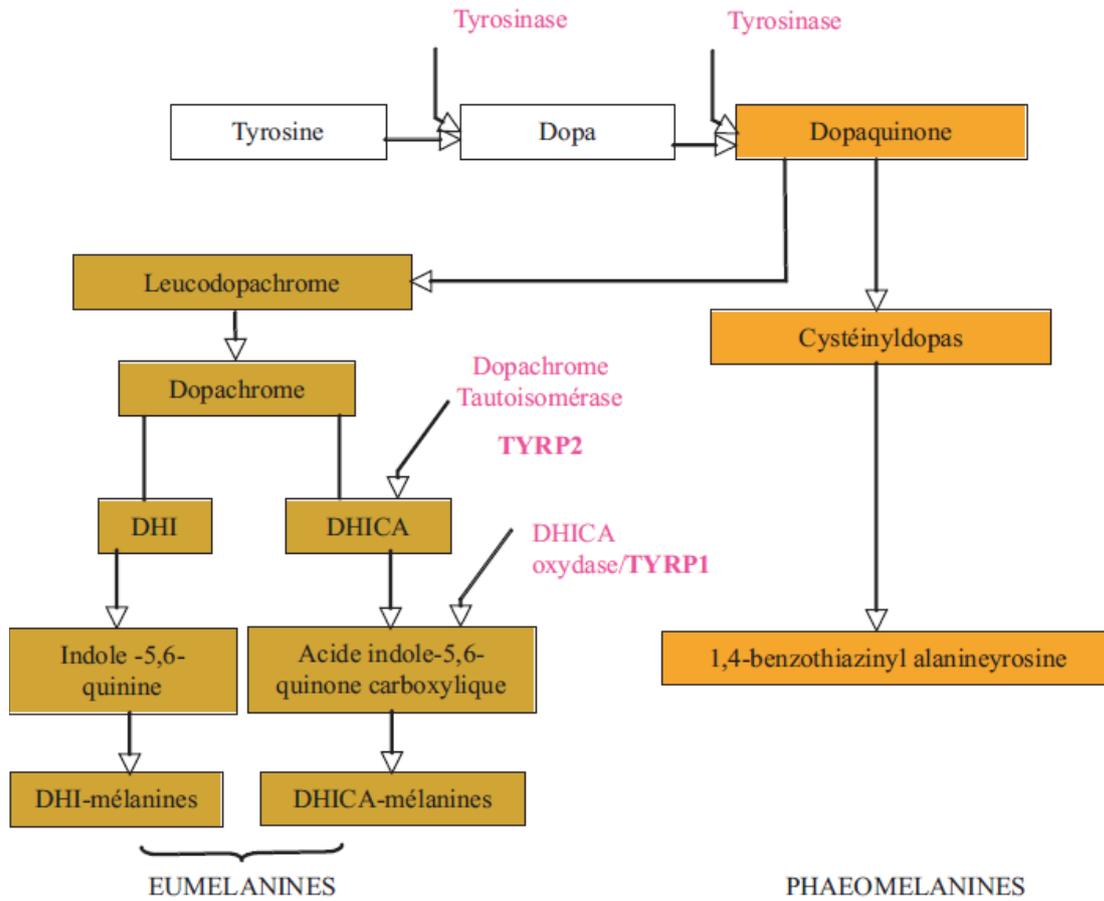


Figure 6. Schéma des voies de synthèse des mélanines.

### I.c.1.3. Autres protéines impliquées dans la mélanogenèse

La protéine P : c'est une protéine de 110 kDa de la membrane des mélanosomes, codée par le gène situé au locus pink-eyed dilution (chromosome 15 chez l'homme). Il a été montré que la protéine P intervient dans la régulation du pH des mélanosomes et contrôle ainsi indirectement la mélanogenèse (Ancans et al., 2001). Elle influence la balance eumélanine/phéomélanine. En effet, le pH est un facteur essentiel à la production de mélanine et les variations de pH dans les mélanosomes influent directement leur activité mélanogénique (Ancans et al., 2001).

Pmel-17 (PMEL ou gp100) : c'est une glycoprotéine de 110 kDa spécifique des mélanocytes et des mélanomes, localisée dans la matrice des mélanosomes et codée par le locus silver de la souris (chromosome 12 chez l'homme). Pmel17 joue un rôle essentiel dans les premières étapes du développement des mélanosomes en formant après clivage protéolytique une matrice amyloïde fibrillaire permettant le dépôt de la mélanine. La région N-terminal (NTR) de PMEL n'est pas un composant des fibrilles mais est essentiel à leur formation. La séquence NTR fonctionne en cis pour guider l'agrégation du domaine PKD (polycystic kidney disease) dans le core de la matrice mélanosomale. Cette étape est essentielle à la stabilisation et à la maturation protéolytique terminale en trans des précurseurs des fragments fibrillogènes secondaires (Leonhardt et al., 2013). Le domaine NTR de PMEL contrôle l'assemblage hiérarchique des fibrilles mélanosomales.

Membrane associated transporter protein (MATP) : c'est une protéine de la paroi des mélanosomes dont la fonction exacte est inconnue. Il s'agit d'une protéine à 12 domaines transmembranaires, avec probable fonction de transporteur membranaire. Elle est codée par le gène *SLC45A2*. Elle est impliquée dans le trafic intracellulaire de la tyrosinase vers le mélanosome permettant sa maturation normale. Le déficit de *SLC45A2* conduit à une sécrétion extracellulaire prématurée de la tyrosinase (Costin et al., 2003).

La protéine membranaire canalaire transporteur de cystine/glutamate est codée par le gène *SLC7A11* et joue un rôle majeur dans la régulation de la phéomélanine dans les mélanocytes, ayant peu d'effet sur l'eumélanine. Des mutations de ce gène sont responsables chez la souris du phénotype sut (subtle grey) qui associe une dilution pigmentaire à des anomalies plaquettaires avec allongement du temps de saignement et présence de granules denses plaquettaires (Swank et al., 1996). De plus le, transport de la cystéine est essentiel pour la prolifération, la production de glutathion et la protection des cellules en culture contre le stress oxydatif (Chintala et al., 2005). Enfin *SLC7A11* semble

réguler le transport de la Tyrosinase et son déficit entraîne une accumulation de la tyrosinase dans le Reticulum Endoplasmique.

La protéine NCKX5 code une protéine membranaire intracellulaire localisée au niveau du réseau trans golgien (Ginger et al., 2008). Il s'agit d'une protéine de transport calcium/sodium potassium dépendant. Elle est impliquée dans la régulation de la mélanogenèse via un mécanisme faisant intervenir le métabolisme des stérols (Wilson et al., 2013). Elle est codée par le gène *SLC24A5*.

### **I.c.2 Formation du mélanosome**

La synthèse des mélanines s'effectue dans les mélanosomes, organites cytoplasmiques spécifiques des mélanocytes appartenant à la lignée lysosomiale (LRO Lysosomes related organelles). Ces deux organelles possèdent en commun un compartiment interne acide, des protéines membranaires, les LAMP (Lysosome-associated-membrane-protein) et des hydrolases acides.

Le mécanisme de maturation des mélanosomes proposé par Seiji en 1961 a été confirmé par d'autres travaux (Basrur et al., 2003; Kushimoto et al., 2003; SEIJI et al., 1961). Celui-ci se déroule en quatre stades : prémélanosome ou mélanosome stade I qui présente une forme quasi-sphérique et une matrice amorphe. Le mélanosome au stade II acquiert une forme ovoïde allongée avec la formation d'une structure interne fibrillaire. Au stade III, le dépôt de mélanine synthétisée par les enzymes de la famille tyrosinase (Tyr, Trp1 et Trp2), sur la structure fibrillaire est évident et atteint un maximum au stade IV où les structures internes ne sont plus visibles. Tout au long de leur synthèse dans la région périnucléaire des mélanocytes, les mélanosomes subissent une maturation morphologique et sont transportés vers l'extrémité des dendrites mélanocytaires. Dans l'épiderme et les follicules pileux, ils sont ensuite transférés aux kératinocytes, où ils sont progressivement éliminés lors de la différenciation des kératinocytes qui s'accompagne de leur ascension vers la surface de l'épiderme (Mantoux F et Ortonne JP, 2003).

Les mélanosomes matures de stades III et IV résultent de la fusion de prémélanosomes (mélanosomes stades I et II) contenant les protéines de structure spécifiques des mélanosomes, avec des vésicules recouvertes de clathrine en provenance directe du trans-Golgi et transportant la machinerie enzymatique de la mélanogenèse (tyrosinase ; TRP-1 ; TRP-2)(Jimbow et al., 2000).

Le mélanosome de type I ou endosome tardif est le précurseur commun qui pourra ensuite se différencier en phéomélanosomes ou en eumélanosomes en fonction de deux signaux de différenciation spécifique :

- l'alpha-MSH (*Melanocyte Stimulating Hormone*) et la protéine signal Agouti ou ASP (*Agouti Signal Protein*) qui agissent sur le même récepteur MC1R (*Melano Cortine - 1*) situé à la surface du mélanocyte.
- la biodisponibilité de la cystéine, cystéine libre ou sous forme de tripeptide, le glutathion. Les prémélanosomes ne dérivent pas du Golgi mais se forment à partir d'endosomes particuliers, les « endosomes recouverts », qui semblent dériver des endosomes précoces et correspondre à une forme intermédiaire entre endosomes précoces et tardifs.

La formation des prémélanosomes se fait par enrichissement progressif des « endosomes recouverts » en protéines structurales fibrillaires des mélanosomes telles que pmel-17. (Berson et al., 2001). Celles-ci sont acheminées dans des vésicules dérivées du trans-Golgi vers les endosomes recouverts avec lesquels elles vont fusionner.

D'autres vésicules, recouvertes de clathrine, issues elles aussi du trans-Golgi et transportant la machinerie enzymatique de la mélanogenèse, vont ensuite venir fusionner avec les prémélanosomes pour former les mélanosomes matures (Sitaram and Marks, 2012).

Des mécanismes de tri et d'adressage sont propres à chacune de ces voies (Sitaram and Marks, 2012). La maturation et l'assemblage corrects des protéines dans le réticulum endoplasmique puis le Golgi est nécessaire à leur transport correct vers leur destination finale. Les cellules possèdent un système de contrôle faisant intervenir des molécules chaperonnes telles que la calnexine, la calréguline. Les calnexines interviennent dans la maturation et l'assemblage des glycoprotéines comme la Tyrosinase (Branza-Nichita et al., 1999; Toyofuku et al., 1999). La Calnexine a une affinité spécifique pour les oligosaccharides asparagine-like monoglycosylés (Glu1Man9-8GlucNAc2), ils sont formés par l'excision des premiers et seconds glucoses (G) de l'oligosaccharide initial core triglycosylé (Glu3Man9GlucNAc2) par l'action séquentielle de la glucosidase I puis II. Seules les protéines correctement maturées sont transportées vers le réseau golgien. Les glycoprotéines venant d'être synthétisées sont transportées sélectivement jusqu'aux granules sécrétoires (e.g. lysosome, endosome, melanosome) via le système de reconnaissance du Mannose-6-Phosphate (Jimbow et al., 2000). Les protéines impliquées dans la synthèse de mélanine (tyrosinase, TRP-1, TRP-2) sont transportées vers les

mélanosomes et les endosomes tardifs. Les protéines Lamp-1, -2 et -3 sont présentes à l'intérieur ou associés à la face externe des membranes des endosomes tardifs, des lysosomes et des mélanosomes.

D'autres protéines impliquées dans la biogenèse des mélanosomes et de divers organites issus de la lignée lysosomale, tels que les granules denses plaquettaires et les granules lysosomaux leucocytaires, ont été identifiées (Huizing et al., 2002):

– HPS-1 est une protéine des mélanosomes codée par le locus *Pale ear* chez la souris (Feng et al., 1997). Il s'agit d'une protéine cytosolique, de structure originale, ne partageant aucune homologie avec d'autres protéines connues. Elle interviendrait dans la biogenèse des prémélanosomes (Nguyen et al., 2002).

– AP-3 est un complexe adaptateur interagissant avec la clathrine. Il se localise aux endosomes précoces et interviendrait dans le tri et le transport des protéines du réseau post-golgien et/ou du compartiment endosomal vers les mélanosomes (Theos et al., 2005).

– CHS-1 est une protéine de la membrane des mélanosomes codée par le locus *Beige* chez la souris (Spritz, 1998). La taille des lysosomes est régulée par une balance entre fusion et fission des vésicules. CHS1 interviendrait dans l'organellogenèse en activant la fission de certains organites intracellulaires, comme les mélanosomes (Durchfort et al., 2012).

– OA1 est une protéine membranaire siégeant dans la membrane du mélanosome. Elle agit comme régulateur du tri des protéines de la mélanogenèse (TYRP1) et contrôle la maturation des mélanosomes (Giordano et al., 2009). Elle agirait avec la protéine MART1 pour contrôler l'identité et la composition des mélanosomes. La perte de fonction de OA1 entraîne dans les mélanocytes un défaut de localisation de protéines mélanosomales responsable de dépôts prématurés de mélanines dans des mélanosomes non matures et est associé à la présence de macromélanosomes (Giordano et al., 2009). OA1 est également présent dans la membrane des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.

– La mélanoréguline est impliquée dans la biogenèse des mélanosomes et régule la taille du mélanosome en agissant comme régulateur négatif de la fusion des membranes, soit directement sur le processus de fusion, soit indirectement en facilitant le transport vésiculaire (Rachel et al., 2012)

## **I.d Transport des Mélanosomes**

### **I.d.1 Transport des mélanosomes dans le mélanocyte**

Les mélanosomes sont transportés depuis la région périnucléaire où ils ont été synthétisés jusqu'à l'extrémité des dendrites mélanocytaires pendant que les mélanines y sont synthétisées.

Le transport est actif et s'effectue en deux phases via le cytosquelette : les mélanosomes sont d'abord transportés de l'espace périnucléaire jusqu'à la partie distale du corps des dendrites par le réseau de microtubules, puis transférés jusqu'à la pointe de ces derniers via le cytosquelette d'actine (Aspengren et al., 2009).

Deux moteurs moléculaires associés aux microtubules, la kinésine et la dynéine, participeraient respectivement au transport antérograde et rétrograde des mélanosomes dans le corps des dendrites (Byers et al., 2000; Hara et al., 2000; Wu et al., 2002).

Arrivés à la partie distale du corps des dendrites, les mélanosomes se lient à une myosine non conventionnelle, la myosine Va, qui assure ensuite, via le réseau d'actine, leur transport vers la pointe des dendrites (Wu et al., 2002). La protéine G appelée Rab27a a été impliquée dans le transport périphérique des mélanosomes et assurerait la liaison physique entre myosine Va et mélanosomes à l'extrémité des dendrites mélanocytaires (Goud, 2002).

Une troisième molécule, la mélanophiline a été impliquée dans cette liaison. Il s'agit d'une protéine de la famille synaptogamine like-protein (slp), qui jouerait un rôle de molécule adaptatrice en liant d'un côté Rab27 et de l'autre la myosine Va (Strom et al., 2002).

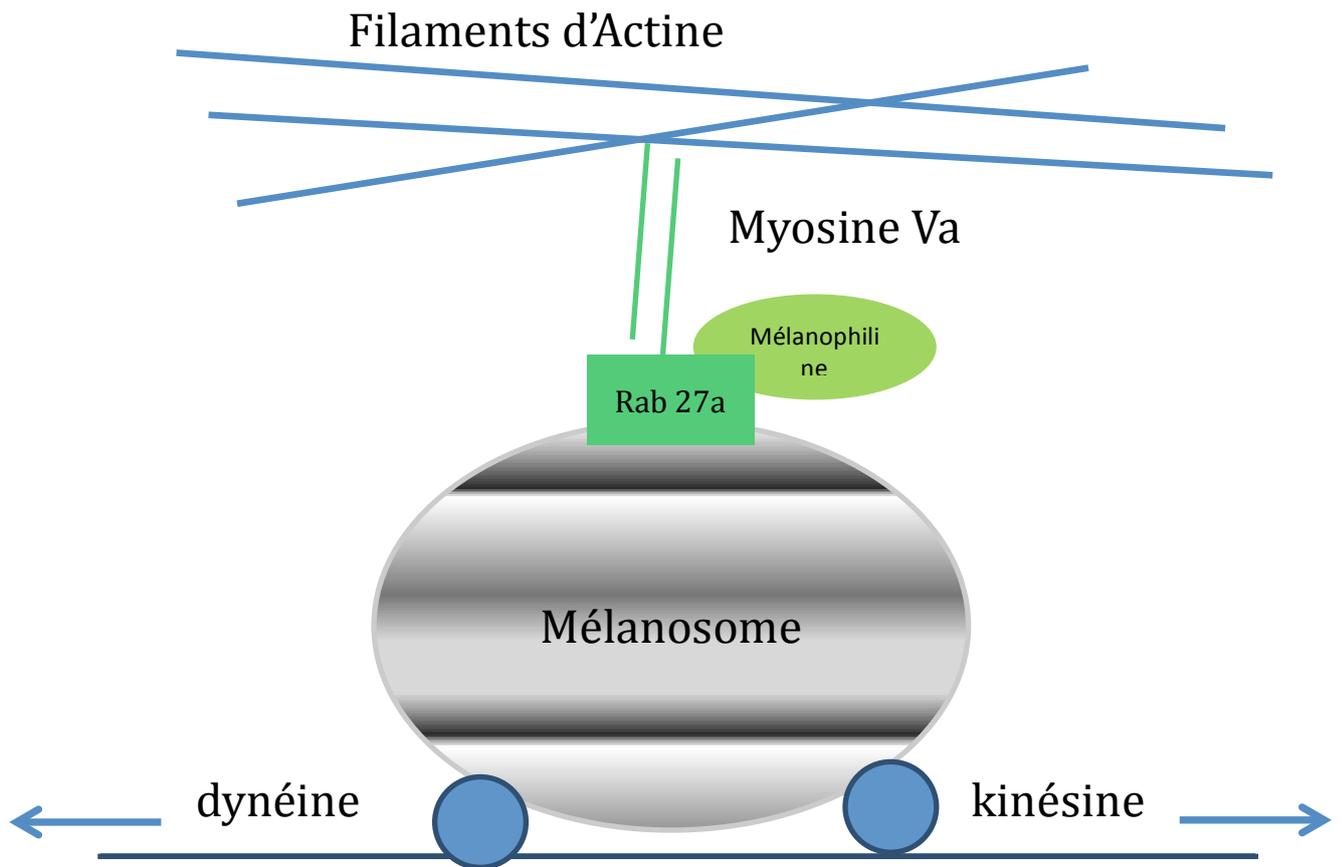


Figure 9. Schéma représentant les acteurs moléculaires du Transport des mélanosomes du mélanocyte.

## **I.d.2 Transfert des mélanosomes aux kératinocytes**

Les mélanosomes sont transférés aux kératinocytes quand ils ont atteint la pointe des dendrites. Parmi les hypothèses émises, celle d'un processus de cytophagocytose des extrémités dendritiques par les kératinocytes semble plus probable.

Dans un premier temps, une expansion cytoplasmique dendritique contenant de nombreux mélanosomes entre en contact avec la membrane du kératinocyte, qui va former un repli, puis une invagination. Celle-ci va se refermer pour former une vacuole à deux membranes.

Le récepteur de la membrane des kératinocytes : protease-activated-receptor 2 (PAR-2) joue un rôle important dans le transfert du mélanosome (Seiberg et al., 2000; Sharlow et al., 2000). PAR-2 est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G, activée par clivage enzymatique d'une partie de son domaine extramembranaire. L'activation de PAR-2 est accrue après irradiations répétées par les UVB. L'activation et l'inhibition de PAR-2 conduisent respectivement à un accroissement et à une diminution de la pigmentation épidermique. PAR-2 agirait également sur la pigmentation de la peau en stimulant la formation de dendrites mélanocytaires via la sécrétion de prostaglandines Pge2 et Pgf2a par les kératinocytes pouvant se fixer sur les récepteurs EP1, EP3 et FP des mélanocytes (Scott et al., 2004).

Les cadhérines semblent jouer également un rôle majeur dans l'adhésion mélanocyte-kératinocyte. En effet, la E-cadhérine et la P-cadhérine sont exprimées dans les mélanocytes humains et entraînent leur adhésion aux kératinocytes de façon calcium-dépendante. Il existe d'autres récepteurs comme les lectines impliquées dans cette adhésion (Van Den Bossche et al., 2006). Ces dernières se fixent sur des sucres présents à la surface intermembranaire.

Des réarrangements de l'actine sous-corticale semblent être impliqués dans la modulation de la cytophagocytose des mélanosomes par les kératinocytes (Ando et al., 2012). La phagocytose requiert la formation de pseudopodes via des réarrangements du cytosquelette d'actine. Les kinases liées aux intégrines (ILK) jouent un rôle de modulateur dans la dynamique du cytosquelette d'actine. Il a été montré qu'en réponse à l'activation du récepteur du keratinocyte growth factor (KGF), l'activation de la voie Rac1 dépendante d'ILK, conduisant à la formation de pseudopodes et augmentait la capture des

mélanosomes (Sayedyahosseini et al., 2012). Il a également été montré que l'activité de PAR-2 était régulée par une voie de signalisation médiée par l'insuline (Hyun et al., 2010).

Tandis que les vacuoles sont transférées vers l'espace périnucléaire des kératinocytes, la membrane interne, correspondant à la membrane cytoplasmique du mélanocyte, ainsi que la membrane externe des mélanosomes sont dégradées (Van Den Bossche et al., 2006).

### **I.d.3 Distribution et dégradation des mélanosomes dans les kératinocytes**

Dans les kératinocytes, les mélanosomes sont contenus dans des lysosomes secondaires et se distribuent, soit de façon isolée, soit groupés en complexes. Il semble que la taille, et peut-être la composition chimique des mélanosomes, déterminent le mode de distribution intrakératinocytaire des mélanosomes.

## **I.e Régulation de la pigmentation constitutionnelle**

### **I.e.1 Contrôle génétique**

L'étude des génodermatoses hypopigmentaires humaines et des effets des mutations murines sur la coloration du pelage a permis l'identification d'un très grand nombre de gènes impliqués dans les processus de pigmentation cutanée.

### **I.e.2 Rayonnements ultraviolets**

*In vivo*, les rayonnements UVA et UVB de la lumière solaire sont les principaux stimulants de la mélanogenèse (Park et al., 2009).

Ils induisent aussi une augmentation de la dendricité et du nombre de mélanocytes.

Ils peuvent agir sur les mélanocytes directement ou indirectement en induisant la sécrétion de facteurs paracrines et autocrines par les kératinocytes et les mélanocytes eux-mêmes.

#### **I.e.2.1. Effets directs des ultraviolets**

L'irradiation de culture de mélanocytes par les UVB entraîne une néosynthèse des mélanines. Les UV agissent ainsi directement sur les mélanocytes. Cet effet est médié par une augmentation de l'expression et de l'activité de la tyrosinase (Gilchrest et al., 1996).

Le principal mécanisme moléculaire en cause passerait par des dommages à l'acide désoxyribonucléique (ADN) induits par les radiations UV, en particulier par la formation de dimères de thymidine.

L'addition de dimères de thymidine (qui sont généralement excisés par des enzymes de réparation) à des mélanocytes en culture non irradiés, ou l'application topique de ces dimères sur la peau d'un cobaye, semblent stimuler la mélanogénèse comme le font les UVB (Eller et al., 1996; Gilchrest et al., 1996).

#### I.e.2.2. Effets indirects des ultraviolets

De nombreux facteurs kératinocytaires dont la sécrétion peut être augmentée par le UV sont activateurs de la mélanogénèse (Park et al., 2009).

Les milieux conditionnés de kératinocytes stimulent la croissance et la synthèse des mélanines de mélanocytes en culture. Ces effets sont amplifiés lorsque les kératinocytes sont préalablement irradiés par les UV, suggérant que des substances sécrétées par les kératinocytes jouent un rôle prépondérant dans la croissance et la différenciation mélanocytaire.

Les principaux sont la proopiomélanocortine, les peptides dérivés l'alpha melanocyte stimulating hormone (αMSH), l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), l'endothéline-1 (ET-1), le stem cell factor (SCF), le monoxyde d'azote (NO), et l'agouti signaling protein (ASP).

\* La proopiomélanocortine (POMC) et ses dérivés:

L'αMSH et l'ACTH sont des hormones polypeptidiques générées par le clivage d'un précurseur, la pro-opiomélanocortine (POMC). L'administration d'un analogue synthétique de l'αMSH, la norleucine-4, D-phénylalanine-αMSH (NDP-MSH) à des sujets sains induit une pigmentation cutanée sans exposition au soleil. De plus, il est admis que les hyperpigmentations cutanées observées dans la maladie d'Addison et la maladie de Cushing centrale sont liées à une augmentation du taux plasmatique d'ACTH.

La mise en évidence de la capacité de synthèse et de sécrétion de peptides dérivés du POMC et de l'alpha-MSH par les kératinocytes humains en culture suggère que ces

hormones pourraient avoir un rôle physiologique dans la mélanogénèse, en particulier d'ordre constitutif et induit par les UV. L'alpha-MSH et la NDP-MSH entraînent sur les mélanocytes humains en culture une augmentation de la mélanogénèse, une stimulation de l'activité de la tyrosinase, de TRP1 et TRP2, et ont dans certaines conditions une action mitogène (Abdel-Malek et al., 1995; Hunt et al., 1995).

La NDP-MSH induit une augmentation de la teneur en eumélanines de mélanocytes humains en culture et a des effets moindres et variables sur le contenu en phaeomélanines. Les effets de l'alpha-MSH sont initiés par liaison de cette hormone au récepteur MC1R, récepteur transmembranaire exprimé à la surface des mélanocytes.

Les mutations murines au locus *extension* (qui code MC1R) conduisant à un récepteur non fonctionnel, donnent des souris au pelage jaune contenant plus de phaeomélanines que d'eumélanines (Våge et al., 1997). Chez l'homme, il semble que le phénotype roux soit associé à des variations polymorphes du récepteur MC1R entraînant une diminution de l'affinité du récepteur pour l'alpha-MSH (Xu et al., 1996). L'alpha-MSH pourrait agir dans la régulation de la mélanogénèse chez l'homme, en favorisant préférentiellement la synthèse des eumélanines aux dépens de celle des phaeomélanines (Hunt et al., 1995).

\*Endothéline-1 (ET-1):

ET-1, peptide de 21 acides aminés, identifié initialement pour son rôle dans l'homéostasie vasculaire, régule également la mélanogénèse, l'activité de la tyrosinase et augmente le taux de TYRP1 (Imokawa et al., 1995; Yada et al., 1991). L'irradiation UV stimule la production d'UV par les kératinocytes. ET-1 augmente le taux de MC1R et l'affinité de ce récepteur pour l'alpha-MSH (Tada et al., 1998).

\*Steel/Stem cell factor (SCF):

SCF est facteur de croissance kératinocytaire qui se lie au récepteur à activité tyrosine kinase c-kit. La liaison à c-kit conduit à une autophosphorylation du récepteur et à l'activation de la voie Mitogen activated protein (MAP) kinase. Les MAP kinases phosphorylent MITF conduisant à une augmentation des enzymes de la mélanogénèse Tyrosinase, TYRP1 et TYRP2. En dehors de ce rôle dans la prolifération mélanocytaire, le SCF intervient également dans la pigmentation UV-induite (Imokawa et al., 2000).

\*Médiateurs de l'inflammation :

Les prostaglandines (PGs) et les leucotriènes, composés lipidiques dérivés de l'acide arachidonique sont des médiateurs de la réponse inflammatoire qui agissent sur la fonction du mélanocyte. Leur taux s'élève en cas de coup de soleil et dans un grand nombre de dermatoses inflammatoires (Gilchrest et al., 1996; Ruzicka, 1989; Tomita et al., 1989a). Les mélanocytes humains expriment des récepteurs aux PGs incluant les récepteurs de PGE<sub>2</sub> et PGF<sub>2α</sub>. PGF<sub>2α</sub> stimule la formation des dendrites mélanocytaires et active la tyrosinase. Les radiations UV augmentent le taux de récepteurs PG sur les mélanocytes (Scott et al., 2004, 2005). De la même façon, les leucotriènes B<sub>4</sub> et C<sub>4</sub> augmentent la synthèse de mélanine et stimulent la prolifération et la mobilité mélanocytaires. L'histamine, sécrétée par les mastocytes au cours de l'inflammation peut se lier aux récepteurs H1 et H2 sur les mélanocytes et ainsi augmenter la formation de dendrites et le taux de tyrosinase (Gantz et al., 1991; Yoshida et al., 2000).

\*Les Neurotrophines :

Les Neurotrophines (NTs) constituent une famille de molécules activatrices de la survie des neurones dans le système nerveux central et périphérique (Levi-Montalcini, 1987). Il inclus le nerve growth factor (NGF), NT-3, NT-4 et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990; Rosenthal et al., 1990). L'expression de NGF sécrété par les kératinocytes, est chimiotactique pour les mélanocytes et induit leur dendricité (Yaar et al., 1991). Après irradiation UV, l'addition de NGF augmente le taux de la protéine antiapoptotique Bcl2 réduisant ainsi la mort cellulaire par apoptose des mélanocytes (Stefanato et al., 2003). Le NGF semble préserver la population mélanocytaire qui serait déplétée par les dommages causés par les UV.

\* Basic fibroblast growth factor :

Le Basic fibroblast growth factor (bFGF), connu pour être impliqué dans la croissance des fibroblastes, présente également une activité mitogène pour les mélanocytes (Halaban et al., 1987, 1988). Le bFGF est produit par les kératinocytes et agit sur les mélanocytes via des contacts intercellulaires et induit une augmentation du de l'AMPc après liaison sur le récepteur membranaire tyrosine kinase. Comme les autres cytokines kératinocytaires, la production est accrue après irradiation UV (Halaban et al., 1988).

\* Monoxyde d'azote :

Le monoxyde d'azote ou NO est produit par les NO synthases à partir de l'arginine. C'est un gaz diffusible. Le NO semble stimuler la mélanogénèse. En présence d'inhibiteurs

de NO synthase, la stimulation de la mélanogénèse par les UVB est inhibée (Roméro-Graillet et al., 1996).

Dans l'épiderme, une NO synthase de type neuronal est activée par les UV, conduisant à une augmentation de la synthèse de NO par les kératinocytes et les mélanocytes. Les effets du NO sont liés à l'activation d'une guanylate cyclase mélanocytaire, conduisant à une augmentation de la production d'acide guanosine monophosphorique cyclique (GMPc). L'utilisation d'inhibiteur de guanylate cyclase bloque la stimulation de la mélanogénèse induite par les UVB et par le NO.

Ces travaux montrent que le NO est impliqué dans une régulation paracrine et autocrine de la mélanogénèse via une augmentation du contenu intramélanocytaire en GMPc (Roméro-Graillet et al., 1997).

Le NO n'a, en revanche, aucun effet sur la croissance mélanocytaire.

\* Protéine agouti :

La protéine agouti (ou agouti signaling protein) est un antagoniste de l'aMSH, qui agit par compétition au récepteur MC1R.

Cet effet antagoniste bloque la différenciation mélanocytaire et l'eumélanogénèse induites par l'aMSH (Suzuki et al., 1997). Ceci se traduit in vivo chez les souris surexprimant agouti (mutation dominante lethal yellow et viable yellow) une synthèse préférentielle de phaeomélanines au détriment des eumélanines, avec pour conséquence des animaux au pelage jaune (Klebig et al., 1995). Ces souris présentent aussi une obésité avec hyperinsulinisme, par inhibition d'un autre type de récepteur de la famille MCR, le récepteur MCR-4 (Klebig et al., 1995)

## **I.f Rôle Physiologique de la mélanine**

### **I.f .1 Pigmentation constitutionnelle de la peau et des phanères**

Le nombre de mélanocytes varie selon les zones cutanées chez un même individu. La densité des mélanocytes est d'environ 2000/mm<sup>2</sup> pour la peau de la face et des avant-bras et de la région génitale et de 1000/mm<sup>2</sup> pour le reste du corps. Les variations de couleur

de la peau interindividuelles ne dépendent pas du nombre de mélanocytes, qui est à peu près identique chez tous les humains quelle que soit leur origine ethnique. Elles sont fonction du nombre, de la forme et du mode de distribution des granules pigmentaires, ainsi que des types chimiques de mélanines produites. Les mélanosomes sont plus nombreux, plus larges, avec une proportion de mélanosomes de stade IV plus importante chez les sujets à peau noire ou foncée.

De plus, dans les peaux foncées, des mélanosomes sont retrouvés dans toutes les couches de l'épiderme, y compris dans le stratum corneum. Il y a cependant un gradient de distribution des granules, avec une densité plus élevée dans la couche basale. Dans les peaux blanches, il est rare d'observer des mélanosomes au-delà de la moitié supérieure de la couche du corps muqueux.

Les mécanismes sous-jacents aux différences de couleurs de peau selon l'origine ethnique sont encore mal compris. Il a récemment été montré un rôle essentiel de RAB27A, dont l'activité est augmentée dans les peaux foncées par rapport aux peaux claires avec pour conséquence un transfert de mélanosomes aux kératinocytes plus important (Yoshida-Amano et al., 2012). L'autophagie aurait également un rôle déterminant. En effet, elle intervient dans la régulation de la dégradation du mélanosome dans les kératinocytes et contribue à la diversité ethnique des couleurs de peau (Murase et al., 2013).

Il existe peu de données disponibles étudiant les rapports entre le type chimique de mélanine et les variations de couleur de la peau. Bien que les eumélanines soient prédominantes, des phaeomélanines sont aussi produites par les mélanocytes épidermiques. Dans les cheveux et les poils, les mélanines synthétisées seraient principalement des eumélanines pour les cheveux foncés, tandis qu'il s'agirait de phaeomélanines dans les cheveux roux.

Il existe 6 phototypes principaux établis à partir de la carnation (couleur de peau dans une région non exposée) et de la capacité des individus à pigmenter lors d'une exposition solaire.

Phototype	Exemple	Carnation	Réaction solaire
I	Celtiques, Irlandais, Roux	Blanche	Brûlent toujours Ne bronzent jamais
II	Individus à peau claire	Blanche	Brûlent facilement Bronzent peu, avec difficulté
III	Majorité des Caucasoïdes	Blanche	Brûlent parfois Bronzent progressivement
IV	Asiatiques Hispaniques	Mate	Brûlent peu Bronzent toujours bien
V	Indiens Moyen- orientaux	Brune	Brûlent rarement Bronzent intensément
VI	Africains	Brun foncé à noire	Ne brûlent jamais Bronzent intensément

TABLEAU I. CLASSIFICATION DES PHOTOTYPES D'APRES FITZPATRICK

### I.f.2. Pigmentation Facultative

La pigmentation facultative ou bronzage a deux composantes, immédiate et retardée :

– la pigmentation facultative immédiate apparaît pendant l'exposition solaire aux UV, est d'emblée maximale, et s'atténue en quelques minutes à quelques jours. Elle ne fait pas appel à une augmentation de synthèse de mélanines, mais à une redistribution des mélanosomes de l'espace périnucléaire vers les dendrites. Le changement de coloration de la peau est en général modeste et quasi invisible chez les sujets à peau claire. La fonction biologique de ce processus, qui n'a aucun effet photoprotecteur mesurable, est inconnue ;

– la pigmentation facultative retardée apparaît 3 à 4 jours après une exposition unique aux UV, atteint son maximum en 10 à 28 jours et persiste plusieurs semaines à plusieurs mois. Elle procède d'une augmentation du nombre de mélanocytes, de mélanosomes et de la quantité de mélanine produite.

La dose d'UV requise pour obtenir une pigmentation retardée est en général équivalente à celle nécessaire pour observer un érythème solaire, bien que chez les sujets à peau foncée bronzant facilement, une dose moindre puisse être suffisante. Ce type de pigmentation a une valeur photoprotectrice, qui peut augmenter d'un facteur 3 à 4 la dose érythémateuse minimale.

### **I.f .3. Action photoprotectrice des mélanines**

Les mélanines agissent de deux façons :

- de manière directe comme un filtre solaire inerte en diffractant et/ou réfléchissant le rayonnement UV. Lors d'une irradiation, les mélanosomes vont se regrouper (phénomène de capping) au-dessus du noyau des kératinocytes et des mélanocytes, protégeant ainsi l'ADN de la cellule ;
- de façon indirecte en neutralisant les radicaux libres et autres espèces chimiques réactives induites par les UV, molécules susceptibles d'induire des altérations cellulaires.

Cependant les mélanines ne seraient pas des filtres solaires très efficaces. Leur coefficient de protection est en effet estimé entre 1,5 et 2 sun protective factor (SPF), ce qui équivaut à un blocage de 40 à 50 % seulement du rayonnement UV. Les phaeomélanines elles-mêmes peuvent donner naissance, sous l'action des UV, à des radicaux libres susceptibles d'endommager les composants cellulaires et d'avoir des effets mutagènes pouvant être à l'origine de l'incidence plus élevée de cancers cutanés chez les sujets à peau claire et cheveux roux.

### **I.f .4 Régulation immunitaire**

Les mélanocytes expriment à leur surface les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et diverses molécules d'adhésion. Ils synthétisent, et sont capables de sécréter de multiples cytokines proinflammatoires (tumor necrosis factor [TNF]  $\alpha$ , transforming growth factor (TGF)  $\alpha$ , interleukines 1, 3, 6, 8...). Ils sont aussi doués de phagocytose et contiennent des organites, les mélanosomes, pouvant avoir des fonctions proches des lysosomes. Il a été montré que les mélanocytes ont des fonctions de présentation antigénique en association avec les molécules du CMH de classe II. Ces différentes données suggèrent que le mélanocyte pourrait être impliqué activement dans la régulation des processus immunitaires cutanés.

### **I.f .5 Chélation d'agents toxiques:**

De nombreux agents chimiques et pharmacologiques s'accumulent dans les tissus contenant des mélanines tels que la peau, la strie vasculaire de la cochlée, l'épithélium pigmenté de la rétine et la choroïde oculaire. Les mélanocytes pourraient avoir une fonction protectrice vis-à-vis des effets délétères de ces produits (Zemel et al., 1995).

## **II Physiopathologie des anomalies génétiques de la pigmentation constitutionnelle**

---

### **II.a Anomalies de la migration des mélanoblastes dérivés de la crête neurale**

Ce groupe d'hypopigmentation résulte essentiellement d'un développement ou d'une migration aberrants des précurseurs mélanocytaires dans l'épiderme (Figure 11).

#### **II.a.1. Le piebaldisme**

Le piebaldisme se présente cliniquement par des macules hypopigmentées irrégulières bien démarquées. Le signe typique et classique de l'affection est une mèche blanche, souvent associé à une zone en V de dépigmentation au milieu du front. Les lésions hypopigmentées du piebaldisme ont une prédilection pour la partie antérieure du corps et la portion médiane des membres. Des petits spots d'hyperpigmentation peuvent s'observer dans les lésions hypopigmentées et même en peau normale. Le piébaldisme n'est généralement pas associé à une atteinte extracutanée.

Le piebaldisme est transmis sur un mode autosomique dominant. Il résulte de mutations de KIT, codant c-KIT, une tyrosine kinase membranaire responsable de l'initiation de la prolifération et de la migration cellulaire (Giebel and Spritz, 1991). Le récepteur c-kit est important pour la maturation des mélanocytes et des cellules mastocytaires. Un polymorphisme (SNP) single nucleotide polymorphism) du gène KITLG (KIT ligand) a été associé aux cheveux blonds vs cheveux bruns (Sulem et al., 2007). De plus, les anomalies pigmentaires secondaires à l'utilisation récente des traitements par les inhibiteurs de tyrosine kinase atteste l'importance de cette voie dans le maintien de la population mélanocytaire épidermique (Tsao et al., 2003). Les mutations dominantes de KIT empêchent la migration des mélanocytes à la peau comme le montre l'absence de mélanocytes et de mélanine dans les lésions hypopigmentées (Thomas et al., 2004).

#### **II.a.2. Le syndrome de Waardenburg (WS)**

Le syndrome de Waardenburg se présente cliniquement comme une leucodermie congénitale associée à une surdité neurosensorielle de sévérité variable. Les zones de dépigmentation peuvent diminuer en taille et s'estomper avec le temps. Quatre types distincts de syndrome de Waardenburg sont décrits. Le syndrome de Waardenburg de type

1 est hérité de façon autosomique dominante et est caractérisé par une mèche blanche, des zones d'hypopigmentation, une dystopie des canthi et une hétérochromie irienne associé à une surdité dans 30 à 50 % des cas. Les patients peuvent également présenter quelques critères mineurs comme une racine du nez large, un synophris.

Le syndrome de Waardenburg de type 2 est de transmission autosomique dominante ou récessive. Les signes cliniques sont comparables à ceux du type 1 en dehors de l'absence de critères mineurs faciaux et de dystopie des canthi. La fréquence de la surdité et de l'hétérochromie est plus importante.

Le syndrome de Waardenburg de type 3 est de transmission autosomique dominante. Il est plus rare. Les mêmes manifestations cliniques que dans le type 1 sont observées, auxquelles s'ajoutent des anomalies musculosquelettiques (syndactylie, fusion des os du carpe...).

Le syndrome de Waardenburg de type 4 (Shah-Waardenburg) est hérité de façon autosomique récessive. L'atteinte cutanée et la surdité s'associent à une maladie de Hirschprung.

Des mutations dans 6 gènes différents ont été impliquées dans les 4 types de syndrome de Waardenburg. Les type 1 et type 3 résultent de mutations perte de fonction de *PAX3*. *PAX3* est un facteur de transcription du gène Microphthalmia-associated transcription factor (*MITF*) qui active à son tour la transcription de gènes impliqués dans la mélanogenèse. Les mutations de *MITF* sont responsables de WS type 2. Le WS type 2 est génétiquement hétérogène et des mutations dans le gène *SLUG* codant un facteur de transcription à doigt de zinc, ont été décrites (Sánchez-Martín et al., 2002). Le WS type 4 peut être causé par des mutations d'au moins 3 gènes incluant *EDNRB*, (endothelin-B receptor), *EDN3* (ligand de *EDNRB*) et *SOX10* qui comme *PAX3* régule l'expression de *MITF*. Des mutations homozygotes de *EDNRB* et *EDN3* sont responsables d'un WS de type 4 alors que les mutations hétérozygotes causent des maladies de Hirschprung isolées. La perte d'expression de *SOX10* conduit à une expression anormale de *RET*, qui est impliqué dans la maladie de Hirschprung. De plus, la perte d'expression de *SOX10* est associée à un défaut de myélinisation et à des signes neurologiques.

## **II.b Défaut de la formation et du transport du mélanosome**

Contrairement aux hypopigmentations localisées typiques du piebaldisme et du WS, les mutations affectant la maturation du mélanosome et du transport sont généralement

associées à une diminution globale de la pigmentation de la peau, des cheveux et des yeux, avec un nombre de mélanocytes épidermiques normal.

### **II.b.1. Le syndrome d'Hermansky-Pudlak (HPS)**

Les 8 types d'Hermansky-Pudlak sont transmis de manière autosomique récessive. Les sous-types de ce syndrome partagent des caractéristiques cliniques communes incluant une dépigmentation cutanéophanéarienne et ophtalmologique, un syndrome hémorragique, une fibrose pulmonaire interstitielle et une colite granulomateuse (HERMANSKY and PUDLAK, 1959). La prévalence à travers le monde de cette affection est faible en dehors de Porto Rico où elle atteint 1/800.

L'affection résulte d'une anomalie de la biogenèse des organelles lysosomiaux. Les mélanocytes sont présents dans la peau. La maturation du mélanosome est déficiente et les mélanosomes matures de type IV sont très rares. De même le taux de plaquettes est normal mais les granules denses sont absents des thrombocytes. L'atteinte viscérale est liée à la dégradation partielle ou absente des lipides résultant de l'accumulation de matériel céroïde à l'intérieur des lysosomes. L'HPS est associé à des mutations dans 9 gènes distincts : HPS1 (type 1) et HPS4 (type 4) codent des composants du complexe lysosomal BLOC3, qui est essentiel à la formation du mélanosome; AP3B1 (type 2) code une sous-unité du complexe AP3, qui est impliqué dans le tri des protéines vers les lysosomes ; HPS3 (type 3), HPS5 (type 5) et HPS6 (type 6) codent les composants de BLOC2 et DTNBP1 (type 7), BLOC1S3 (type 8) et BLOC1S6 (type 9) codent pour des composants de BLOC1, qui sont nécessaires à la maturation du mélanosome (Anikster et al., 2001; Chiang et al., 2003; Cullinane et al., 2011; Dell'Angelica et al., 1999; Feng et al., 1997).

### **II.b.2. Le syndrome de Chediak-Higashi (CHS)**

Le syndrome de Chediak-Higashi (CHS) est caractérisé par une hypopigmentation modérée (cheveux blonds, peau claire) associée à un déficit immunitaire qui se présente avec une incidence accrue d'infections pyogéniques et un syndrome hémotophagocytaire. Certains patients peuvent présenter un syndrome cérébelleux à l'âge adulte (Spritz, 1998).

La maladie résulte de mutations avec perte de fonction de *CHS1* (LYST), qui joue un rôle majeur dans le trafic vésiculaire (Fukai et al., 1996). En conséquence, la maturation des mélanocytes, et la fonction des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes Natural Killer sont altérés. La dysfonction cellulaire du CHS se manifeste au niveau microscopique

par l'accumulation de mélanosomes géants dans les mélanocytes et de corps granuleux dans les autres types cellulaires.

### **II.b.3. Le syndrome de Griscelli-Prunieras (GPS)**

Le syndrome de Griscelli-Prunieras présente plusieurs sous-types qui ont en commun des cheveux gris argentés et une peau claire (Griscelli et al., 1970). Ces patients ne présentent pas d'atteinte ophtalmologique (Mancini et al., 1998). Dans le GPS de type 1, les patients présentent un albinisme modéré associé à des manifestations neurologiques incluant un retard psychomoteur et une hypotonie ; dans le GPS de type 2, les anomalies immunologiques sont au premier plan. Rarement, seule une hypopigmentation est présente dans le GPS de type 3.

Le GPS de type 1 résulte de mutations dans *MYO5A* codant pour la myosine 5a, qui forme avec RAB27a et la mélanophiline un complexe permettant le transport des mélanosomes à travers le mélanocyte et son ancrage dans les épines dendritiques (Ménasché et al., 2000; Pastural et al., 1997; Ménasché et al., 2003). Le GPS de type 2 résulte de mutations de *RAB27a* alors que le GPS de type 3 est associé à des mutations de *MLPH* codant la mélanophiline ou à des mutations spécifiques de *MYO5A*. De façon générale, toutes les altérations génétiques associées au GPS entraînent un défaut de transport des mélanosomes avec pour conséquence une accumulation des mélanosomes dans les mélanocytes en microscopie électronique.

### **II.c Défauts de synthèse de la mélanine**

Au cours des albinismes, le cycle de synthèse de la mélanine peut être bloqué à différents niveaux définissant les différents types de la maladie (Grønskov et al., 2007a; Okulicz et al., 2003). La mélanine est synthétisée par les mélanocytes trouvés dans la couche basale de l'épiderme et les follicules pileux, dans l'iris, le corps ciliaire et la choroïde et, dans l'oreille interne, au niveau de la strie vasculaire. Dans l'œil, la mélanine est synthétisée également par les cellules épithéliales pigmentaires (iris, corps ciliaire, rétine) qui proviennent, sur le plan embryonnaire, de la vésicule optique issue du télencéphale, alors que les mélanocytes dérivent des crêtes neurales (Bharti et al., 2006). Le défaut de production de mélanine au niveau ophtalmologique est responsable d'un défaut de développement de la rétine. Les gènes impliqués dans la synthèse de mélanine ne sont pas exprimés par les cellules adjacentes de l'épithélium pigmentaire rétinien (Gross, 2008). Il y a quelques années, la relation entre pigmentation et vision a été découverte avec l'utilisation

de modèles murins, permettant de conclure que la L-DOPA, un métabolite intermédiaire de la synthèse de mélanine était le seul nécessaire au développement normal visuel et rétinien (Lavado et al., 2006). L'étude des ligands du récepteur OA1 impliqué dans l'albinisme oculaire pur a permis d'identifier la L-DOPA comme l'un de ses ligands. Au cours de la synthèse de mélanine, la tyrosinase est transformée en L-DOPA, qui peut se lier et activer le récepteur OA1, stimulant ainsi la production d'au moins un puissant facteur neurotrophique rétinien, le PEDF. Un défaut du signal médié par OA1 peut expliquer les perturbations du développement rétinien qui sont responsables du déficit visuel dans l'albinisme oculocutané (Lopez et al., 2008).

**TABLEAU II. PRINCIPAUX GENES INTERVENANT DANS LA PIGMENTATION CUTANEE**

<i>Locus murin/zebrafish</i>	Nom et fonction de la protéine produite	Pathologie associée
<b>Gènes intervenant dans l'embryogenèse du système mélanocytaire</b>		
<i>Splotch</i>	PAX3 : facteur de transcription/activation du promoteur du MITF	WS de type 1 et 3
<i>Microphthalmia</i>	Microphthalmia : facteur de transcription	WS de type 2
<i>Lethal Spotting</i>	Endothélin 3 : facteur de croissance	WS de type 4
<i>Piebald lethal</i>	Récepteur B aux endothélines	WS de type 4
<i>Dominant megacolon</i>	SOX10 : modulateur transcriptionnel/activation du promoteur MITF	WS de type 4
<i>White spotting</i>	c-Kit : récepteur membranaire à tyrosine kinase	Piébaldisme
<i>Steel</i>	MGF : facteur de croissance	–
<i>C10orf11</i>	Protéine intervenant dans la différenciation mélanocytaire	AOC de type 7
<b>Gènes intervenant dans la synthèse des mélanines et la régulation de la mélanogenèse</b>		
<i>Albino</i>	Tyrosinase : enzyme de la mélanogenèse	AOC de type 1
<i>Pinked-eye dilution</i>	Protéine P : régulation du pH des mélanosomes	AOC de type 2
<i>Brown</i>	TRP-1 : enzyme de la mélanogenèse	AOC de type 3
<i>Slaty</i>	TRP-2 : enzyme de la mélanogenèse	–
<i>Underwhite</i>	MATP : transporteur membranaire	AOC de type 4
<i>OA1</i>	OA1 : protéine de la membrane des mélanosomes	AO de type 1
<i>Silver</i>	Pmel-17 : protéine de la matrice des mélanosomes	cheveux argentés ?
<i>Mottled</i>	ATP7A : transporteur membranaire du cuivre	Maladie de Menkès
<i>Extension</i>	MC1R : récepteur à la MSH	Syndrome <i>red hair-fair skin</i>
<i>Agouti</i>	Protéine agouti : facteur inhibiteur de la mélanogenèse	–
<i>Sut</i>	SLC7A11 : intervient dans le transport de la cystéine dans le mélanosome	–
<b>Gènes contrôlant la structure et la fonction des mélanosomes</b>		
<i>OA1</i>	Protéine OA1 de la membrane des mélanosomes	AO de type 1
<i>Beige</i>	Protéine CHS-1 de la membrane des mélanosomes	Syndrome de Chediak-Higashi de type 1
<i>Pale ear</i>	Protéine HPS-1 : protéine de la membrane des mélanosomes, régulation de l'adressage des mélanosomes	Syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 1
<i>Pearl</i>	Sous-unité b 3A de la protéine adaptatrice AP-3	Syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 2
<i>Cocoa</i>	Protéine HPS-3 : régulation de l'adressage des mélanosomes	Syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 3
<i>Light ear</i>	Protéine HPS-4 : régulation de l'adressage des mélanosomes	Syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 4
<i>Ru2</i>	Protéine HPS-5 : biogenèse des LRO	Syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 5
<i>Ru2</i>	Protéine HPS-6 : biogenèse des LRO	Syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 6
<i>Sandy</i>	Protéine BLOC1S8 : biogenèse des LRO	Syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 7
<i>rp</i>	Protéine BLOC1S3 : biogenèse des LRO	Syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 8
<i>Pallid</i>	Pallidine ou syntaxine : Protéine de la membrane des mélanosomes	Syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 9
<i>Cappucino</i>	Protéine CNO : biogenèse du mélanosome	
<i>Golden</i>	Proteine NCKX5 : Transporteur membranaire, maturation du mélanosome	AOC de type 6
<b>Gènes impliqués dans le transport et la translocation des mélanosomes</b>		
<i>Dilute</i>	Myosine V : transport des mélanosomes	Syndrome de Griscelli-Prunieras de type 1
<i>Ashen</i>	Rab-27 : transport des mélanosomes	Syndrome de Griscelli-Prunieras de type 2
<i>Leaden</i>	Mélanophiline	?
	PAR-2 : récepteur à sept domaines transmembranaires de la membrane des kératinocytes impliqué dans le processus de cytophagocytose des mélanosomes	

## III L' Albinisme oculo-cutané

---

### III.a Les signes communs aux différents AOC

#### III.a.1 Atteinte cutané-phanérienne

La dépigmentation de la peau et des phanères est présente chez tous les patients présentant un AOC. Elle est de degré variable selon la capacité résiduelle à produire de la mélanine et dépend aussi de la modification du ratio eumélanine/phéomélanine et du phototype du patient. Dans la forme complète d'AOC 1, l'hypopigmentation est généralisée, définitive et indépendante du phototype : la peau est rose, les cheveux et les cils sont blanc-platine. Dans les formes incomplètes un certain degré de pigmentation est présent. Ainsi les cheveux peuvent être complètement dépigmentés blanc-platine, ou avoir une coloration jaune, roux ou brun-clair.

La peau est généralement blanc-crème. Dans certaines formes d'albinisme, il existe une capacité à pigmenter avec le temps.

Les naevus sont achromiques quand il n'y a aucune production mélanique ou pigmentés dans les AOC de type 1b ou 2.

La photosensibilité peut être marquée. Les principales complications décrites incluent l'apparition de kératoses actiniques, de carcinomes basocellulaires et épidermoïdes au niveau des zones photo-exposées. Ces tumeurs secondaires à l'exposition solaire surviennent sur un fond d'héliodermie prématurée faite d'atrophie cutanée, de télangiectasies, de taches brunes (Lookingbill et al., 1995).

Les carcinomes épidermoïdes sont les plus fréquents ; viennent ensuite les carcinomes basocellulaires, puis les mélanomes qui sont beaucoup plus rares. Les carcinomes épidermoïdes sont plus agressifs que dans la population générale avec un risque de dissémination secondaire élevé. Bien que rares, des cas de mélanomes ont été rapportés pour les deux formes d'AOC1 et 2 (Asuquo et al., 2009; Mabula et al., 2012).

### III.a .2. Atteinte ophtalmologique

Les manifestations ophtalmologiques constituent un élément constant au premier plan dans les pays tempérés. L'albinisme serait à l'origine de 5 % des malvoyances dans le monde. La photophobie et les signes oculomoteurs ne sont pas spécifiques. Nystagmus, strabisme, torticolis oculaire, amétropie forte sont diversement associés et réalisent des tableaux cliniques variés. La sévérité de l'atteinte ophtalmologique varie selon les types d'albinismes mais également pour un même type d'albinisme.

#### – Le nystagmus

Le nystagmus congénital, quasi constant, peut être découvert dans les premiers mois de vie, lors de la période critique de maturation de la fovea, quand il est ample. Il peut être discret et être décelé au cours d'un examen de dépistage systématique. Il est typiquement horizontal avec un caractère pendulaire et influence l'acuité visuelle. Il s'accroît à l'éblouissement, diminue avec le port de la correction optique. La plupart des patients atteints d'albinisme ont une posture de la tête compensatoire qui permet de diminuer le nystagmus et d'améliorer la vision. Le mécanisme responsable du nystagmus dans les albinismes n'est pas bien compris. Des études suggèrent qu'un développement anormal du système oculomoteur et une anomalie de l'organisation des corps genouillés latéraux et de leur projection vers le cortex seraient des facteurs déterminants de l'apparition et de la persistance du nystagmus.

#### – Le déficit visuel

Un des principaux signes est la mauvaise acuité visuelle. Cette malvoyance peut être profonde mais est plus souvent moyenne. Elle ne s'aggrave pas en dehors d'une pathologie oculaire associée. Dans la forme complète, le nouveau-né présente un retard d'acquisition des réflexes visuels. Dans les formes incomplètes, cette malvoyance peut s'atténuer avec l'âge.

L'acuité visuelle peut même atteindre 5 à 6 /10. Elle est meilleure en vision de près ce qui permet une scolarité en milieu ordinaire.

La vision des couleurs est habituellement normale. Le nystagmus peut être responsable d'une réduction concentrique des isoptères mais il n'y a pas d'anomalie du champ visuel liée à l'albinisme. La malvoyance est d'une part d'origine fonctionnelle et donc, en partie, accessible à une prise en charge du nystagmus dès le plus jeune âge (verres filtrants, correction des amétropies associées quasi-constantes), et d'autre part d'origine organique, secondaire à une hypoplasie fovéale ainsi que des altérations structurelles et

anatomiques des cônes (densité des cônes faible avec espacement 3 à 4 fois plus important que dans une fovea normale) et des voies visuelles sensorielles (anomalie de décussation des fibres visuelles temporales) et motrices (Summers, 1996). Il semble exister un retard de maturation visuelle présent depuis la naissance chez les enfants albinos. Le nystagmus, présent dès la naissance serait d'abord d'origine centrale avant de s'aggraver par la suite en rapport avec la mauvaise vision.

– La photophobie

La photophobie est un autre des signes communs observés dans l'albinisme, et peut parfois être invalidante. Elle n'est pas toujours proportionnelle à l'importance de l'hypopigmentation irienne. Elle résulte de la réduction de filtration de la lumière secondaire au déficit en mélanine mais n'est pas spécifique de l'AOC et existe dans d'autres pathologies rétiniennes.

– Les anomalies de la réfraction

Les amétropies sont fréquentes dans l'AOC. L'examen d'un enfant présentant un AOC doit comporter une étude de la réfraction quelque soit son âge. La prise en charge d'une amétropie permet d'éviter que ne s'ajoute à la baisse d'acuité visuelle provoquée par le développement anormal de la fovéa, un déficit lié à une anomalie de la réfraction. Elles comportent surtout l'astigmatisme fort, l'hypermétropie moyenne ou forte qui peut être supérieure à +10 dioptries. La myopie forte est plus rare mais peut atteindre des valeurs de – 10 dioptries. Tous les types de strabismes sont possibles. Le risque d'amblyopie strabique apparaît cependant faible.

### **III.b Les méthodes diagnostiques de l'AOC**

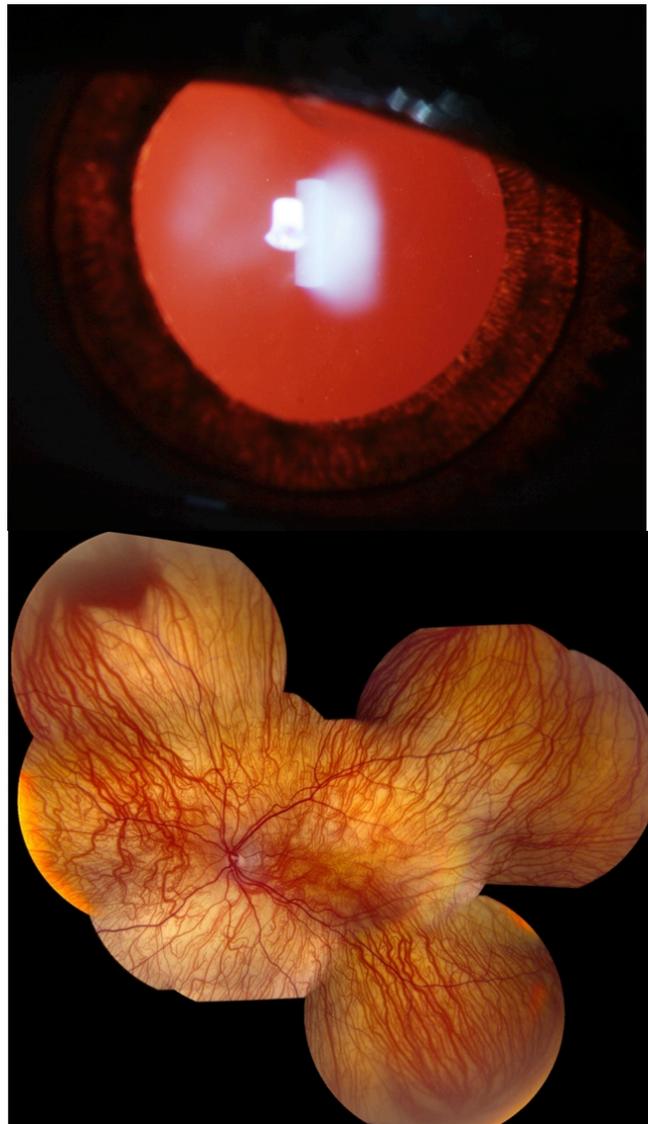
Le diagnostic d'un patient atteint d'un AOC repose sur l'examen clinique, électrophysiologique (potentiels évoqués visuels) et sur l'imagerie (OCT, IRM).

#### **III.b.1 L'examen clinique**

L'hypopigmentation est variable et doit être évaluée en fonction de la pigmentation des autres membres de la famille. L'existence d'anomalies oculaires et du système visuel est un élément indispensable au diagnostic. Cette atteinte est précisée par l'examen à la lampe à fente qui met en évidence l'un des principaux signes de l'albinisme : la transillumination (Figure 12). En raison du déficit en mélanine dans le stroma et dans l'épithélium postérieur

de l'iris, la lumière réfléchiée par la rétine n'est pas filtrée et les patients atteints d'albinisme ont un aspect rose, diaphane de leur iris (Summers, 1996).

L'examen du fond d'œil montre une hypopigmentation de l'épithélium pigmenté de la rétine. La rétine apparaît jaunâtre sillonnée par les vaisseaux choroïdiens anormalement visibles (Figure 8) Le reflet fovéale physiologique est absent, témoin de l'hypoplasie fovéale ; la macula apparaît plus rouge que le reste de la rétine (Summers, 1996). La mesure de l'angle kappa, angle formé entre l'axe pupillaire et l'axe visuel, varie selon la structure rétinienne et sa réfraction. Un angle kappa positif peut être considéré comme un autre signe clinique d'albinisme (Merrill et al., 2004).



**Figure 12 Examen ophtalmologique d'un patient présentant un AOC avec transillumination irienne à l'examen à la lampe à fente ; vaisseaux choroïdiens anormalement visibles témoin de l'hypopigmentation rétinienne avec aspect jaunâtre de la rétine au fond d'œil et hypoplasie de la fovéa.**

### **III.b.2. Les explorations électrophysiologiques**

Les électrorétinogrammes sont le plus souvent normaux. Malgré la réduction de mélanine la plupart des fonctions de l'épithélium pigmenté rétinien sont conservées et la rétine est capable de recevoir et de traiter la lumière.

Les potentiels évoqués visuels sont particulièrement intéressants notamment dans les formes modérées car ils mettent en évidence un signe assez spécifique de l'albinisme : une asymétrie de réponse croisée lors de la stimulation monoculaire, témoin de l'anomalie de décussation des fibres temporales du nerf optique notamment dans les formes frustes de découverte tardive (Guillery, 1996). Il existe un retard de latence du côté de la stimulation car une partie des fibres temporales qui sont normalement directes, décusse chez les patients atteints d'albinisme. Les patients ayant un nystagmus dû à des causes autres que l'hypopigmentation n'ont pas de réponses asymétriques aux Potentiels Evoqués Visuels.

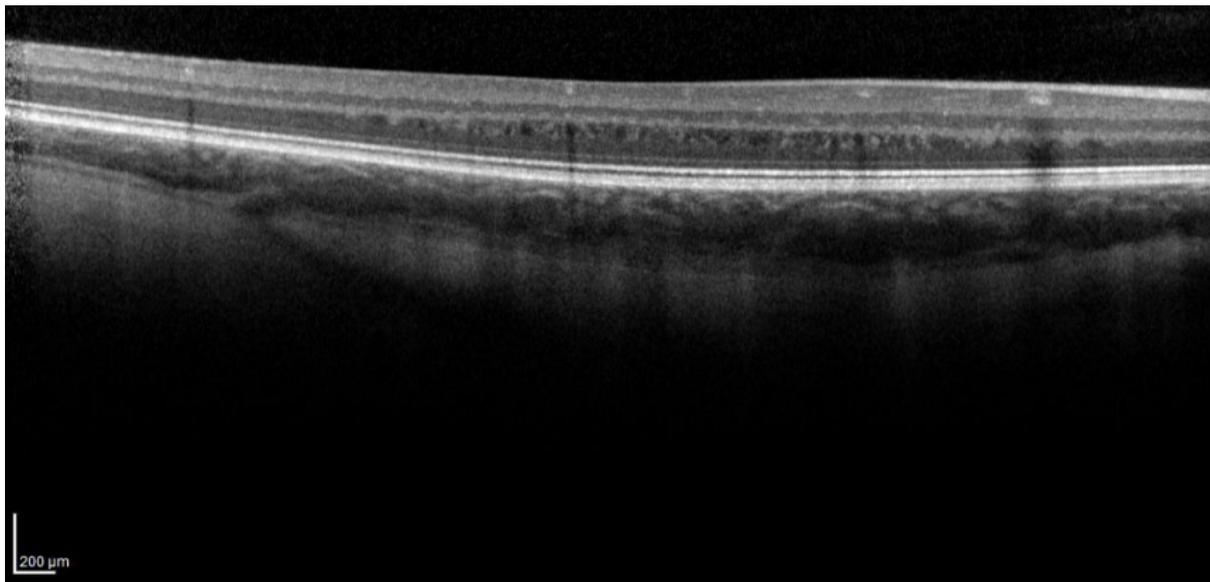
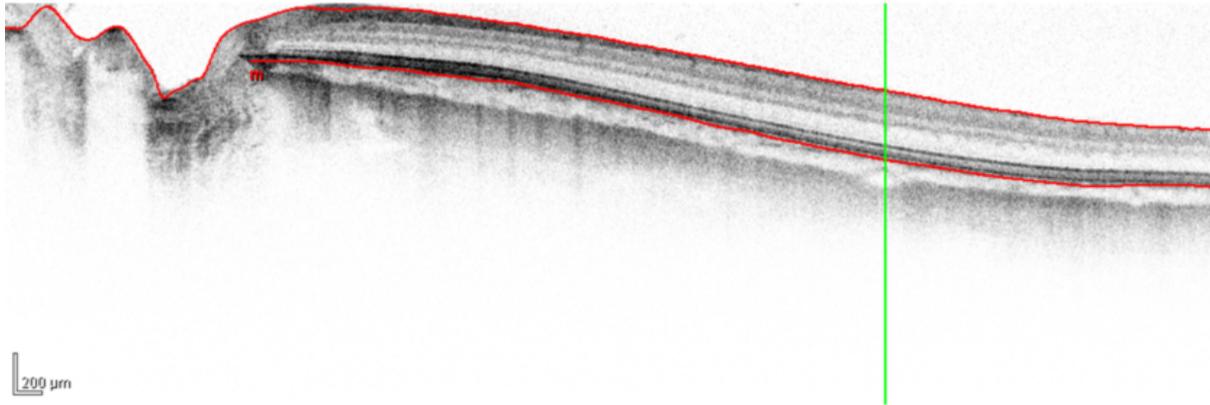
### **III.b.3. L'imagerie**

- L'OCT (Optical coherence tomography)

La morphologie et l'épaisseur de la fovéa peuvent être analysées par tomographie optique de la rétine ou OCT (Optical coherence tomography) et confirmer ainsi une hypoplasie fovéale non évidente chez un patient avec AOC (Chong et al., 2009; Meyer et al., 2002).

- L'Imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM)

L'IRM classique et l'IRM fonctionnelle ont montré une diminution des dimensions du chiasma optique ainsi que du nerf et du tractus optique. La réduction du chiasma optique touche surtout ses parties latérales là où passent les fibres ipsilatérales. L'IRM fonctionnelle a pu révéler lors d'une stimulation monoculaire des motifs d'activation corticale différents chez les patients albinos par rapport aux sujets sains (Schmitz et al., 2004).



**Figure 13. Disparition de la dépression fovéolaire visible en OCT chez un patient présentant un albinisme oculocutané.**

#### **III.b.4. Le diagnostic moléculaire**

Les différentes formes d'albinisme oculocutané non syndromiques sont difficiles à différencier cliniquement et on tend de plus en plus vers une classification moléculaire en fonction des mutations identifiées dans les principaux gènes d'AOC.

Les laboratoires de diagnostic moléculaire réalisent l'étude des principaux gènes impliqués dans les différentes formes d'AOC 1, 2 3 et 4 : *Tyrosinase*, *OCA2*, *SLC45A2* et *TYRP1*. La stratégie d'analyse moléculaire est actuellement séquentielle et repose sur l'analyse consécutive des différents gènes selon leur fréquence d'implication dans l'AOC qui varie selon l'origine ethnique. Elle comporte la recherche de mutations ponctuelles par séquençage direct et la recherche de réarrangements géniques.

Le développement actuel des techniques de séquençage nouvelle génération permet l'analyse simultanée des gènes d'AOC chez les patients.

### **III.c Prise en charge des patients présentant un AOC**

#### **III.c.1 Photoprotection cutanée**

Une photoprotection efficace dès le plus jeune âge permet de limiter le développement de carcinomes cutanés. Une éducation thérapeutique des parents et des enfants atteints doit être entreprise pour une photoprotection adéquate (pour les UVB mais aussi les UVA qui traversent le verre). En particulier, l'accent doit être mis sur la protection vestimentaire. L'utilité du port de vêtements limitant le passage UV pour lesquels il existe des marques spécialisées pour vêtements d'été, et de chapeaux à larges bords doit être bien assimilé en priorité. De plus, les patients doivent être incités à utiliser en permanence des topiques antisolaires anti-UVA et anti-UVB à haute protection sur les zones laissées par nécessité photo-exposées. À l'adolescence, l'éducation doit être renforcée et une surveillance clinique annuelle de dépistage de lésions précancéreuses et cancéreuses cutanées est recommandée.

#### **III.c.2 Favoriser le développement visuel**

Les problèmes ophtalmologiques sont dus au nystagmus, au strabisme, à l'hypoplasie de la fovéa et aux anomalies de développement des voies optiques. L'amblyopie fonctionnelle liée à la photophobie et aux amétropies peut être améliorée par des mesures précoces (correction optique totale, protection solaire de la rétine par le port de chapeaux, verres filtrants, lentilles teintées, corrections optiques). Les signes fonctionnels peuvent ainsi diminuer de façon significative et on peut noter une amélioration du comportement visuel. L'acuité visuelle centrale est difficile à tester et impossible à améliorer dans la majorité des cas. Des enregistrements du nystagmus ont montré une amélioration des tracés de la poursuite qui devient plus lisse (Kirkwood, 2009; Summers, 1996).

D'autres moyens permettent une amélioration de la qualité visuelle :

- les aides visuelles pour les amblyopes et les additions optiques de près chez l'enfant scolarisé (verres bifocaux ou progressifs) (Collins and Silver, 1990)
- une prise en charge précoce du strabisme, dès les premiers mois de vie, est nécessaire.
- le placement rétro-équatorial des muscles droits horizontaux peut permettre une diminution de l'amplitude du nystagmus (avec cependant le risque de voir apparaître un strabisme et certain degré d'ophtalmoplégie) et peut procurer une amélioration de la vision subjective même chez les patients avec hypoplasie fovéale. Il nécessite une analyse oculomotrice préalable des mécanismes de compensation, un enregistrement électronystagmographique

(Hertle et al., 2004). Il est indiqué le plus tard possible afin de ne pas induire de strabisme sauf chez le jeune enfant quand le torticolis est majeur ou associé à un fort astigmatisme difficile à compenser optiquement.

L'éducation est également primordiale : elle consiste d'abord à informer les personnels ayant en charge le suivi éducatif de l'enfant, de son handicap visuel, permettant de prendre des mesures simples qui amélioreront le confort quotidien et l'intégration (Okulicz et al., 2003). L'enfant doit être placé le plus près possible du tableau. Les textes doivent être adaptés (contraste, format). L'institut pour enfants malvoyants peut déléguer un éducateur spécialisé qui aidera les enseignants dans leur classe. Le handicap visuel doit être signalé dans le dossier scolaire de l'enfant. L'enfant peut avoir un aménagement de son emploi du temps, des documents agrandis lors des tests d'évaluation nationaux et des examens du brevet et du baccalauréat. La vie quotidienne peut également être améliorée par des mesures et objets adaptés aux personnes mal voyantes (Lund, 2005; Okulicz et al., 2003)]. Il existe une association française pour l'AOC (association Genespoir, 3 rue de la Paix, 35000 Rennes).

### **III.c.3 Perspectives thérapeutiques**

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitements spécifiques de l'albinisme oculocutané. L'identification des bases moléculaires de l'AOC, permet une meilleure compréhension de sa physiopathologie avec l'idée de proposer des thérapies ciblées. Les anomalies ophtalmologiques présentent chez ces patients, sont des anomalies de développement précoces (anomalie de décussation des fibres du chiasma optique) qui paraissent difficiles à corriger. Cependant, la maturation rétinienne fovéale et maculaire se poursuit en période post-natale et pourrait être accessible à un traitement (Abramov et al., 1982). Le rôle de la tyrosinase et de la pigmentation dans le développement visuel n'est pas complètement élucidé, mais des corrélations existent entre fonction visuelle et taux de pigmentation du fundus (Summers, 1996).

La nitisone est une molécule utilisée dans le traitement de la tyrosinémie de type 1. Elle inhibe une enzyme du catabolisme de la tyrosine et augmente les taux plasmatiques de la tyrosine. Il a été montré que l'administration de Nitisone à des souris ayant une diminution de l'activité tyrosinase entraînait une augmentation des taux plasmatiques de tyrosine et une augmentation de la pigmentation avec une augmentation du contenu en mélanine dans les mélanocytes (Onojafe et al., 2011). La L-DOPA constitue également une approche intéressante dans la correction des anomalies visuelles en raison de son rôle majeur dans le développement rétinien mis en évidence chez la souris albinos transgénique exprimant la

tyrosine hydroxylase. Cette souris présente une amélioration significative de la fonction visuelle, associée à des modifications des voies optiques et à une augmentation du nombre de photorécepteurs par rapport aux souris albinos non transgéniques (Lavado et al., 2006).

#### **III.c.4 Conseil génétique**

Le mode de transmission de l'AOC non syndromique est autosomique récessif. Il convient d'exclure des formes syndromiques d'AOC. Le diagnostic d'AOC reste le plus souvent clinique. La caractérisation des mutations délétères chez la personne atteinte peut permettre de confirmer le type d'AOC, mais est surtout utile au conseil génétique. Si les deux mutations sont caractérisées (homozygotie ou hétérozygotie composite), on propose dans le cadre du conseil génétique de rechercher les mutations à l'état hétérozygote chez chacun des deux parents. Il convient d'informer le couple qui a donné naissance à un enfant atteint d'albinisme du mode de transmission héréditaire et du risque de récurrence qui est de 25 % pour une prochaine grossesse avec un risque identique pour les filles et les garçons. La proposition d'un diagnostic prénatal avec interruption médicale de grossesse en cas de récurrence d'un fœtus atteint peut être discutée en fonction de la gravité de la maladie chez l'enfant atteint, liée essentiellement à l'atteinte oculaire et en fonction du vécu psychologique de la maladie. L'AOC non syndromique n'est pas une forme engageant le pronostic vital mais le phénotype de dépigmentation et le handicap visuel peuvent présenter un véritable problème d'intégration sociale pour le sujet atteint et pour sa famille. Dans les régions fortement ensoleillées, ce problème est exacerbé par les difficultés de prévention et, par ailleurs, en Afrique, par les croyances à propos des albinos (Aquaron, 2001; Lund, 2005). Le diagnostic prénatal peut se faire par choriocentèse ou amniocentèse et recherche des mutations par biologie moléculaire.

### **III.d Les différents types d'AOC**

#### **III.d.1. L'AOC de type I (MIM 203100)**

Des mutations dans le gène TYR sont responsables de l'AOC de type 1, forme la plus sévère d'AOC, subdivisé en deux sous-types 1A et 1B. Dans l'albinisme de type 1A, forme la plus complète, il y a absence complète de production de mélanine. Les mélanocytes sont dépourvus de mélanine et les mélanosomes sont tous au stade de prémélanosomes I ou II. Le test sur bulbe de cheveux permet de classer cette forme comme tyrosinase négative (KUGELMAN and VAN SCOTT, 1961). Le diagnostic est en général évident dès la naissance. L'hypopigmentation est généralisée, définitive et indépendante de l'origine ethnique : la peau est rose, les cheveux, les cils et les sourcils sont blanc-neige. Ils peuvent tirer discrètement sur le jaune avec l'âge. Il n'y a pas de lésions cutanées pigmentées ; les nævus mélanocytaires sont achromiques (Okulicz et al., 2003).

Dans le cas d'une activité résiduelle de tyrosinase (AOC de type 1B ou albinisme jaune)(Giebel et al., 1991a), l'individu présente une peau et des phanères très blancs, des iris bleutés translucides puis développe une pigmentation pendant la première décennie à la naissance. Avec l'âge, les cheveux deviennent blond clair voire blond foncé, la peau reste claire mais peut acquérir une pigmentation au soleil de même que des éphélides et des nævus. Les iris deviennent bleu plus foncé, gris ou même brun clair. Seuls quelques mélanosomes atteignent les stades III et IV de maturation, et la mélanine produite est essentiellement composée de phaeomélanine. Du fait de sa prévalence élevée chez les Amish, il a été nommé albinisme amish. La couleur de la peau et des cheveux est influencée par l'origine ethnique du sujet atteint. La production de DOPAquinone pourrait être responsable de l'aspect jaune ou blond des cheveux (Oetting and King, 1999).

Il a été décrit une forme inhabituelle d'AOC avec hypopigmentation marquée dès la naissance puis apparition d'une pigmentation dans certaines régions anatomiques comme les bras et les jambes, zones les plus froides du corps. Cette forme est associée à une tyrosinase thermosensible qui devient inactive lorsque la température s'élève au-delà de 35°C (King et al., 1991).

La tyrosinase est l'enzyme qui catalyse les deux premières étapes de synthèse de la mélanine, étapes communes à la formation des deux sortes de pigments : eumélanine et phaeomélanine. La tyrosinase humaine a un rôle de DHICA oxydase (Olivares et al., 2001). L'étude de souris transgéniques avec expression inductible du gène TYR (système Tet-on) a montré une correction partielle de l'anomalie de décussation des projections chiasmiques,

anomalie typiquement observée chez le sujet atteint d'AOC (Lavado and Montoliu, 2006). Ceci est en faveur du rôle de la tyrosinase dans le développement de la rétine et des voies optiques vers le cortex visuel (Giménez et al., 2004).

Le gène TYR a été le premier gène d'albinisme humain cloné, dans la région 11q14.3, par Barton et al. en 1998 (Barton et al., 1988). C'est l'homologue du gène murin albino ou c qui s'étend sur 118 Kb et contient 5 exons ; plus de 50 % de la région codante du gène se trouve dans l'exon 1. Son promoteur et les régions régulatrices en 5' ont été caractérisés (Figure 12)(Oetting, 2000). Il code pour une glycoprotéine membranaire de 529 acides aminés (aa), comprenant un peptide signal de 18 aa à l'extrémité amino-terminale, deux sites de liaison au cuivre, une région transmembranaire à l'extrémité carboxy-terminale, et un motif EGF (epidermal growth factor)-like. Il existe un pseudogène situé en 11p11.2, constitué des exons 4 et 5 de TYR et de régions adjacentes non codantes. Les séquences communes au gène TYR et au pseudogène TYRL diffèrent pour 2,6 % des bases seulement, ceci situant la duplication du premier gène il y a environ 24 millions d'années (Giebel et al., 1991b). À ce jour, plus de 300 mutations et délétions ont été décrites dans ce gène (Albinism database, <http://albinismdb.med.umn.edu/>, HGMD Biobase). Ces variants nucléotidiques comportent des mutations non-sens, faux-sens, insertions ou délétions, mutations d'épissage, et de rares cas de délétions de l'ensemble du gène (Coupry et al., 2001; Schnur et al., 1996). Ils se répartissent tout au long du gène avec une prédominance sur la région codant pour le site B de liaison au cuivre. De 15 à 35% de patients selon les publications ne présentent qu'une mutation de TYR (King et al., 2003; Oetting and King, 1999; Opitz et al., 2004; Simeonov et al., 2013). L'exploration des régions régulatrices en 5' du promoteur (4 Kb) n'a pour le moment pas permis de mettre en évidence de mutation. En revanche l'étude de l'expression des différents allèles parentaux à partir de l'ARN de lymphocytes a montré un défaut d'expression de l'allèle non muté (Oetting et al., 2003).



(Ancans et al., 2001). La protéine P serait également impliquée dans l'adressage de la tyrosinase au mélanosome et dans la stabilité du complexe mélanosomal (Lamoreux et al., 1995; Potterf et al., 1998)(fig. 3).

Le gène *OCA2* humain a été cloné en 1993 par Rinchik et al.(Rinchik et al., 1993) ; il s'étend sur 345 Kb en 15q13.1 et contient 25 exons dont le premier n'est pas codant. Son homologue murin est le gène *p* ou pink-eyed dilution. Chez l'homme, il existe 5 transcrits dont le plus long code pour un polypeptide de 838 aa. La structure de la protéine P, avec ses 12 domaines transmembranaires, est semblable à celle des protéines transportant de petites molécules (famille des transporteurs SLC13A). À ce jour plus de 150 mutations réparties sur l'ensemble du gène et une cinquantaine de polymorphismes ont été décrits (Rooryck et al., 2008a). Il s'agit de mutations non-sens, faux-sens, insertions ou délétions de quelques bases entraînant un décalage du cadre de lecture, et de mutations d'épissage. Il existe une délétion africaine récurrente de 2,7 Kb incluant l'exon 7 d'*OCA2*, dont la prévalence peut atteindre plus de 90 % des allèles mutés dans certaines populations (Puri et al., 1997). Certains des variants polymorphiques sont associés à une prédisposition aux mélanomes malins dans la population générale (Jannot et al., 2005).

### **III.d3. L'AOC de type III**

L'albinisme oculo-cutané de type 3 ou albinisme roux mais aussi certaines formes d'albinisme brun sont liés à des mutations dans le gène *TYRP1* (Boissy et al., 1996). Il est plus fréquent chez les Noirs-africains et Afro-américains et c'est une forme tyrosinase positive d'albinisme. Les signes distincts d'AOC3 comportent une peau rouge brique, des cheveux roux à rouges et des yeux bleus à bruns(Kromberg et al., 1990). Les individus naissent avec une très faible quantité de pigment, mais développent une pigmentation avec le temps. Des lentigines, éphélides, naevus peuvent aussi survenir. Le risque de lésions actiniques semble moins important que dans les autres types d'AOC (Okulicz et al., 2003). La protéine TYRP1 aurait diverses fonctions enzymatiques dont principalement une activité DHI et DHICA oxydase dans la partie distale du cycle de synthèse de l'eumélanine (fig. 1). Ainsi, en cas d'absence ou de fonctionnement anormal de TYRP1 il y a blocage de la formation d'eumélanine et seules les phaeomélanines sont synthétisées. Certains auteurs attribuent à TYRP1 une activité tyrosine hydroxylase en collaboration avec la tyrosinase (Olivares et al., 2001). Elle aurait également un rôle de stabilisation de la tyrosinase et de modulation de son activité catalytique (Manga et al., 2000; Sarangarajan and Boissy, 2001) . Enfin elle préviendrait la mort prématurée des mélanocytes due à la cytotoxicité médiée par la tyrosinase (Luo et al., 1994).

Le gène TYRP1 a été cloné par Abbott et al. en 1991 (Abbott et al., 1991) ; c'est l'homologue du gène *b* ou *brown* chez la souris ; il s'étend sur 17 Kb en 9p23. Il possède 8 exons, dont le premier est non codant. Il code pour la glycoprotéine membranaire la plus abondante du mélanosome, de 537 aa qui présente une grande homologie de structure avec la protéine tyrosinase (environ 50 % des aa) d'où son nom « tyrosinase-related protein ». Elle possède deux sites de liaison au cuivre, deux domaines riches en cystéine (comprenant 17 résidus cystéine), un domaine transmembranaire, une séquence signal amino-terminale et environ six sites de glycosylation. Longtemps considéré comme limité aux populations noires d'origine africaine ou afro-américaine, avec deux mutations récurrentes identifiées (Boissy et al., 1996; Manga et al., 1997), l'OCA3 a été ensuite diagnostiqué chez des patients caucasiens et asiatiques avec la mise en évidence de nouvelles mutations (Forsheew et al., 2005; Rooryck et al., 2006; Yamada et al., 2011; Zhang et al., 2011). Il est considéré comme la forme la plus rare d'AOC.

#### **III.d.4. L'AOC de type IV**

L'albinisme oculo-cutané de type 4 est lié à des mutations dans le gène AIM-1 (antigen in melanoma-1) ou MATP (membrane associated transporter protein) ou SCL45A2 (Newton et al., 2001). Le phénotype est variable allant d'une hypopigmentation sévère sans amélioration à l'âge adulte, à une atteinte plus modérée avec repigmentation possible au cours du temps. Le gène *SCL45A2* code pour un antigène de différenciation du mélanocyte fortement exprimé dans les lignées cellulaires de mélanome humain. L'homologue *b* du gène MATP chez le poisson medaka code pour une protéine formée de douze domaines transmembranaires ayant un rôle de transporteur dans le cycle de synthèse de la mélanine (Fukamachi et al., 2001). Dans les mélanocytes de souris mutantes *underwhite* (homologue murin de *SCL45A2*), l'activité de la tyrosinase est diminuée à 20 % de la normale, et les mélanosomes sécrétés sont immatures. La protéine MATP semble avoir un rôle de transport de tyrosinase vers les mélanosomes de type II, et dans le processus de maturation des mélanosomes (Costin et al., 2003) (fig. 3).

Le gène *SCL45A2* a été cloné par Newton et al. en 2001 (Newton et al., 2001). Il s'étend sur 40 Kb dans la région 5p13.3 et est constitué de 7 exons. Il code pour un polypeptide de 530 aa contenant 12 domaines transmembranaires putatifs, uniquement exprimé dans les mélanocytes. À ce jour, plus de 40 mutations ont été identifiées dans certaines populations et plus de 30% d'entre elles concernent des patients d'origine japonaise (Inagaki et al., 2004)

Certains polymorphismes -c.814G> A (p.Glu272Lys) et c.1122C> G (p.Phe374Leu) sont associés avec des variations de pigmentation chez des individus normaux (Graf et al., 2005). La distribution de l'allèle Phe374 et des haplotypes associés a été étudiée dans un grand échantillon de populations et les différences marquées qui ont été observées font suggérer que c'est un facteur important de l'hypopigmentation chez les Caucasiens, conséquence d'une adaptation à des taux plus bas d'ultraviolets (Yuasa et al., 2006).

### **III.d.5. L'AOC de type V**

Un cinquième locus a été associé à une forme non syndromique d'albinisme oculocutané dans une famille consanguine d'origine pakistanaise. L'intervalle de liaison d'OCA5 est d'environ 3,84 Mb et comporte 14 gènes. Aucun de ceux-ci n'est connu pour être impliqué dans une anomalie de pigmentation. Le séquençage de 9 de ces 14 gènes n'a pas mis en évidence de mutation (Kausar et al., 2013).

### **III.d.6. L'AOC de type VI**

Deux mutations délétères hétérozygotes composites ont été identifiées très récemment dans le gène *SLC24A5* (solute carrier family 24 member 5) chez un patient d'origine chinoise présentant un AOC non syndromique.

Le gène *SLC24A5* code pour la protéine SLC24A5 (solute carrier family 24 member 5) ou Sodium/potassium/calcium exchanger 5 (NCKX5) qui a une influence majeure sur les variations de la pigmentation cutanée naturelle (Wilson et al., 2013). La protéine NCKX5 est un membre de la famille des canaux échangeurs d'ions sodium/calcium. Elle est impliquée dans la maturation des mélanosomes et la mélanogenèse. Chez le poisson Zèbre, des mutations dans l'homologue de ce gène donnent le phénotype « Golden ». La souris mutée *Slc24a5*<sup>-/-</sup> présente un tableau d'albinisme oculaire avec une dépigmentation de l'épithélium pigmenté rétinien, du corps ciliaire et de l'iris (Vogel et al., 2008). Une réduction de la taille et du nombre de mélanosomes sont également observées dans les mélanocytes dérivés de la crête neural.

Ce gène s'étend sur 21 kb dans la région 15q21.1. Il comporte 9 exons et code une protéine de 500 acides aminés. Cette protéine de 43 kDa est partiellement localisée au niveau du réseau golgien dans les mélanocytes. Les deux mutations délétères identifiées chez ce patient sont c.591G>A et c.1361insT. Le variant p.Ala111Thr du gène *SLC24A5* a été associé à un phototype claire (Lamason et al., 2005).

### III.d.7. L'AOC de type VII

Des mutations du gène *C10orf11* ont été impliqués dans une forme d'albinisme à prédominance ophtalmologique décrite initialement chez des patients originaires des îles Faroe (Grønskov et al., 2013b). Les patients présentent une pigmentation plus claire que leurs apparentés et ont tous sur le plan ophtalmologique, un nystagmus et une transillumination irienne bilatérale. Le fond d'œil met en évidence une dépigmentation et les Potentiels Evoqués Visuels montrent une asymétrie croisée. La photophobie est absente. Le gène *C10orf11* code une protéine localisée dans les mélanoblastes et les mélanocytes dans le tissu foetal humain. Le knockdown de l'homologue chez le Zebrafish conduit à une dépigmentation et à une réduction du nombre de mélanocytes pigmentés. Le phénotype est reversé par le gène *C10orf11* sauvage mais pas par le mutant *C10orf11*(Grønskov et al., 2013b).

Le gène *C10orf11* s'étend sur 0,7 kb dans la région 10q22.2 et est constitué de 6 exons. Il code pour une protéine de 198 aminoacides. Cette protéine est impliquée dans la différenciation mélanocytaire. Une deuxième mutation homozygote (duplication d'1pb) a été identifiée chez un patient d'origine lithuanienne.

# **Objectifs de la Thèse**

## Objectifs de la thèse

---

Le laboratoire de génétique moléculaire du CHU de Bordeaux, en collaboration avec l'unité de recherche (Laboratoire MRGM EA4576) s'intéresse depuis plus de 10 ans aux bases moléculaires de l'albinisme oculocutané. Les données de notre laboratoire en accord avec celles de la littérature montrent qu'environ 15% des patients avec un albinisme oculocutané restent sans diagnostic moléculaire (Rooryck et al., 2008a). Ceci suggère que les mutations se trouvent dans les régions non explorées des gènes connus et ne sont pas détectés par les techniques classiques ou bien qu'il existe d'autres gènes responsables d'albinisme oculocutané chez ces patients.

Le but de ma thèse a été d'étudier les aspects cliniques et moléculaires de l'albinisme oculocutané et de rechercher de nouveaux mécanismes moléculaires et de nouveaux gènes impliqués dans cette affection.

Mon travail de thèse se divise en 4 parties :

1/ Contribution à l'identification de nouvelles mutations dans les gènes d'AOC et étude de corrélations génotype-phénotype à partir de l'établissement d'une base de données clinicobiologiques.

2/ Développement d'une puce à façon haute-résolution pour l'identification de remaniements dans les gènes responsables d'albinisme oculocutané.

3/ Recherche de nouveaux gènes dans l'albinisme oculocutané par Cartographie par Homozygotie et séquençage haut-débit.

4/ Présentation de données moléculaires et fonctionnelles réalisées chez un patient présentant un phénotype associant un albinisme oculocutané et un tableau neurologique sévère lié à une anomalie de l'ubiquitylation.

# Résultats

# I. Etude clinico-moléculaire de l'Albinisme oculo-cutané

---

## I.a Introduction

L'albinisme oculocutané est une affection autosomique hétérogène sur le plan génétique. Sur le plan clinique, il existe une variabilité du phénotype. L'absence totale de pigmentation peut être observée chez les patients présentant un AOC1 ou un AOC4. Dans les autres formes d'AOC, la dépigmentation est de degré variable et dépend du défaut moléculaire associé au phénotype AOC mais est influencée également par le phototype. L'hypopigmentation doit être analysée en fonction de la pigmentation des parents et fratrie. Les anomalies visuelles dans l'albinisme incluent : hypoplasie fovéale, anomalie de décussation des voies optiques, transillumination irienne, photophobie et nystagmus (Grønskov et al., 2007b; Summers, 2009). Les signes ophtalmologiques sont constants et constituent l'élément clé du diagnostic.

L'hétérogénéité clinique et moléculaire de l'AOC fait rechercher des corrélations génotypes-phénotypes. La grande hétérogénéité du phénotype des patients pose également la question de la définition de l'albinisme. Les critères diagnostiques de l'albinisme oculocutané ne sont pas définis.

Dans cette première partie seront présentées les données du diagnostic moléculaire des patients AOC analysés au sein du laboratoire de génétique moléculaire ainsi que les caractéristiques épidémiologiques et cliniques de ces patients décrits à partir d'une base de données clinicobiologiques.

## I.b Diagnostic moléculaire de l'albinisme oculocutané et description de nouvelles mutations dans les gènes OCA1-4

*Ce travail d'analyse moléculaire a fait l'objet d'une publication initiale en 2008 dans Pigment Cell and Melanoma Research qui rapporte la répartition des mutations chez 63 patients et décrit de nouvelles mutations dans les 4 gènes.*

*Nous décrivons dans une revue de 2009 parue dans Experimental Dermatology, les différents types d'albinisme oculocutané ainsi que la stratégie d'analyse moléculaire à travers notre expérience dans le diagnostic de l'albinisme oculocutané.*

***De nouvelles mutations ont été décrites depuis dans ces 4 gènes TYR, OCA2, SLC45A2 et TYRP1 et ce travail va faire l'objet d'une publication avec un manuscrit en préparation.***

Notre laboratoire de biologie moléculaire a commencé de travailler sur l'albinisme oculocutané en 1997 avec l'analyse moléculaire du gène *TYR*. Une délétion en 11q14.3 incluant *TYR* avait été mise en évidence sur le caryotype haute-résolution réalisé chez un patient présentant un albinisme oculocutané associé à une leucodystrophie. Le gène *TYR* avait été réalisé à la recherche d'une deuxième mutation (Coupry et al., 2001).

Depuis, le diagnostic moléculaire s'est développé et l'analyse complète de *TYR*, *OCA2*, *SLC45A2* et *TYRP1* par séquençage direct et QMF-PCR a été progressivement mise en place. Pour chaque patient analysé, nous disposons d'une fiche clinique permettant de renseigner précisément les signes cutanés et ophtalmologiques (Figure 16). Les gènes sont analysés de façon séquentielle.

La stratégie d'analyse des 4 gènes est liée à la fréquence relative des différents types d'AOC selon les populations. Il n'existe pas de corrélations génotype phénotype suffisamment forte permettant d'orienter d'emblée vers l'analyse spécifique d'un des gènes. Ainsi classiquement, l'analyse commence par *TYR* puis *OCA2* chez les sujets Caucasiens et *OCA2* puis *TYR* chez les sujets d'origine africaine, et *SLC45A2* puis *TYRP1* sont analysés ensuite. La pathogénicité des variants est évaluée avec l'utilisation de logiciel de prédiction (Alamut; Polyphen2 ; SIFT).

L'analyse moléculaire s'est poursuivie au sein du laboratoire avec l'étude à ce jour de plus de 400 patients (Figure 17). Nous avons élargi les analyses avec la mise au point du séquençage et de la recherche de délétion des gènes *GPR143*, impliqué dans l'albinisme oculaire lié au chromosome X et *HPS1* impliqué dans la forme la plus fréquente d'albinisme syndromique, le syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 1. Ce travail nous a permis de mettre en évidence 36% de mutations dans *TYR*, 25% de mutations dans *OCA2*, 2% de mutations dans *TYRP1* et 11% de mutations dans *SLC45A2*. Par ailleurs, chez 6% des patients présentant un albinisme oculaire pur des mutations de *GPR143* ont été identifiées.

1% de patients présentent des mutations dans *HPS1*. Nous avons identifié des mutations dans le gène *HPS1* chez 3 patients initialement décrits comme présentant un albinisme oculocutané non syndromique. La réévaluation du phénotype chez ces 3 patients a révélé qu'ils présentaient des anomalies de la coagulation avec des ecchymoses faciles et un d'entre eux présentait une symptomatologie digestive étiquetée rectocolite hémorragique.

13 % des patients ne présentent aucune mutation.

Six pour cent des patients ne présentent qu'une mutation dans un des 4 gènes. Les limites du screening moléculaire (séquençage direct) et la possibilité de mutations introniques ou dans des régions régulatrices non détectées pourraient expliquer cet échec.

L'acquisition, par le laboratoire de diagnostic moléculaire, d'un séquenceur moyen-débit (PGM Ion Torrent, Life Technologies) a conduit à faire évoluer la méthode diagnostique. Il est possible d'analyser plusieurs gènes de façon simultanée en multiplexant des amorces spécifiques des régions d'intérêt. Ainsi des amorces ont été choisies afin de créer un design permettant le séquençage des 6 gènes *TYR*, *OCA2*, *SLC45A2*, *TYRP1*, *GPR143* et *HPS1* en utilisant le logiciel (Ampliseq-Designer). Il est possible de vérifier le niveau de couverture théorique des gènes avec le design d'amorces obtenu et de faire varier les paramètres de design en diminuant la stringence afin d'augmenter la couverture. Nous avons obtenu un design donnant une couverture satisfaisante des gènes d'intérêt et permettant son utilisation en diagnostic.

Concernant les patients sans mutation plusieurs hypothèses sont émises :

- (1) Le diagnostic d'albinisme oculo-cutané doit être remis en question, notamment chez les patients présentant une atteinte ophtalmologique atypique : absence de nystagmus, fond d'œil albinoïde sans hypoplasie fovéale, transillumination rétinienne modérée périphérique.
- (2) Un diagnostic d'albinisme oculocutané syndromique est méconnu, les symptômes associés pouvant être d'apparition retardée (atteinte digestive et pulmonaire dans le syndrome d'Hermansky-Pudlak par exemple).
- (3) Les mutations se trouvent dans des régions non explorées par les techniques de diagnostics moléculaires de routine : régions régulatrices 5'UTR, promoteur, éléments de régulation à distance, introns.
- (4) D'autres gènes sont impliqués dans l'Albinisme oculocutané.

Figure 16. Fiche de renseignements cliniques

**FICHE DE RENSEIGNEMENTS CLINIQUES**  
**ALBINISME OCULAIRE et OCULOCUTANE**

Nom : ..... Prénom : ..... Date de naissance : ..... / ..... / ..... Sexe : F  / M   
 Date de la demande : ..... / ..... / .....  
 Nom et adresse du prescripteur : .....

**ELEMENTS A FOURNIR : joindre un arbre généalogique et des photographies**  
 Aucune Pigmentation  /Tendance à Pigmenter

**Antécédents familiaux (arbre généalogique obligatoire) :**  
 ♦ Albinisme Oculaire : ..... ou  / non  / NSP   
 ♦ Albinisme Oculocutané : ..... ou  / non  / NSP   
 ♦ Consanguinité : ..... ou  / non  / NSP   
 ♦ Couleur de peau / cheveux père : .....  
 ♦ Couleur de peau / cheveux mère : .....

**Origine géographique :**  
 ♦ Africain, Africain du nord, Asiatique, Caucasien, Portoricain, Autre : .....  
 Père : ..... Mère : .....

**Naissance :**  
 Poids : ..... Taille : ..... PC : .....  
 ♦ Couleur de la peau : Blanche  Crème  Rosée  Brun Clair   
 ♦ Couleur des cheveux : Blanc Platine  Jaune  Brun Clair  Gris   
 ♦ Autre anomalie périmatale : .....

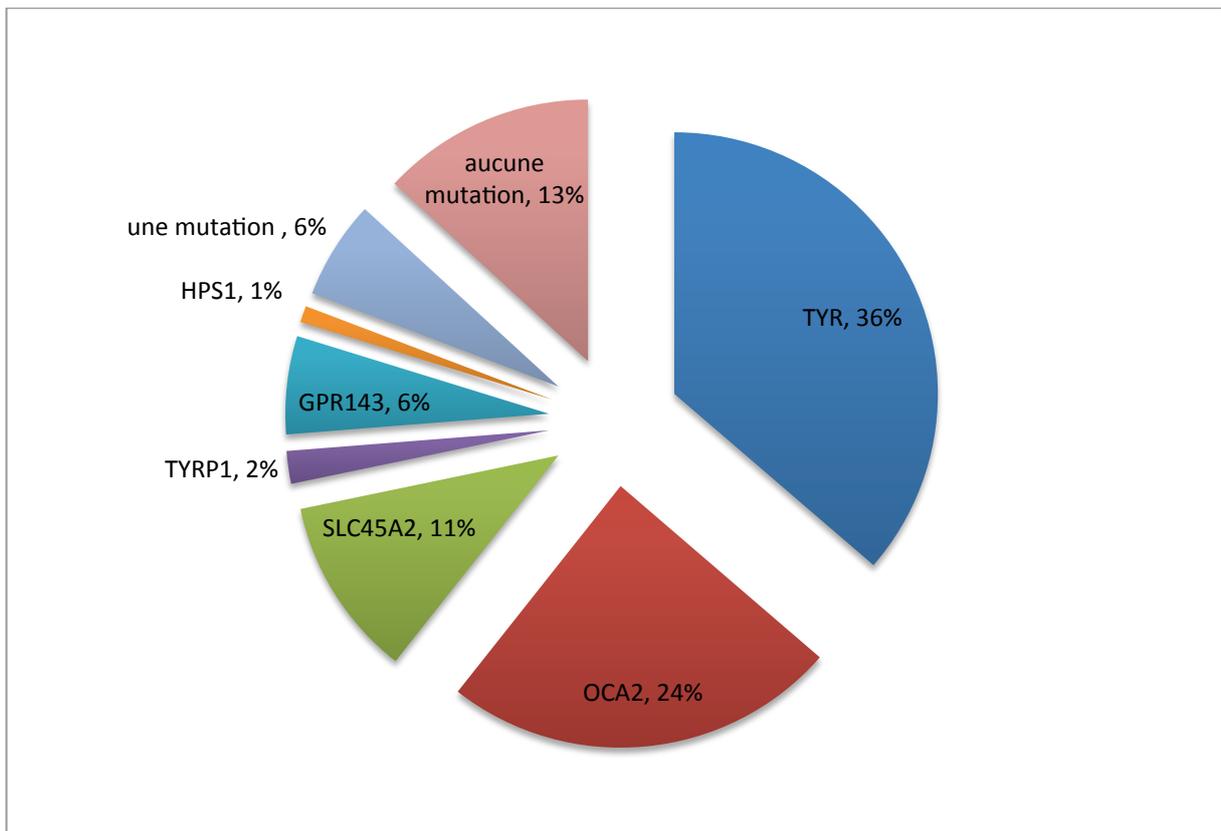
**Enfance :**  
 ♦ Age au moment du diagnostic : .....  
 ♦ Développement psychomoteur : NORMAL  ANORMAL

**Signes cutanéophariéens**  
 ♦ Couleur de la peau : Blanche  / Crème  / Rosé  / Brun Clair   
 ♦ Couleur des cheveux : Blanc Platine  / Jaune  / Roux  / Brun Clair  Gris   
 ♦ Couleur des poils et des sourcils : .....  
 ♦ Dépigmentation : Homogène  / Non Homogène   
 ♦ Détailler si non homogène : .....  
 ♦ Présence de naevi : oui  / non  NSP  nombre : ..... Achromiques  / Pigmentés   
 Si pigmentés indiquer leur couleur : .....  
 ♦ Présence d'éphélides : oui  / non   
 ♦ Evolution de la pigmentation avec l'âge : .....

**Signes ophtalmologiques**  
 ♦ Gris  / Bleu  / Vert  / Marron   
 oui  / non   
 ♦ Reflet rouge pupillaire : .....  
 oui  / non   
 ♦ Nystagmus : .....  
 Si oui : présent dès la naissance  / apparition au cours de la vie  / NSP   
 ♦ Torticolis oculaire : .....  
 oui  / non   
 ♦ Photophobie : .....  
 oui  / non   
 ♦ Strabisme : .....  
 oui  / non   
 ♦ Myopie : .....  
 oui  / non   
 ♦ Astigmatisme : .....  
 oui  / non   
 ♦ Hypermétropie : .....  
 oui  / non   
 ♦ Vision binoculaire : .....  
 oui  / non   
 ♦ Baisse d'acuité visuelle : .....  
 Evaluation (indiquer AV chiffrée) : .....  
 Examen du segment antérieur à la lampe à fente : .....  
 Signe de transillumination de l'iris : .....  
 Fond d'œil : - Hypopigmentation rétinienne   
 - Hypoplasie fovéale   
**Signes auditifs**  
 ♦ Baisse d'audition : .....  
 oui  / non

**Autres renseignements :**  
 ♦ Lésions de Kératose actinique : .....  
 oui  / non  / NSP   
 ♦ Antécédents de Cancer cutané : .....  
 oui  / non  / NSP   
 Si oui âge de survenue du premier cancer : .....  
 Carcinome basocellulaire : oui  / non   
 Carcinome spinocellulaire : oui  / non   
 Autre non mélanome : oui  / non   
 Mélanome : oui  / non

**Examens dermatologiques :**  
 ♦ Test d'incubation du bulbe de cheveu (activité tyrosinase) : positif  / négatif  / ND   
 ♦ Biopsie cutanée : .....  
 oui  / non



**Figure 17. Proportion relative des différentes catégories génétiques de patients.**

## **I.c Etude la mutation p.Gly47Asp de la Tyrosinase**

*Ce travail a fait l'objet d'une communication orale à l'International Pigment Cell Congres en septembre 2011.*

Nous avons identifié de nouvelles mutations dans les gènes étudiés mais également des mutations récurrentes. Ainsi dans le gène *TYR*, la mutation faux-sens p.Gly47Asp est retrouvée chez 5 de nos patients. Le caractère délétère de cette mutation est établi par les logiciels de prédictions (Alamut Software; Polyphen2; SIFT).

D'autre part cette mutation faux-sens, localisée dans l'exon 1 du gène a été décrite la première fois par Oetting et al, en 1991 chez un patient Caucasien et 3 ans plus tard par le même groupe chez des patients d'origine espagnole venant des îles Canaries et de Porto Rico. Cette mutation a également été trouvée chez des patients Juifs Marocains à l'état homozygote et chez 5 patients d'origine juive venant du Maroc et de Tunisie (Gershoni-Baruch et al., 1994). La fréquence de la mutation chez les patients Juifs Marocains, chez les patients des îles Canarie, de Porto Rico et des Etats-Unis suggère un effet fondateur.

En collaboration avec le Pr Aquaron (Marseille), nous avons décidé de vérifier cette hypothèse et de faire une analyse des haplotypes au locus *TYR* chez les patients porteurs de cette mutation p.Gly47Asp afin de rechercher un haplotype commun aux différents patients.

Nous avons utilisés les marqueurs microsatellites qui sont des marqueurs génétiques polymorphiques spécifiques à un individu pour un locus chromosomique donné, définis par des répétitions de di, tri ou tétranucléotides. La grande variabilité du nombre de répétitions au sein d'une population pour un microsatellite donné en fait un marqueur informatif pour analyser l'héritabilité mendélienne d'un locus au sein d'une famille. Ils sont uniformément répartis sur le génome humain. La pertinence de l'information délivrée par des marqueurs dépend du degré d'hétérozygotie dans la population. Le polymorphisme des microsatellites peut être exploré par PCR. Les amorces sont choisies pour amplifier une séquence unique encadrant le motif répété. Les séquences sont disponibles dans les bases de données informatiques accessibles par internet. L'analyse des microsatellites et de leur ségrégation est possible grâce à une méthode fluorimétrique rapide utilisant des marqueurs fluorochromes. L'amorce sens est couplée à un fluorophore permettant au produit de PCR d'être détecté par le laser du séquenceur ABI PRISM 3130.

Nous avons analysé 7 marqueurs microsatellites au locus *TYR* dont 5 intragéniques afin de rechercher chez nos 5 patients et leurs parents ainsi que chez des patients issus de 4 familles différentes.

Les résultats sont résumés dans le tableau III. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un haplotype commun aux différents patients des 9 familles de cette étude.

L'histoire de populations juives Sépharades et Marocaines pourrait apporter des éléments sur l'origine et la dispersion de cette mutation. La proximité géographique et les relations politiques entre Espagne, Maroc et les Iles Canaries, l'exploration de Porto Rico par les navigateurs espagnols et l'histoire de la migration des populations des Iles Canaries à Porto Rico suggèrent que la mutation p.Gly47Asp dérive d'un ancêtre commun. La prévalence élevée de cette mutation dans les populations sépharades pourrait faciliter le diagnostic moléculaire dans ces familles.

**TABLEAU III. HAPLOTYPES OBSERVES CHEZ LES PATIENTS DES 9 FAMILLES ETUDIEES.**

	Famille El		Famille Se		Famille B		Famille R		Famille Si		Famille La		Famille De		Famille Ber		Famille Af	
Origine	Maroc		Tunisie		Algérie		Maroc		Tunisie		Espagnol		Israël		Maroc		Israël	
Génotype	p.Gly47Asp Hom		p.Gly47Asp Het		p.Gly47Asp /c.1037-7C>A		p.Gly47Asp Het		Gly47Asp /c.1037-7C>		Gly47Asp /p.Arg402Gln		p.Gly47Asp /p.Arg402Gln		Gly47Asp /c.1037-7C>		Gly47Asp /c.1037-7C>	
Haplotype																		
D11S1367	222	222	222	227	222	227	222	234	222	226	222	226	222	226	222	227	222	226
D11S870	152	152	152	146	152	152	152	156	152	152	152	152	152	156	152	156	152	150
PROM	286	286	286	284	286	305	286	295	286	305	286	286	286	284	286	286	286	286
Intron 2	165	165	165	165	165	157	165	159	165	157	161	143	161	143	161	153	161	153
Intron3	144	144	144	144	144	144	144	146	144	144	144	144	144	144	144	144	144	144
Intron4	146	146	146	150	146	146	146	146	146	146	146	144	146	141	146	146	146	146
AP1815(TA13)	139	139	139	139	139	165	139	139	139	139	139	139	139	162	139	165	139	165

## **I.d Base de Données clinicobiologiques**

Une des hypothèses de l'échec d'identification de mutations, est que le diagnostic d'albinisme oculocutané pourrait être remis en question notamment dans des formes non typiques. Ainsi afin d'évaluer le phénotype des patients de notre cohorte et d'étudier les corrélations génotype-phénotype, nous avons recueilli de façon systématique pour chaque patient des éléments cliniques dermatologiques et ophtalmologiques. Les données cliniques sont confrontées aux résultats de l'examen moléculaire de chaque patient.

### **I.d.1 Méthodologie et résultats préliminaires**

Les critères renseignés sont les suivants :

- l'âge à la description du patient, son origine géographique et la notion d'une consanguinité.
- les critères cliniques dermatologiques (couleur de la peau, couleur des cheveux à la naissance et à l'examen, présence de naevus, pigmenté ou non, présence de kératose actinique, tendance à pigmenter avec le temps)
- les critères cliniques ophtalmologiques (acuité visuelle, nystagmus, photophobie, transillumination irienne, hypoplasie fovéale, hypopigmentation irienne, résultats des PEV),
- la présence de signes associés (surdité, anomalies de la coagulation, déficit immunitaire).

Nous avons ainsi pu obtenir des données pour plus de 400 patients analysés dans le laboratoire et nous présentons ici des données préliminaires dont l'analyse sera affinée et précisée afin d'être publiée.

Les patients décrits sont caucasiens pour 91% d'entre eux. Concernant les patients avec un AOC2, 32/94 sont d'origine africaine (Cameroun : 5, Sénégal : 4, Congo : 3, Gambie : 2, Mali : 2, Angola : 1, Burkina faso : 1, Gabon : 1, Zaïre : 1, Soudan : 1, Mauritanie : 1, Guinée : 1) et 6 sont originaires d'Afrique du Nord.

Sur le plan clinique, les patients AOC1, AOC2, AOC3 et AOC4 présentent tous une atteinte ophtalmologique qui inclut un nystagmus, une baisse d'acuité visuelle, une hypopigmentation rétinienne. L'hypoplasie fovéolaire n'est pas un critère renseigné de façon systématique, bien que ce soit un élément important de diagnostic. La photophobie et la transillumination irienne sont des signes inconstants qui ne semblent pas corrélés à

l'intensité de l'hypopigmentation cutanéophanérikienne (Tableau IV et V). La couleur de l'iris est gris-bleu chez les patients avec un AOC1 et 4. Chez les patients avec un AOC2 et un AOC3, l'iris est gris bleu ou vert (Tableau VI). La photophobie est un signe retrouvé chez 96% des patients avec un AOC 4 (Tableau IV).

Parmi les résultats de l'analyse de ce recueil, certaines données confortent les impressions cliniques initiales. La fréquence de cheveux blanc-platine est de plus de 75% chez les patients AOC1, et de plus de 85% chez les patients AOC4. Elle est de 14% chez les patients AOC2 (Tableau VII). Les patients avec un AOC de type 2 ont des cheveux jaunes pour plus de 50% d'entre eux. 12% des patients avec un AOC2 présentent des cheveux brun clair et 14% des cheveux roux. La couleur des cheveux des patients avec un AOC3 est hétérogène (cheveux blond platine : 1, jaune : 2, roux : 2, brun clair : 2).

Parmi les 22 patients avec un diagnostic d'albinisme sans mutation identifiée dans les gènes d'AOC, le tableau clinique est variable. Ils sont principalement d'origine caucasienne (20), deux sont originaires du Moyen-Orient. La dépigmentation cutanéophanérikienne est variable : plus de 20% présentent des cheveux blanc-platine, 30% des cheveux blond-jaune et plus de 45% des cheveux brun-clair. Tous les patients ont une acuité visuelle réduite. 2 patients n'ont pas de nystagmus, mais 11 patients présentent une hypoplasie fovéolaire, 12 une transillumination irienne et 13 une hypopigmentation rétinienne. Le critère n'est pas renseigné pour les autres patients. Seuls 2 patients présentent un tableau classique associant une absence totale de pigment et une atteinte ophtalmologique sévère, comme observé chez les patients avec un AOC1.

**TABLEAU IV. REPARTITION DES SUJETS EN FONCTION DU GENE ET DE LA PHOTOPHOBIE**

<i>gène</i>	<i>photophobie</i>		<i>Total</i>
	<i>non</i>	<i>oui</i>	
<i>Fréquence</i>			
<i>% ligne</i>			
<i>% colonne</i>			
<i>TYR</i>	13	103	116
	11.21	88.79	
	44.83	50.99	
<i>TYRP1</i>	2	5	7
	28.57	71.43	
	6.90	2.48	
<i>OCA2</i>	11	50	61
	18.03	81.97	
	37.93	24.75	
<i>HPS1</i>	0	2	2
	0.00	100.00	
	0.00	0.99	
<i>MATP</i>	1	26	27
	3.70	96.30	
	3.45	12.87	
<i>aucune mutation</i>	2	13	15
	13.33	86.67	
	6.90	6.44	
<i>Total</i>	29	202	228
<i>Données manquantes = 173</i>			

**TABLEAU V. REPARTITION DES SUJETS EN FONCTION DU GENE ET LA TRANSILLUMINATION IRIENNE**

gène	Transillumination irienne		Total
	non	oui	
TYR	11	92	103
	10.68	89.32	
	55.00	49.46	
TYRP1	0	6	6
	0.00	100.00	
	0.00	3.23	
OCA2	7	49	56
	12.50	87.50	
	35.00	26.34	
HPS1	1	1	2
	50.00	50.00	
	5.00	0.54	
MATP	0	24	24
	0.00	100.00	
	0.00	12.90	
aucune mutation	1	11	12
	8.33	91.67	
	5.00	5.91	
Total	20	186	203
<i>Données manquantes = 198</i>			

**TABLEAU VI. REPARTITION DES SUJETS EN FONCTION DU GENE ET LA COULEUR DE L'IRIS**

gène	Couleur de l'iris			Total
	gris/bleu	vert	marron	
<i>TYR</i>	111	13	0	124
	89.52	10.48	0.00	
	49.78	30.23	.	
<i>TYRP1</i>	3	3	0	6
	50.00	50.00	0.00	
	1.35	6.98	.	
<i>OCA2</i>	60	17	0	77
	77.92	22.08	0.00	
	26.91	39.53	.	
<i>HPS1</i>	2	0	0	2
	100.00	0.00	0.00	
	0.90	0.00	.	
<i>MATP</i>	29	0	0	29
	100.00	0.00	0.00	
	13.00	0.00	.	
<i>aucune mutation</i>	14	10	0	24
	58.33	41.67	0.00	
	6.28	23.26	.	
<i>Total</i>	223	43	0	262

*Données manquantes= 138*

**TABLEAU VII. REPARTITION DES SUJETS EN FONCTION DU GENE ET DE LA COULEUR DES CHEVEUX A LA CONSULTATION**

<i>gène</i>	<i>Couleur des cheveux</i>				<i>Total</i>
	<i>Blanc Platine</i>	<i>Blond jaune</i>	<i>Roux</i>	<i>Brun clair</i>	
<i>TYR</i>	75 59.52 61.48	37 29.37 36.63	10 7.94 41.67	4 3.17 14.29	126
<i>TYRP1</i>	1 14.29 0.82	2 28.57 1.98	2 28.57 8.33	2 28.57 7.14	7
<i>OCA2</i>	14 17.07 11.48	46 56.10 45.54	12 14.63 50.00	10 12.20 35.71	82
<i>HPS1</i>	2 66.67 1.64	1 33.33 0.99	0 0.00 0.00	0 0.00 0.00	3
<i>MATP</i>	25 86.21 20.49	4 13.79 3.96	0 0.00 0.00	0 0.00 0.00	29
<i>aucune mutation</i>	5 20.83 4.10	8 33.33 7.92	0 0.00 0.00	11 45.83 39.29	24
<i>Total</i>	122	101	24	28	271

*Données Manquantes = 129*

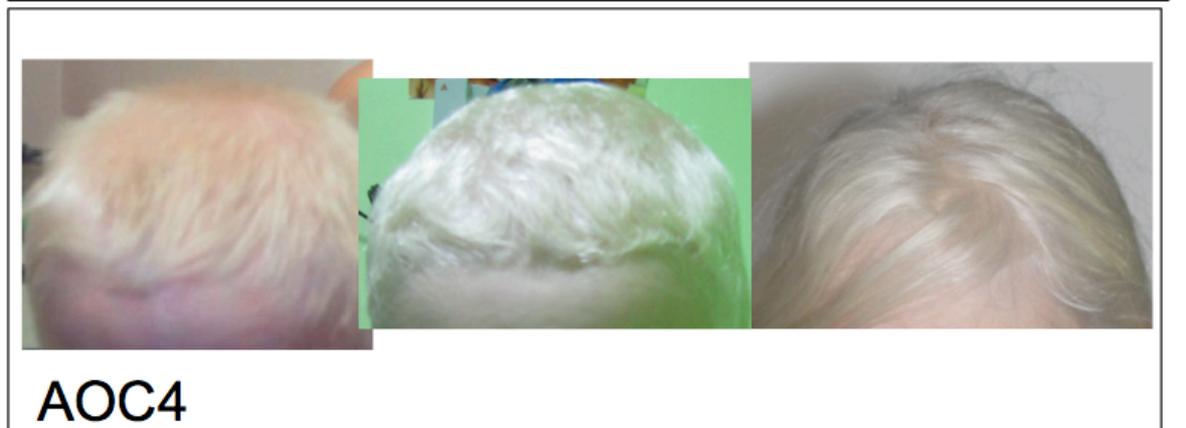
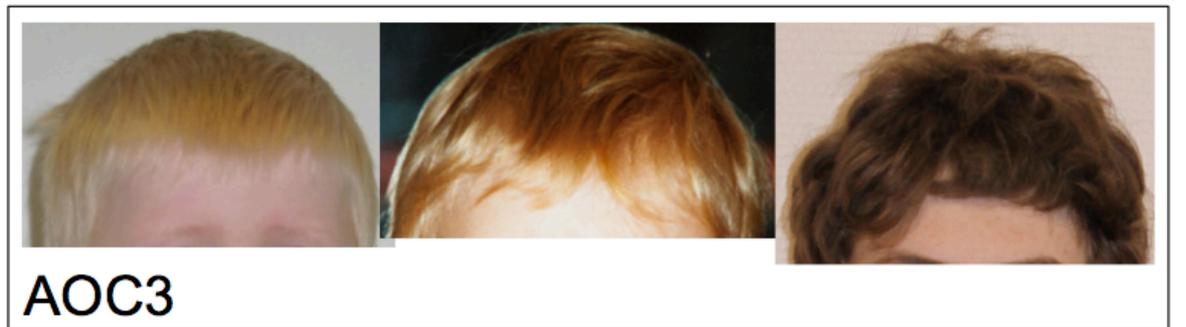
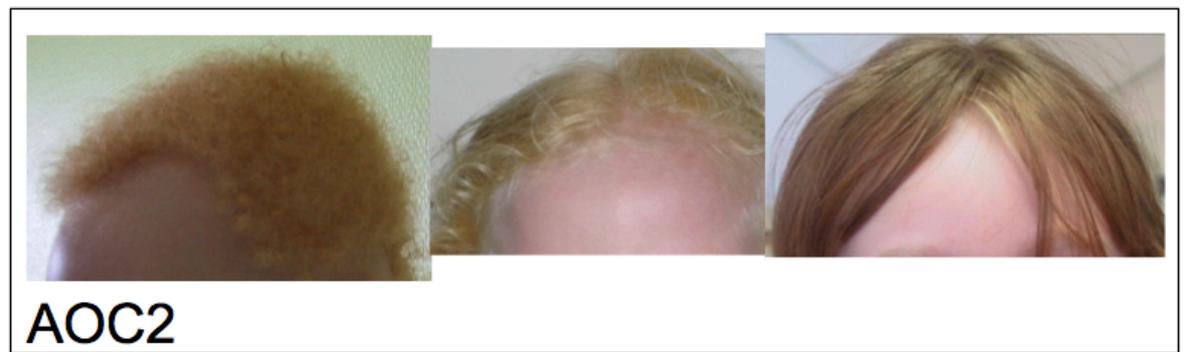
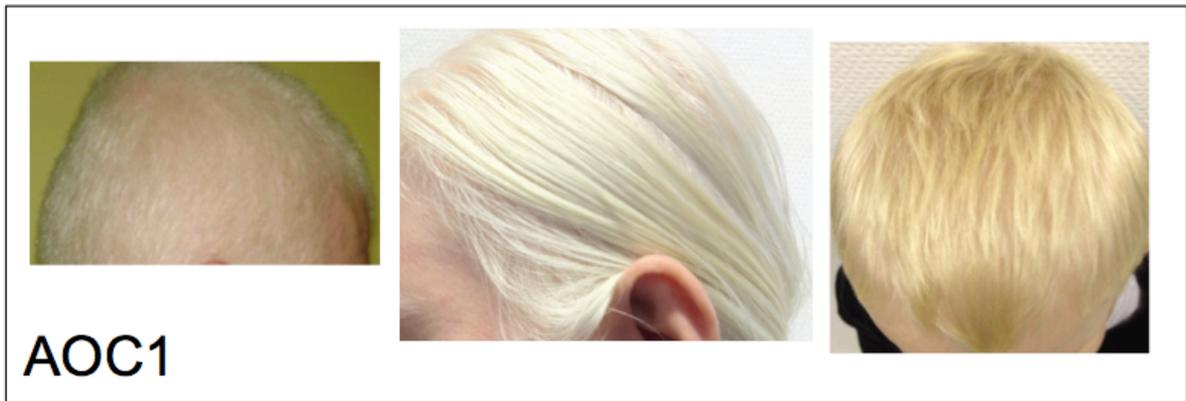


Figure 18. Différentes colorations de cheveux chez des patients présentant un AOC1, 2, 3 et 4.

## I.d.2. Discussion

L'analyse clinico-moléculaire de nos patients nous a apporté des données cliniques et épidémiologiques sur l'albinisme ainsi que des éléments de corrélations génotype-phénotype. Ces premiers résultats sont des données brutes qui sont à compléter par des analyses statistiques avant d'être publiées.

- L'AOC de type 1 est le plus fréquent chez les patients d'origine caucasienne. Il est généralement associé à un phénotype sévère. Les patients présentant une mutation délétère de *TYR* associée au variant thermosensible p.Arg402Gln (47/136) présentent un phénotype modéré où peuvent manquer certains aspects typiques comme l'hypoplasie fovéale, ou l'anomalie de décussation des voies optiques visible sur les Potentiels Evoqués Visuels. Des formes d'albinismes oculaires autosomiques récessifs ont été décrites chez des patients présentant une mutation délétère de *TYR* associée au variant R402Q (Hutton and Spritz, 2008a).
- L'AOC de type 2 est prévalent chez les patients d'origine africaine comme nous l'observons chez nos patients. La prévalence est variable selon les pays d'Afrique. Ainsi, chez les Ibo du Nigeria la prévalence décrite est de 1/1100 (Okoro, 1975), elle est de 1/3900 en Afrique du Sud (Kromberg et al., 1987), de 1/4182 au Zimbabwe, de 1/7900 chez les Bamiléké du Cameroun (Aquaron, 1990), de 1/10000 chez les Afro-Américains et de 1/100000 au Mali (Durham-Pierre et al., 1996). Les patients d'origine africaine avec un AOC2 présente un tableau clinique assez homogène d'un patient à l'autre. La délétion de 2,7 kb de l'exon 7 est prédominante chez ces patients jusqu'à 65% chez les patients du Cameroun. L'hypothèse d'un avantage sélectif lié à cette mutation a été émise, mais n'a pas été confirmée à ce jour. Chez les patients caucasiens, le phénotype d'AOC2 est variable. L'atteinte cutanée et phanérienne peut être très légère avec une hypopigmentation discrète voire absente et le tableau clinique peut être celui d'une forme autosomique récessive d'Albinisme oculaire (Mártinez-García and Montoliu, 2013).
- L'AOC de type 4 est fréquent au Japon (Inagaki et al., 2004; Suzuki and Tomita, 2008). Nous observons une fréquence plus élevée de mutations dans le gène *SLC45A2* que dans les autres séries (Gargiulo et al., 2011; Sengupta et al., 2007). Le phénotype des patients présentant des mutations de *SLC45A2* dans notre série est difficile à différencier de celui de patients présentant un AOC de type 1. La dépigmentation cutanéophanérienne est marquée avec une incapacité à pigmenter avec le temps (Figure 18).

- Initialement les mutations du gène *TYRP1* étaient décrites chez des patients d'origine africaine (Kromberg et al., 1990; Manga et al., 1997). Il est décrit comme albinisme roux. Les patients présentaient une coloration cutanée inhabituelle rougeâtre, des cheveux roux à rougeâtre, une faible sensibilité aux dommages actiniques, et une atteinte ophtalmologique modérée notamment sans l'anomalie de décussation des voies optiques classiquement observée chez les patients AOC. Nous avons décrit de nouvelles mutations dans ce gène chez des patients caucasiens. Les phénotypes de ces patients sont modérés. Les cheveux sont blonds à bruns clairs avec des reflets roux et une tendance à pigmenter (Figure 18). Sur le plan ophtalmologique, l'atteinte est classique même si le faible nombre de patients décrits et les données manquantes limitent l'interprétation des résultats.

## **I.e Analyse de nouveaux gènes**

### **- Analyse du gène *C10orf11* :**

Au cours de notre travail, Grønskov et al ont identifié une mutation non-sens homozygote dans le gène *C10orf11* chez des patients avec albinisme oculocutané autosomique récessif issus d'une grande famille consanguine des îles Féroé. L'étude d'une cohorte de patients albinos a mis en évidence une duplication homozygote de 1 bp dans *C10orf11* chez un patient lithuanien (Grønskov et al., 2013a). Des études fonctionnelles ont montré la localisation mélanocytaire de la protéine dans les mélanoblastes et les mélanocytes. L'étude d'un modèle knock-down de Zebrafish (*Dario rerio*) avec un homologue de *C10orf11* montre une réduction de la pigmentation et une réduction du nombre apparent de mélanocytes (Grønskov et al., 2013a).

Nous avons étudié ce gène dans notre cohorte de patients et n'avons pas identifié de mutation. L'implication de ce gène dans l'albinisme oculocutané semble très rare et pourrait être restreint à la population Féroé. Néanmoins nous prévoyons de poursuivre son analyse chez d'autres patients AOC.

### **-Analyse du gène *SLC24A5* :**

***Ce travail a fait l'objet d'une publication en premier auteur dans Journal of Investigative Dermatology.***

Dans la même année, Wei et al. ont mis en évidence deux mutations hétérozygotes composites dans le gène *SLC24A5* (c.591G>A et c.1361insT) par séquençage de l'exome chez un patient présentant une albinisme oculocutané non syndromique. Le gène *SLC24A5* est impliqué dans la maturation de mélanosomes. *SLC24A5* serait transporté dans les mélanosomes matures par l'intermédiaire des protéines du complexe HPS (Ginger et al., 2008). Il n'avait jusque là jamais été impliqué dans l'albinisme oculocutané chez l'homme. Cependant ce gène faisait figure de bon candidat. En effet, le modèle mutant Zebrafish golden associé à des mutations dans l'homologue *slc24a5* (*nckx5*) présente des anomalies mélanosomales (Lamason et al., 2005). La souris mutée *SLC24A5*<sup>-/-</sup> présente un tableau d'albinisme oculaire (Vogel et al., 2008) Des variants du gène *SLC24A5* sont associés à une coloration plus claire de la peau (Wilson et al., 2013). *SLC24A5* joue un rôle clé dans la pigmentation humaine (Lamason et al., 2005).

Nous avons analysé ce gène dans la cohorte de 22 patients non mutés et identifié des mutations chez 5 patients.

Nous décrivons les 5 patients index et 2 apparentés, qui présentent un albinisme oculocutané de sévérité variable. Tous les patients présentant une atteinte ophtalmologique avec un nystagmus, un déficit visuel, une hypopigmentation rétinienne et une hypoplasie fovéale. L'hypopigmentation cutanéophanéarienne est variable avec des cheveux de couleur blanc platine à châtain clair. La photosensibilité cutanée est marquée chez trois patients.

Les patients 060854, 070126 et 110299 étaient homozygotes pour les mutations c.590+4A>G, c.641delT /p.Leu214ArgfsX12 and c.546T>A/p.Ser182Arg, respectivement. Le frère atteint (131242) et le cousin (0710127) du patient 070126 était également homozygotes pour la mutation c.641delT /p.Leu214ArgfsX12. Le frère sain du patient était hétérozygote pour la mutation. Des mutations hétérozygotes composites étaient trouvées chez les patients 100404 (c.344C>A /p.Ala115Glu et c.989G>A/p.Trp330X) et 120233 (c.216T>A /p.Tyr72X et c.344C>A/p.Ala115Glu). Toutes les mutations identifiées étaient héritées de parents hétérozygotes et étaient absentes des banques de données de SNP (HapMap, 1000genomes). Les deux mutations faux-sens c.546T>A/p.Ser182Arg et c.344C>A/p.Ala115Glu étaient prédites pour être délétères par les logiciels de prédiction (Alamut software; Polyphen2). De plus, elles affectent des acides-aminés conservés.

Ainsi, nous avons montré que SLC24A5 était un gène responsable d'albinisme oculocutané non seulement chez les patients d'origine asiatique mais également chez les patients caucasiens et devait être analysé au cours du diagnostic moléculaire des patients avec AOC.

**TABLEAU VIII. PHENOTYPES ET MUTATIONS DE *SLC24A5* IDENTIFIEES CHEZ LES PATIENTS.**

Patients	060854	070126	131242	070127	100404	110299	120233	Patient (Wei et al)			
Age à l'examen (années)	16	20	16	23	1	4	19	3			
Sexe	M	M	M	M	F	M	F	M			
Clinics	Vannes	Toulouse	Toulouse	Toulouse	Angers	Ghent	Brussels				
Ethnic & Geographic origin	Caucasien	Caucasien Portugais	Caucasien Portugais	Caucasien Portugais	Caucasien	Caucasien Syrien	Caucasien	Asian			
consanguinité	Non	Yes	Yes	Yes	Non	Yes	Non	Non			
Couleur des cheveux	Blond	Brun clair	Brun clair	Brun clair	Blond Platine	Brun clair	Brun clair	Brun clair			
Couleur des yeux	Clair	Clair	Clair	Clair	Clair	Clair	Clair	Clair			
Tendance à pigmenter	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui			
Naevus	nd	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Oui	nd			
Baisse de l'acuité visuelle	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui			
Acuité visuellecourrigée	nd	0,30 RE/ 0,40 LE	0,25 RE/ 0,40 LE	0,40 RE/ 0,30 LE	0,125 RE/0,125 LE	0,15 RE/ 0,20 LE	0,20 RE/ 0,30 LE	0,20 RE/ 0,20 LE			
Nystagmus	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui			
Couleur de l'iris	Bleu	Vert	Vert	Vert	Bleu	Bleu	Vert	Brun			
Transillumination irienne	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui			
Hypoplasie Fovéale	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui			
Hypopigmentation Rétinienne	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui			
Perte d'audition	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	nd	nd			
Signes associés	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non			
Mutations	Hmz mutation	Hmz mutation	Hmz mutation	Hmz mutation	Mutation 1	Mutation 2	Hmz mutation	Mutation1	Mutation 2	Mutation1	Mutation 2
	c.590+4A>G	c.641delT	c.641delT	c.641delT	c.344C>A	c.989G>A	c.546T>A	c.216T>A	c.344C>A	c.591G>A	c.1361insT
AA nomenclature	p.?	p.Leu214ArgfsX12	p.Leu214ArgfsX12	p.Leu214ArgfsX12	p.Ala115Glu	p.Trp330X	p.Ser182Arg	p.Tyr72X	p.Ala115Glu	p.Trp197X	p.Cys46Leufx X43
Variant	Epissage	Tronquant	Tronquant	Tronquant	Faux-sens	Tronquant	Faux-sens	Tronquant	Faux-sens	Non-sens	Tronquant
Exon	5	6	6	6	2	7	5	2	2	5	9
Polyphen	/	/	/	/	Probably damaging	/	Probably damaging	/	Probably damaging	Probably damaging	/
Conservation	/	/	/	/	AA highly conserved	/	AA highly conserved	/	AA highly conserved	AA highly conserved	/
Frequency (%) Hapmap/1000genome	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

## I.f Conclusion

La répartition de la fréquence des mutations dans les gènes OCA1-4 dans notre cohorte est superposable à celles décrites par les autres auteurs (Grønskov et al., 2007a; Hutton and Spritz, 2008b; Wei et al., 2013b). D'autre part, la détection chez 5 patients de notre cohorte, de mutations dans *SLC24A5* conforte l'implication de ce gène dans l'albinisme oculocutané non syndromique, le papier princeps ne décrivant qu'un seul patient (Wei et al., 2013c). L'identification d'un nouveau locus en 4q24 associé à l'AOC5, puis de mutations dans les gènes *SLC24A5* impliqué dans l'AOC6 et *C10orf11* impliqué dans l'AOC7 confirme l'hétérogénéité génétique de l'albinisme oculocutané.

L'identification de nouveaux gènes d'AOC a fait évoluer la nomenclature.

***Cette nomenclature des nouveaux gènes ainsi que des différents types d'albinisme a fait l'objet d'une revue de consensus publiée dans Pigment Cell and Melanoma Research en septembre 2013, à laquelle nous avons participé ainsi que les laboratoires ayant mis en évidence ces nouveaux gènes.*** Dans cette revue, les différents types d'albinisme oculocutané isolés et syndromiques sont redéfinis (Montoliu et al., 2013).

Bien que l'analyse de notre base de données soit préliminaire, nous avons ainsi pu observer que malgré la grande hétérogénéité génétique de l'albinisme oculocutané, le phénotype est assez homogène sur le plan ophtalmologique : hypoplasie de la fovéa, transillumination irienne, photophobie, défaut de décussation des voies optiques, transillumination irienne et nystagmus (Grønskov et al., 2007b; Martínez-García and Montoliu, 2013; Summers, 2009).

D'autre part l'atteinte cutanée est hétérogène et varie selon les types d'AOC et pour une même forme d'AOC. Les corrélations génotype-phénotype sont rendues difficiles du fait de l'implication d'un nombre important de gènes dans la couleur des cheveux, des yeux et de la peau. L'hypopigmentation doit être considérée par rapport au phototype du reste de la famille et le diagnostic d'albinisme en premier lieu reposer sur la présence de l'atteinte visuelle et l'hypopigmentation cutanéophanéarienne pourrait être considérée comme un trait secondaire (Montoliu et al., 2013).

Les limites de cette base de données tiennent au fait que certaines données sont manquantes, en particulier celle de l'examen ophtalmologique quand les sujets sont examinés à un âge très jeune. D'autre part les patients ne sont pas examinés par la même personne. Il existe un certain degré de subjectivité dans l'analyse de l'hypopigmentation

cutané-phanérienne. Ainsi nous avons prévu de faire évoluer cette base de données et de l'améliorer en prenant en compte ses faiblesses :

- Ajout dans la fiche de renseignements cliniques d'un nuancier permettant de rendre plus objective l'évaluation de la dépigmentation cutané-phanérienne
- Réévaluation des signes cliniques chez les patients (évolution de la pigmentation, apparition de lésions actiniques, type de lésions, évolution de l'examen ophtalmologique, apparition de nouveaux signes) afin d'obtenir un suivi de la cohorte et des données évolutives et de réaliser des analyses longitudinales.
- Réévaluation des examens complémentaires ophtalmologiques nécessaires au diagnostic et au suivi des patients en collaboration avec l'équipe d'ophtalmologie du CHU de Bordeaux.
- Evaluation des habitudes d'exposition solaire et du statut en vitamine D.

L'absence de mutation chez des patients présentant un AOC avec une atteinte ophtalmologique classique nous conduit à poursuivre ce travail afin d'identifier d'autres mécanismes moléculaires et d'autres gènes responsables d'albinisme oculocutané.

**I.g Article : Molecular diagnosis of oculocutaneous albinism : new mutations in the OCA1-4 genes and practical aspects.**

Rooryck C, Morice-Picard F, Elçioğlu N H, Lacombe D, Taieb A,, Arveiler B. Pigment Cell Melanoma Res. 2008;21(5):583-587.

**I.h Article : Genetic basis of oculocutaneous albinism.**

Rooryck C, Morice-Picard F, Lacombe D, Taieb A,, Arveiler B. Exp Dermatol. 2009;4(6):611-622.

**I.i Article : SLC24A5 Mutations are Associated with Non-Syndromic Oculocutaneous Albinism.**

Morice-Picard F, Lasseaux E, François S, Simon D, Rooryck C, Bieth E, Colin E, Bonneau D, Journel H, Walraedt S, Leroy BP, Meire F, Lacombe D, Arveiler B. J Invest Dermatol. 2013 Aug 28. doi: 10.1038/jid.2013.360. [Epub ahead of print]

## II. Recherche de Remaniements dans les gènes d'Albinisme oculocutané

---

### II.a Données préalables

Malgré l'analyse complète des quatre gènes connus, environ 20% des patients restent à ce jour sans diagnostic moléculaire complet, soit parce qu'aucune mutation n'a été trouvée dans les quatre gènes cités précédemment (5%), soit parce qu'une seule mutation a été trouvée dans l'un de ces gènes, la seconde demeurant inconnue (15%). Une des hypothèses serait que les mutations ne sont pas détectées par les techniques classiques de diagnostic moléculaire. Il pourrait s'agir de réarrangements géniques introniques ou localisés dans les régions régulatrices.

Nous avons choisi d'utiliser la technique de CGH array, utilisée en routine par le laboratoire depuis plusieurs années pour l'analyse des remaniements pangénomiques dans le diagnostic des retards mentaux syndromiques et des syndromes polymalformatifs. Par ailleurs, notre laboratoire avait initialement utilisé la CGH-array avec une puce « à façon » pour rechercher de réarrangements dans le gène *CREBBP* en 16p13.3 (Stef et al., 2007). Les puces ciblées à haute résolution ont été utilisées par d'autres équipes pour des pathologies comme la Neurofibromatose de type 1 et ont montré leur fiabilité et leur intérêt (Pasmant et al., 2009).

La technique d'hybridation sur puces à ADN ou CGH-array (Comparative genomic hybridization) est une technique dérivée de l'hybridation génomique comparative, technique cytogénétique moins résolutive (5 à 10 Mb), permettant d'analyser les variations du nombre de copies dans l'ADN. Les préparations métaphasiques sont remplacées par des cibles d'ADN déposées sur lame de verre. Ces cibles peuvent être des clones génomiques de grande taille (BACs, PACs, cosmides), des produits de PCR (exons de gènes), soit des oligonucléotides pouvant être dérivé tout le long de la séquence du génome (Lockwood et al., 2006; Oostlander et al., 2004).

L'analyse des remaniements dans les gènes d'albinisme oculocutané a fait l'objet de 2 publications qui vont être présentées.

***Le premier article décrit des délétions et duplications du gène OCA2 chez 5 patients dont 3 d'origine polonaise présentant la même délétion associée à un haplotype commun. Ce papier a été publié dans Human Genetics en 2011.***

*Le second article est une revue de tous les réarrangements identifiés dans les 4 gènes d'AOC qui décrit de façon plus précise un remaniement complexe ayant conduit à des analyses complémentaires. Cet article est sous presse dans Pigment Cell and Melanoma Research .*

## **II.b Identification d'une délétion chez des patients d'origine polonaise**

L'analyse moléculaire du gène *OCA2* est réalisée par séquençage des 24 exons et QMF-PCR après l'analyse du gène *TYR* chez les patients caucasiens. Nous avons identifié chez 5 patients non apparentés, dont 3 d'origine polonaise des réarrangements intragéniques par QMF-PCR. Le phénotype des patients est présenté dans le tableau VIII.

Nous avons cherché à mieux caractériser ces réarrangements. Une puce haute résolution ciblant la région 15q a été développée afin d'analyser des délétions 15q11.3 chez les patients présentant un syndrome de Prader-Willi. La puce comporte 3067 sondes couvrant le gène *OCA2* avec une distance moyenne entre les sondes de 112 paires de bases le long des 344 kb couvrant le gène. Elle contient par ailleurs 38530 sondes contrôles réparties sur différentes régions du chromosome 15q, avec une densité variable selon les régions.

L'utilisation de cette puce nous a permis de déterminer avec précision la taille du réarrangement chez ces 5 patients.

L'analyse des patients 070606, 080816 et 090657 a montré que les délétions présentées par ces 3 patients étaient strictement identiques, d'une taille minimale de 183847 pb (chr15 :25793533..25977380 ; NCBI Build 36.1) et s'étendant des exons 3 à 20 (Figure 19a). Ces 3 patients avaient tous des origines polonaises. La délétion du patient 030857 s'étend sur 200059 pb (chr15 :25844831..26044890), elle inclut les exons 83 à 94 du gène *HERC2* et les exons 1 à 20 d'*OCA2* (Figure 19b). L'analyse du patient 080107 montre une duplication de 138988 pb (chr15 :25817360..25956348) à l'état homozygote présente chez ses 2 parents à l'état hétérozygote (Figure 19c). L'ensemble des réarrangements identifiés sont représentés dans la Figure 20.

**TABLEAU VIII. PHENOTYPE DES PATIENTS PRESENTANT DES REARRANGEMENTS D'OCA2.**

	Patient	Couleur de la peau	Couleur cheveux	Couleur de l'iris	Anomalies Ophthalmologiques	Acuité Visuelle	Origine Géographique	Mutations
<i>Délétions</i>	030857	Blanc	Blanc Platine	Bleu	Nystagmus Transillumination Irienne	<1/10 <1/10	Maroc	- <u>Délétion Hétérozygote HERC2 Intron 83 à OCA2 Intron 20</u> - Seconde mutation : <u>c.1001C&gt;T/p.Ala334Val</u>
	070606	Blanc	Blanc Pâle	Bleu	Nystagmus Strabisme Transillumination Irienne Hypopigmentation Rétinienne	1,4/10 1/10	Pologne	- <u>Délétion Homozygote exon 3 à 20 (Intron 2-2 Intron 20-3)</u>
	080816	Blanc Présence de naevi	Blanc, crème	Bleu	Nystagmus Torticolis oculaire Astigmatisme Hypermétropie Vision binoculaire Iris transillumination	2,4/10 2,2/10	Père : Français (Alsace) Mère : Polonaise	- <u>Délétion Hétérozygote exon 3 à 20 (Intron 2-2 Intron 20-3)</u> - Seconde mutation : <u>c.1952G&gt;A/p.Gly651Glu</u>
	090657	Blanc	Châtain Brun Clair	Gris	Nystagmus Strabisme Photophobie Transillumination Irienne Hypopigmentation Rétinienne Torticolis Oculaire Astigmatisme Hypermétropie	3/10 2,5/10	Français Polonais	- <u>Délétion Hétérozygote exon 3 à 20 (Intron 2-2 Intron 20-3)</u> - Seconde mutation : <u>non trouvée</u>
<i>Duplication</i>	080107	Blanc Présence de naevi	Blanc platine	Bleu	Nystagmus Photophobie Astigmatisme Vision Binoculaire	1-2/10 1-2/10	Français / Suédois	- <u>Duplication Homozygote exon 3 à 20 (Intron 2-3-Intron 20-2)</u>

L'étude des haplotypes des patients 070606, 080816 et 090657 présentant la même délétion a été réalisée en utilisant 14 marqueurs microsatellites au locus OCA2 dont 5 intragéniques. Cette analyse a montré que cette délétion était située sur le même haplotype suggérant un effet fondateur chez ces patients d'origine polonaise (Figure 21).

L'utilisation de cette CGH-array haute résolution a permis de borner précisément les remaniements. Nous avons ainsi pu amplifier par PCR et séquencer les points de cassure des délétions des 4 patients. Chez les 3 patients porteurs de la délétion des exons 3 à 20, nous avons pu montrer que les points de cassure étaient strictement identiques.

Les réarrangements génomiques sont favorisés par la présence de régions répétées, présents dans le génome humain. OCA2 est un gène très riche en régions répétées, en particulier des séquences Alu et des éléments L1 sont dispersées tout le long du gène. D'autre part des duplications segmentaires sont localisées dans l'intron 1 du gène OCA2 et dans la partie 3' du gène HERC2. Ces duplications segmentaires sont impliquées dans les recombinaisons alléliques non homologues (NAHR) et associées à la survenue de réarrangements récurrents (Zhang et al., 2009). Nous avons analysé les séquences de part et d'autre des points de cassure sans identifier d'homologie, rendant peu probable l'implication de ce mécanisme dans la survenue du réarrangement. En revanche ces points

de cassures sont entourés d'éléments répétés de type Alu et Line (Figure 22). La survenue de ces réarrangement s'explique le plus probablement par un mécanisme MMBIR (microhomology mediated replication dependant recombination) du fait de la présence de microhomologies au niveau de ces points de cassure (Hastings et al., 2009).

L'utilisation d'une puce très résolutive et de microsatellites intragéniques de *OCA2* nous a permis de caractériser précisément des réarrangements du gène *OCA2* et de mettre en évidence un effet fondateur. Nous avons décrit la première duplication du gène *OCA2*. L'utilisation de cette technique constitue une approche intéressante dans le diagnostic de l'AOC, les réarrangements du gène *OCA2* étant retrouvés chez près de 20% des patients AOC2 dans notre expérience.

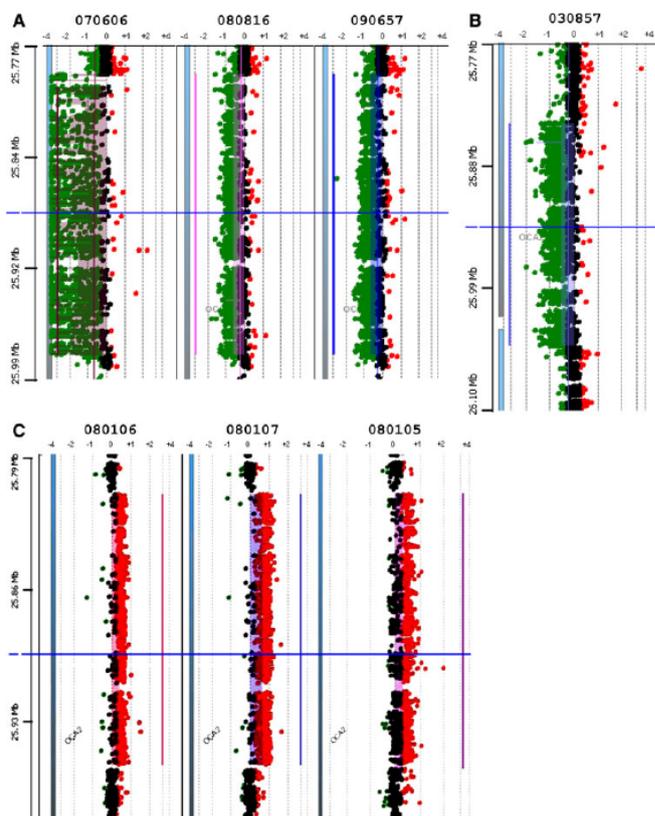


Figure 19. Analyse par CGH-array des réarrangements d'*OCA2*. Pour chaque patient ou groupe de patients, les coordonnées sont indiquées à gauche (NCBI Build 36.1/Hg18) et la valeur du Log2 ratio de fluorescence patient/témoin spnt indiqués au-dessus des points.

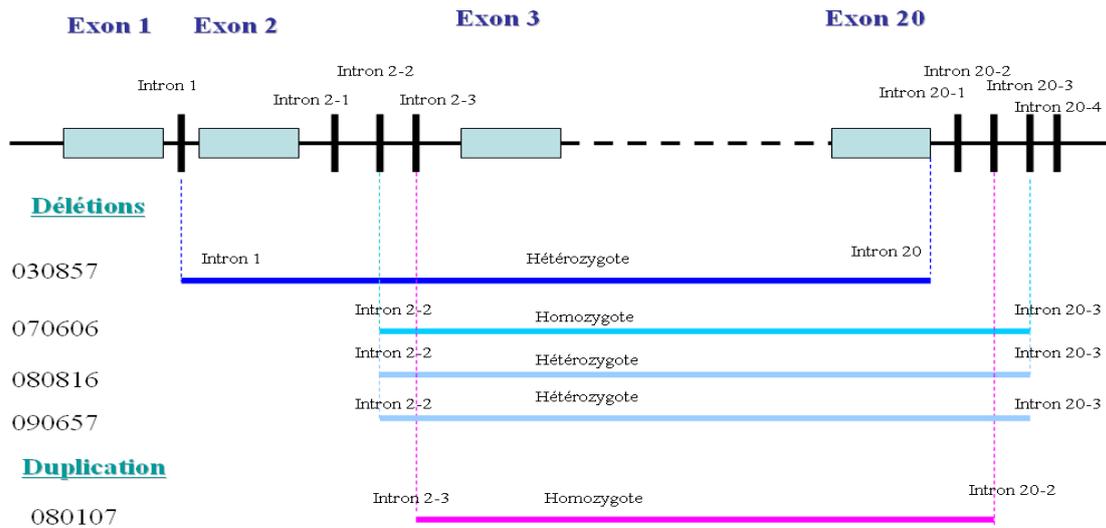


Figure 20. Représentation Schématique des 4 délétions chez les patients 030857, 070606, 080816 et 090657 et de la duplication chez le patient 080107 observées en CGH array.

	080816		070606		090657		030857		080107	
D15S1007	178	182	174	178	162	180	181	183	178	180
D15S1048	218	224	210	222	220	220	200	228	222	216
D15S815	116	116	116	120	116	120	116	112	96	116
D15S1019	210	210	210	210	210	215	217	210	224	210
OCA-I2	231	235	231	231	231	235	del	233	235	235
OCA-I17	del	150	del	del	del	160	del	156	156	150
OCA-I20	del	185	del	del	del	200	185	203	185	201
OCA-I22	155	155	155	155	155	155	/	/	155	155
OCA-I24	148	144	148	148	148	162	145	145	158	164
D15S217	189	189	189	189	189	185	189	161	161	177
D15S156	221	234	221	221	221	235	220	234	232	234
D15S219	169	167	167	167	167	177	175	169	177	167
D15S1002	101	113	114	114	113	115	101	112	101	116
D15S986	178	183	183	193	181	183	183	179	183	193

Figure 21. Analyse des haplotypes chez les 5 patients. Les allèles sont indiqués par la taille du produit de PCR en paires de bases. *del* allèle délété. Le surlignage gris indique l'haplotype commun aux patients 080816, 070606, 090657.



## II.c Recherche de réarrangements des gènes d'AOC

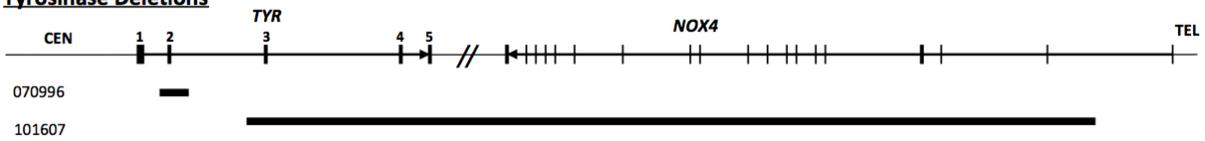
Les résultats précis obtenus avec l'utilisation de la puce 15q nous ont conduits à développer cette technique pour l'identification de réarrangements dans les six gènes d'albinisme étudiés actuellement dans le cadre du diagnostic hospitalier, en particulier chez les patients pour lesquels aucune ou une seule mutation n'a été identifiée par les techniques classiques.

Ainsi nous avons mis au point une puce haute-résolution couvrant les gènes *OCA1-4* (*TYR*, *OCA2*, *TYRP1*, *SLC45A2*) *GPR143* et *HPS1*. Les sondes ont été choisies dans le catalogue e-array d'Agilent Technologies (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>) en utilisant un filtre permettant de sélectionner de sondes hautement spécifiques. La puce présente une densité de 1 sonde tous les 100 pb en moyenne au niveau des exons et des introns des gènes *TYR*, *OCA2*, *TYRP1*, *SLC45A2*, *GPR143* et *HPS1*, et une densité de 1 sonde toutes les 350 pb en moyenne 0,5 Mb de part et d'autre de chaque gène. Les coordonnées des nucléotides sont données selon la version Hg19 du génome de référence (NCBI Build 37.1/hg19) (University of California in Santa Cruz, UCSC Genome Browser <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Une région servant de contrôle localisée sur un segment chromosomique sans CNV (copy number variant) a été déterminée en utilisant la base de données Database of Genomic variants <http://projects.tcag.ca/variation/>) et incluse dans la puce: chr15 = 59950000-60450000 (5000 sondes, densité moyenne 1 sonde tous les 100 bp). La puce contient également 2118 sondes dispersées sur le génome humain incluses de façon systématique sur les microarrays designées pour les études en CGH array par Agilent Technologies. Le design utilisé est un format 4x44K (Agilent Technologies).

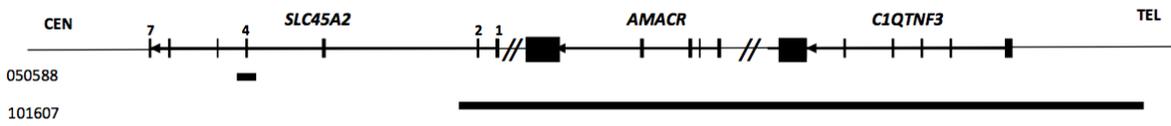
Nous avons analysé 108 patients et ainsi montré que 10% des mutations trouvées dans les 4 gènes d'albinisme oculo-cutané étaient des délétions ou des duplications.

De nouvelles délétions et duplications dans les gènes *TYR*, *OCA2*, *SLC45A2* ont été mises en évidence (Figure 23). Certaines de ces anomalies n'avaient jamais été décrites dans la littérature. Certaines délétions sont limitées à un seul exon (patients 070996, 050588, 111675, 091265, 120524). Nous avons identifié une nouvelle délétion dans le gène *SLC45A2* et une nouvelle délétion de *TYR*. Aucun réarrangement incluant *TYRP1* n'a été caractérisé. Les résultats sont regroupés dans la figure 23.

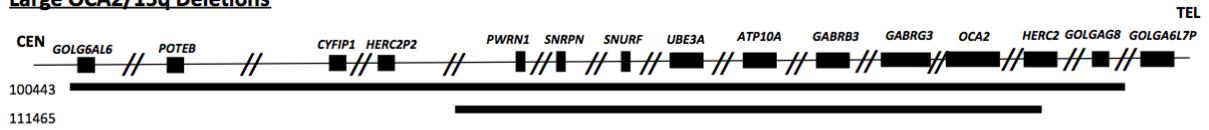
**Tyrosinase Deletions**



**SLC45A2 Deletions**



**Large OCA2/15q Deletions**



**OCA2 Deletions and Duplication**

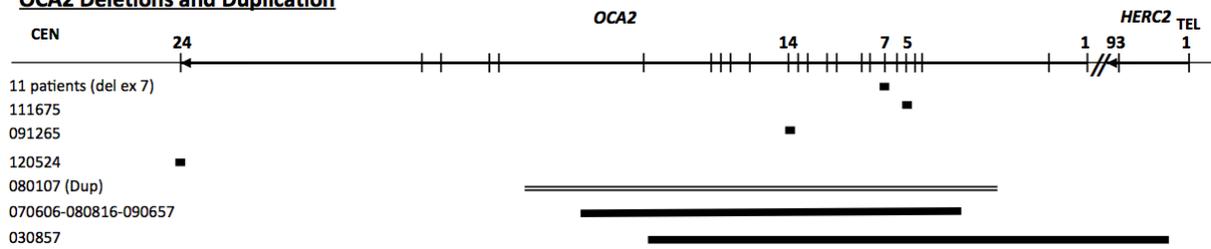


Figure 23. Représentation schématique des réarrangements identifiés dans les gènes OCA2, TYR et SLC45A2.

Chez 2 patients (101227 et 102007), un remaniement comportant deux délétions purement introniques (intron 2 et intron 19) de 19.7 kb et 16.9 kb respectivement, a été identifié, laissant suggérer un remaniement complexe sous-jacent (Figure 24). D'autre part les coordonnées 5' de la délétion de l'intron 2 et 3' de la délétion de l'intron 19 étaient les mêmes que les coordonnées de la délétion polonaise précédemment décrite (Figure 24).

L'analyse de ce remaniement a débuté par le séquençage des points de cassures. Nous avons dérivé des couples d'amorces de part et d'autre des délétions dans les introns 2 et 19 afin d'amplifier des fragments contenant les points de cassure avec différentes combinaisons de couples d'amorces. Un fragment avec une amorce sens située dans l'intron 2 (I2-F) et une amorce antisens située dans l'intron 19 (I-19R) a pu être amplifié et séquencé (Figure 24). Ceci a clairement indiqué l'existence de la délétion de 184 kb déjà mise en évidence chez les patients polonais, avec des points de cassure strictement identiques.

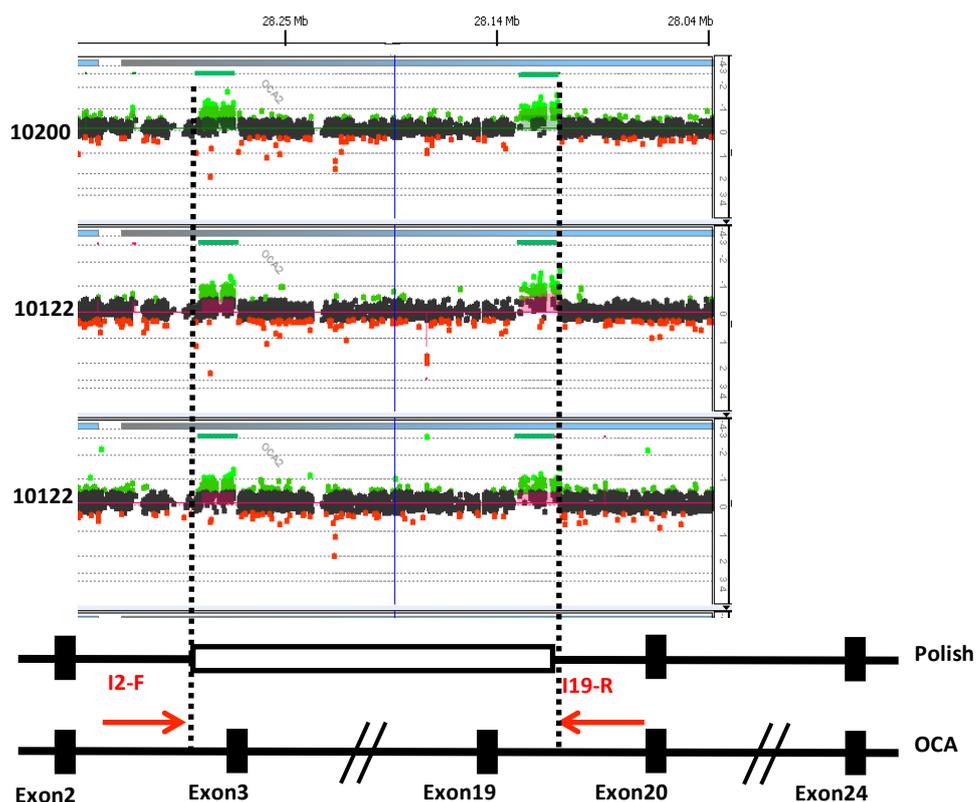


Figure 24. Vue en CGH array de la région comportant le gène *OCA2*. Représentation schématique du gène *OCA2*, des amorces utilisées pour séquencer le point de cassure et de la délétion polonaise (rectangle gris).

Contrairement à ce qui était observé chez les patients polonais, la CGH array ne met pas en évidence d'anomalie de la région allant de l'intron 2 à l'intron 19, ce qui indique que le fragment est présent mais s'est réinséré ailleurs dans le génome.

Ainsi nous avons recherché où était réinséré le fragment comportant les exons 3 à 20 du gène. Une analyse par FISH (Fluorescent In situ Hybridization) en utilisant une sonde télomérique du chromosome 15 et une sonde couvrant la région d'intérêt RP11-322N14 (exon 3 à 20 du gène *OCA2*) n'a pas mis en évidence d'anomalie de signal indiquant l'absence d'insertion interchromosomique. Puis l'analyse par FISH en utilisant des sondes situées de part et d'autre du réarrangement (RP11-570N16 et RP11-408F10) et la sonde couvrant la région d'intérêt n'a pas mis en évidence d'anomalie de signal indiquant l'absence de remaniement intrachromosomique. Au total, cet analyse nous indique que le fragment délété est bien présent, qu'il est réinséré dans le chromosome 15 à l'intérieur ou très proche du gène *OCA2*, la résolution de la technique étant insuffisante pour être plus précis (Figure 25).

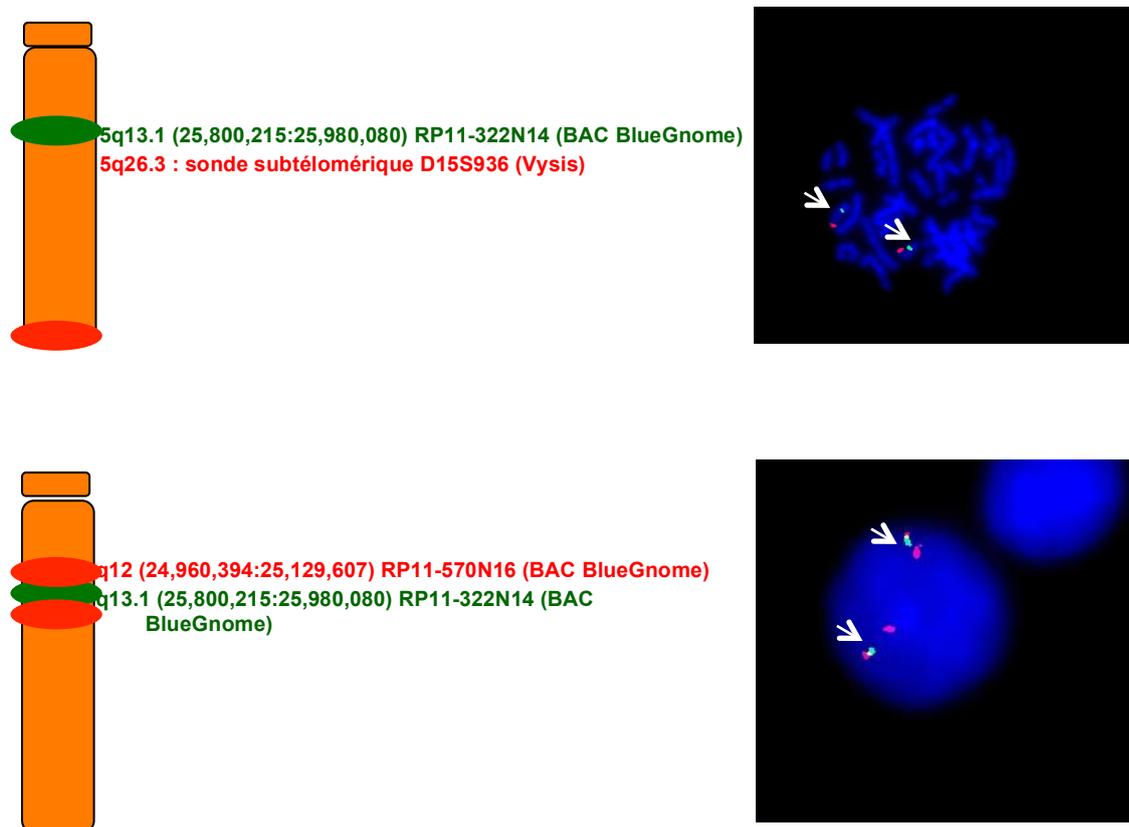
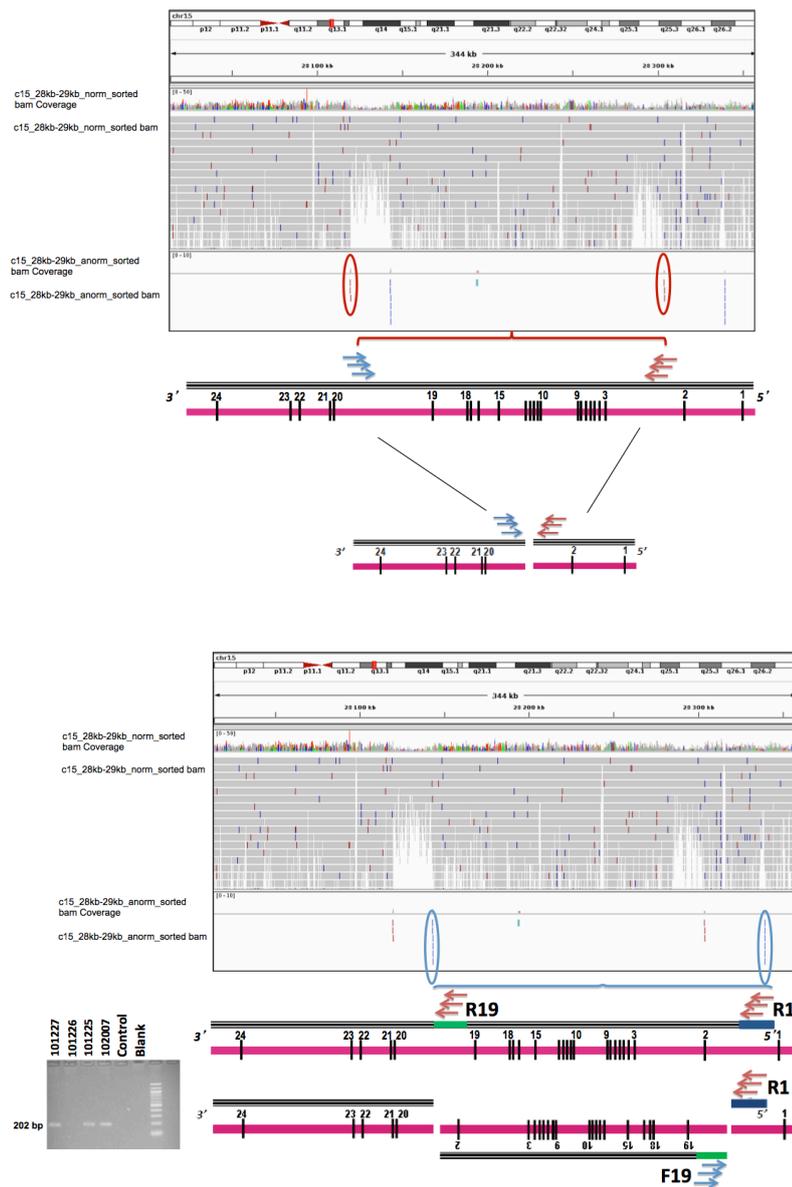


Figure 25. Analyse par FISH réalisée sur les chromosomes en métaphase du patient (en haut) 101227 utilisant la sonde RP11-322N14 15q13.1 (BAC BlueGnome) couvrant les exons 3 à 19 d'*OCA2* (signal vert indiqué par une flèche) et une sonde subtélomérique D15S936 15q26.3 (Vysis). Analyse par FISH du patient (en haut) 101227 utilisant la sonde RP11-322N14 15q13.1 (BAC BlueGnome) (signal vert indiqué par une flèche) et deux sondes encadrant la région d'intérêt (RP11-570N16 et RP11-408F10).

Afin de déterminer la nature de ce réarrangement, un séquençage du génome par paired-end-sequencing avec faible couverture (12X) a été réalisé chez le patient 101227 suivi par une analyse bioinformatique à la recherche de paires anormales de séquences. Cette analyse a été sous-traitée à la société Integragen (Evry).

Cette analyse a permis de retrouver la délétion de 184kb de coordonnées chr15:28119720 et chr15:28303906 (hg19) grâce à l'identification de trois paires indépendantes de séquences générées à partir d'amorces Forward (F) et Reverse (R) (Figure 25).

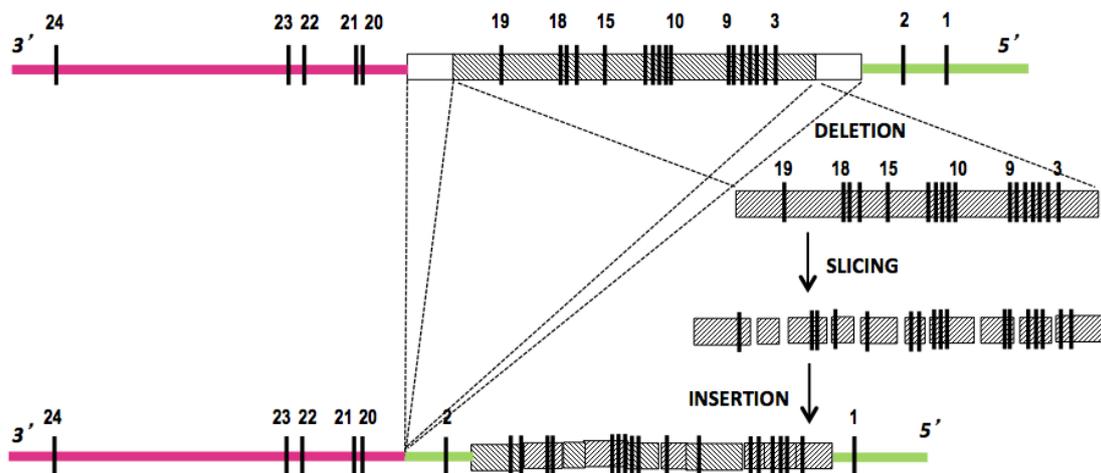
Un deuxième réarrangement a été révélé par un fragment de type RR identifié par six paires indépendantes de séquences de coordonnées chr15:28143315 et chr15:28339464 (hg19). La coordonnée chr15:28143315 (designée R19 dans la Figure 26) est localisée dans l'intron 19 et correspond à la fin centromérique du fragment intron2-intron19 réinséré. La coordonnée chr15:28339464 (R1 dans la Figure 26) est localisée dans l'intron 1, suggérant ainsi que le segment délété s'est réinséré dans l'intron 1 du gène *OCA2* lui-même. Nous avons pu amplifier ce fragment R-R en utilisant les amorces F19 et R1 chez le patient et sa mère (Figure 26). Le séquençage de ce fragment de 202 pb a montré que 158 pb étaient situées dans l'intron 1 et 44 pb dans l'intron 19 du gène *OCA2*. La présence d'un fragment RR indique la survenue d'un phénomène d'inversion-insertion. Nous n'avons noté aucun fragment anormal de type F-F, indiquant que l'inversion-insertion n'est pas simple mais est associée à un mécanisme complexe.



**Figure 26. Analyse des données du séquençage haut-débit réalisé chez le patient 101227.** Visualisation des alignements des séquences sur le logiciel IGV (alignement des fichiers.bam de séquence sur la séquence de référence). La fenêtre du haut montre l'alignement des séquences normales sur la région d'intérêt. Les 2 délétions hétérozygotes dans les introns 2 et 19 visualisées en CGHarray apparaissent avec une perte de couverture d'environ 50%. Les paires de séquences anormales sont présentées dans la fenêtre du bas. Les paires de séquences anormales FR sont entourées en rouge et les paires de séquences anormales RR sont entourées en bleu. Les couples d'amorces utilisés pour confirmer les points de cassure sont indiqués (R19-R1).

Afin de poursuivre la caractérisation du réarrangement complexe, un assemblage *de novo* a été réalisé en utilisant un logiciel spécifique (Velvet software) permettant de retrouver la séquence du gène *OCA2* chez le patient. Cet assemblage montre une séquence complètement remaniée du gène *OCA2*, avec de multiples fragments délétés et réinsérés et inversés et réinsérés indiquant la grande complexité du réarrangement. La faible couverture du séquençage ne nous a cependant pas permis de retrouver précisément l'ordre des différents fragments et de reconstituer la séquence complète du gène *OCA2* remanié.

Ces données nous indiquent au total que le fragment intron 2 - intron 19 a été inséré dans l'intron 1 du gène *OCA2* lui-même et a subi un remaniement complexe comme schématisé dans la Figure 27.



**Figure 27. Représentation simplifiée du réarrangement complexe.** Le haut de la figure montre la séquence du gène *OCA2* avec le réarrangement. Les rectangles blancs dans les introns 2 et 19 représentent les délétions et le rectangle hachuré le fragment réinséré. Le fragment est découpé en plus petits fragments et réinsérés de façon désordonnée dans l'intron 1. L'ordre et l'orientation exacte des fragments n'a pas pu être déterminée.

## II.d Identification d'un remaniement impliquant *GPR143*

Nous avons analysé avec la puce à façon contenant les 6 gènes, dont *GPR143* un patient présentant un albinisme oculaire associé à une hypopigmentation cutanéophanérienne marquée par comparaison avec le phototype parental.

Ce patient était né au terme d'une grossesse normale. Il présentait depuis la naissance une absence de fixation du regard qui l'amenait à consulter en ophtalmogénétique. A l'âge d'1 mois était apparu un nystagmus rapide et horizontal qui a disparu ultérieurement. Il ne semblait pas exister de photophobie franche. L'étude de la réfraction était en faveur d'une hypermétropie forte. L'examen du segment antérieur de l'œil mettait en évidence un certain degré d'hypotrophie irienne avec une transillumination discrète et la présence d'un embryotoxon postérieur bilatéral. L'examen du fond d'œil montrait un aspect très peu pigmenté de l'ensemble de la rétine. Une discrète hétérogénéité de l'épithélium pigmentaire en périphérie était observée à l'examen pratiqué chez la mère et la sœur du patient. Le reste de l'examen clinique montrait une peau claire et des cheveux blonds contrastant avec le phototype des parents et de la fratrie (Figure 28a). Ce tableau clinique associé aux données de l'anamnèse faisait suspecter un albinisme oculaire lié à l'X. Par ailleurs, la présence d'un embryotoxon postérieur pouvant également faire évoquer un syndrome de Rieger, affection autosomique dominante d'expressivité variable, nécessitant la recherche de signes extra-oculaires comme des anomalies dentaires.

L'analyse avec la puce haute-résolution a montré une délétion incluant *GPR143* et *SHROOM2* (Figure 27a). Cette délétion d'une taille minimale de 78.8kb (chrX:9713310-9792147) emporte les exons 1 à 5 de *GPR143* et le premier exon de *SHROOM2* (Figure 28b). Le gène *OA1* est impliqué dans l'albinisme oculaire et n'est pas associé à un phénotype cutané particulier. De façon intéressante le gène *SHROOM2* code une protéine de la famille Shroom, impliquée dans le contrôle du cytosquelette d'actine. Il a été montré un rôle de *SHROOM2* dans la biogenèse du mélanosome et dans la localisation de la mélanine dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (Fairbank et al., 2006). Cette délétion pourrait est à l'origine d'un syndrome de gènes contigus, l'albinisme oculaire étant lié à la délétion de *GPR143* et la dépigmentation cutanéophanérienne à l'absence de *SHROOM2*. Le gène *SHROOM2* n'a jamais été impliqué dans des pathologies chez l'homme et des études fonctionnelles complémentaires seraient intéressantes afin de mettre en évidence le défaut de pigmentation.



Figure 28. (a) Dépigmentation des cheveux chez un patient présentant une délétion de *OA1* et *SHROOM2*. (b) Vue centrée sur la région déléetée Xp22.3 en CGH array incluant les exons 1 à 5 de *OA1* et l'exon 1 de *SHROOM2*.

## II.V Discussion

Nous avons analysé plus de 400 patients et montré que les délétions ou duplications représentent environ 6 % des mutations. Concernant le gène *OCA2*, les délétions représentent 14% des anomalies identifiées. Aucun réarrangement n'a été identifié dans *TYRP1*. Cette proportion importante de réarrangements justifie leur recherche de façon systématique sur le plan du diagnostic moléculaire.

Les patients avec AOC porteurs de délétions présentent un phénotype d'albinisme typique en rapport avec le gène muté. Les délétions sont généralement associées à une perte de fonction importante de la protéine et la sévérité du tableau clinique est conditionnée par la nature du variant présent en trans. Le patient 070996 porteur d'une délétion de l'exon 2 de *TYR* et le variant thermosensible p.Arg402Gln, présente une atteinte ophtalmologique modérée sans hypoplasie fovéale. Les patients présentant un syndrome de Prader-Willi ou Angelman ont généralement une hypopigmentation qui pourrait être expliquée par la présence d'un variant non-pathogène hypofonctionnel à l'état hémizyote.

Cette puce custom a été développée avant la découverte des nouveaux gènes d'AOC *C10orf11* et *SLC24A5* dans l'AOC (Grønskov et al., 2013b; Wei et al., 2013a).

La puce Custom permet non seulement de détecter les anomalies exoniques mais également les anomalies introniques et les séquences flanquantes de part et d'autre de chaque gène pouvant contenir les régions régulatrices. Nous n'avons pas, dans cette étude, identifié de réarrangement dans les séquences régulatrices, bien que ces éléments aient déjà été impliqué dans la pathogenèse d'autres affections génétiques (Benko et al., 2011; Bondurand et al., 2012). Des régions contrôles (Locus control regions (LCRs)) ont été décrites de façon précise 15 kb et 9 kb en amont du site d'initiation de la transcription du gène *TYR* (Regales et al., 2003; Yamamoto et al., 1992). L'analyse complète de ces LCRs ainsi que celle du promoteur situé 2 kb en amont de l'exon 1 n'a pas mis en évidence de réarrangement limité à ces éléments régulateurs.

Le réarrangement complexe identifié chez les patients 101227 et 102007 est d'un intérêt particulier. La CGH array nous a permis de mettre en évidence une perte de matériel génomique dans les introns 2 et 19 du gène *OCA2*. Ces anomalies n'avaient pas été identifiées par les techniques de QMF-PCR et PCR séquençage (Rooryck et al., 2008b). Les points de cassure dans les introns 2 et 19 étaient localisées exactement au niveau des mêmes positions que précédemment observé chez trois patients d'origine polonaise (Rooryck et al., 2011). Nous avons finalement montré que les patients 101227 et 102007 étaient en fait porteurs de la délétion "polonaise" et qu'une partie du fragment délété (ie fin de l'intron 2 jusqu'au début de l'intron 19; coordonnées 28119895 to 28303853) était

réinséré dans l'intron 1 du gène *OCA2*. Ce réarrangement complexe désorganise le gène *OCA2*.

Nous avons montré que le réarrangement était associé chez les 2 patients au même haplotype que la délétion "polonaise". Nos patients n'avaient cependant pas d'origine polonaise connue.

Ce réarrangement complexe chez les patients 101227 et 102007 pourrait correspondre à un évènement primitif sur un chromosome ancestral et le segment réinséré aurait été secondairement perdu du fait d'une instabilité structurale, conduisant ainsi à la délétion isolée identifiée chez les trois patients polonais. Une autre possibilité est que les 2 évènements soient survenus de façon indépendante sur un chromosome ancestral du fait de la structure du gène comportant de nombreuses séquences répétées favorisant les recombinaisons. Ce mécanisme a déjà été rapporté au niveau du locus *MAPT* en 17q, au niveau duquel un haplotype spécifique étant associé à une structure génomique particulière favorise les délétions (Koolen et al., 2006; Shaw-Smith et al., 2006).

La description d'un réarrangement complexe du gène *OCA2* met en évidence le fait que la CGH-array (locus spécifique ou whole-genome) pourrait manquer des délétions, le fragment délété pouvant être réinséré ailleurs dans le gène ou dans le génome et donc être présent en double copies. L'identification au niveau du même locus de petites délétions séparées par un fragment ou plusieurs fragments présents en double copies doit donc faire penser à la possibilité d'un réarrangement complexe au niveau de ce locus.

**II.e Article: High resolution mapping of *OCA2* intragenic rearrangements and identification of a founder effect associated with a deletion in Polish albino patients.**

Rooryck C, Morice-Picard F, Lasseaux E, Cailley D, Dollfus H, Defoort-Dhellemme S, Duban-Bedu B, De Ravel T JL, Taïeb A, Lacombe D, Arveiler A. *Human Genet.* 2011;129(2):199-208.

**II.f Article: High resolution array-CGH in patients with oculocutaneous albinism identifies new deletions of the *TYR*, *OCA2* and *SLC45A2* genes, and a complex rearrangement of the *OCA2* gene.**

Morice-Picard F, Lasseaux E, Cailley D, Rouault A, Toutain J, Plaisant C, Simon D, François S, Gilbert-Dussartier B, Kaplan J, Rooryck C, Lacombe D, Arveiler B.. *Pigment Cell Melanoma Res.* (accepted September 2013).

## **III. Recherche de nouveaux gènes impliqués dans l'albinisme oculocutané.**

---

### **III.a Introduction**

Le développement des outils diagnostiques comme la CGH-array haute résolution nous a permis d'améliorer la détection des mutations et de confirmer le diagnostic au niveau moléculaire chez certains patients (délétion complexe). Cependant, des patients restent sans diagnostic moléculaire et le grand nombre de gènes impliqués dans la pigmentation conforte l'hypothèse de l'existence d'autres gènes dans l'albinisme oculocutané. Dans le cadre de notre travail nous avons développé des stratégies de recherche de nouveaux gènes avec l'utilisation de la cartographie par homozygotie dans des familles consanguines et le séquençage d'exome chez des patients avec albinisme oculocutané sans diagnostic moléculaire.

### **III.b La cartographie par homozygotie**

Présentation :

De nouvelles approches peuvent être utilisées afin de rechercher de nouveaux gènes. La cartographie par homozygotie (Homozygosity mapping) constitue une approche efficace pour identifier de nouveaux loci de maladies autosomiques récessives. Elle revient à rechercher, chez des patients issus d'unions consanguines, des régions génomiques homozygotes. Depuis sa description il y a plus de 20 ans (Lander and Botstein, 1987), cette approche a été utilisée avec succès pour localiser puis identifier les gènes en cause dans des maladies autosomiques récessives (voir les références suivantes pour quelques exemples : Stoetzel et al., 2007 ; Molinari et al., 2008 ; Cossée et al., 2009 ; Muller et al, 2010). Sa puissance tient au fait que l'analyse d'un nombre restreint de patients issus d'unions consanguines permet d'identifier un nouveau locus.

La découverte des SNPs (single nucleotide polymorphisms) et l'établissement d'une carte d'haplotypes du génome humain grâce au projet HapMap dans les dernières années, associée à la technologie de génotypage à grande échelle des SNPs à l'aide de puces à ADN (SNP-arrays) a facilité la mise en œuvre de cette technique. Ce travail a été fait en collaboration avec l'équipe du Pr. Jean-Louis Mandel (Institut de Génétique et Biologie

Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg). Les puces utilisées comportaient 250000 SNPs (puces 250K Affymetrix), soit 1 SNP tous les 12 kilobases en moyenne le long du génome.

Neuf patients issus d'unions consanguines ou possiblement consanguines ont été analysés. Deux patients étaient des frères et sœurs atteints d'albinisme oculocutané, pour lesquels nous disposions également des deux parents. Les 7 autres cas étaient isolés. Les résultats obtenus chez les 9 patients ont été analysés pour rechercher toutes les régions du génome présentant une homozygotie. Les gènes de chacune de ces régions ont été examinés à la recherche de potentiels gènes candidats. Nous avons également recherché spécifiquement des homozygoties au niveau de 39 gènes connus pour être impliqués dans les différentes formes d'albinisme (syndromique ou non) ou dans la pigmentation. Nous avons également comparé les résultats obtenus chez les 9 patients afin de rechercher des régions d'homozygotie communes.

Principaux résultats :

- Quatre patients ont montré une homozygotie au locus *HPS1* (syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 1) ; aucun de ces patients n'était décrit comme possiblement atteint d'HPS1 ; le séquençage du gène a permis d'identifier une mutation homozygote d'*HPS1* chez un des patients, mais pas chez les 3 autres.
- Deux patients ont montré une homozygotie au locus *SLC24A5*. L'homologue de ce gène est muté chez le modèle poisson Zèbre golden (Lamason et al., 2005) et chez la souris (Vogel et al., 2008) qui présente un tableau d'albinisme oculaire. Ce gène code une protéine canal échangeuse d'ions Sodium-Calcium qui influence la pigmentation par un mécanisme faisant intervenir l'homéostasie des stéroïdes (Wilson et al., 2013). Nous n'avons pas identifié de mutation chez ces deux patients.
- Trois patients ont montré une homozygotie au locus *CNO*. Ce gène est muté dans le modèle murin de syndrome d'Hermansky-Pudlak *cappuccino* (Ciciotte et al., 2003). *CNO* est une des huit sous-unités du complexe BLOC1 dont trois sont mutées dans différents types de syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 1 (dysbindin dans HPS7, BLOC1S3 dans HPS8, pallidin dans HPS9). Les exons de *CNO* ont été séquencés chez les trois patients. Aucune mutation n'a été mise en évidence.
- Au sein des autres régions communes à plusieurs patients, aucun nouveau gène faisant figure de candidat fort n'a été mis en évidence.

L'absence de familles multiplexes (familles comportant plus d'un patient atteint) constituait un inconvénient diminuant la puissance de l'analyse au cours de cette étude. Cette technique a permis le diagnostic d'HPS1 chez un patient. Ceci a montré, même s'il

ne s'agit pas d'un gène nouveau, l'intérêt et la pertinence de l'approche par cartographie d'homozygotie chez des patients atteints de maladie autosomique récessive issus d'union consanguine. Par ailleurs l'identification de *HPS1* chez ce patient non diagnostiqué initialement comme atteint de syndrome d'Hermansky-Pudlak indique fortement l'intérêt d'étudier ce gène, et par extension les autres gènes HPS, voire l'ensemble des gènes impliqués dans les formes syndromiques d'albinisme, en complément des gènes OCA1-4 et OA1.

### III.c Le séquençage d'exome

Présentation :

Les nouvelles technologies de séquençage à très haut débit permettent aujourd'hui de séquencer chez des patients l'ensemble des exons (environ 180000) des gènes codants pour des protéines, ainsi qu'environ un millier de gènes de petits ARN non codants (Bentley, 2006; Pettersson et al., 2009). Ceci permet de rechercher des mutations dans des gènes nouveaux sans *a priori*. Cette approche a été utilisée avec succès dans un nombre croissant de maladies comme les maladies osseuses constitutionnelles avec l'ostéogenèse imparfaite et la mise en évidence de mutations de *SERPINF1* et *WNT1* (Becker et al., 2011; Pyott et al., 2013). Le séquençage d'exome a permis d'identifier des mutations dans des formes non syndromiques de retard mental exome (Robinson, 2010). Il a permis d'élucider les bases génétiques de syndromes géniques rares comme le syndrome de Kabuki (Ng et al., 2010). Le bon rapport coût efficacité de la technique en fait une technique de choix actuellement pour l'identification de nouveaux gènes.

L'exome de six patients a été séquençé. Il s'agit de patients non apparentés chez lesquels, pour 5 d'entre eux aucune mutation dans les gènes OCA1-4 n'a été identifiée, et pour 1 d'entre eux, une seule mutation du gène TYR (OCA1) a été mise en évidence. Pour ces 6 patients, l'ADN était disponible en qualité et en quantité suffisante.

Ce travail a été sous-traité à la société de service Integragen (Evry). La librairie est réalisée selon les instructions et le protocole du fournisseur (NEBNext® DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina®, NEW ENGLAND BIOLABS®). 3 µg de chaque ADN génomique ont été fragmentés par sonication aux ultrasons en fragments d'une centaine de paires de base environ. L'ADN fragmenté est réparé aux extrémités afin d'ajouter par ligation deux adaptateurs différents. Pour capturer des régions génomiques d'intérêt, en utilisant la capture en solution, l'objectif est de mélanger des oligonucléotides (sondes) synthétiques à

un échantillon d'ADN génomique fragmenté. Les sondes, (ARN biotinyllées de 120pb) s'hybrident sélectivement aux régions génomiques d'intérêt, après quoi, les complexes ADN génomique/sonde peuvent être capturés grâce à des billes magnétiques couplées à de la streptavidine. Elles sont ensuite lavées pour éliminer les ADN hybridés de manière non spécifique. Les fragments d'ADN sont élués puis séquencés sur un appareil Illumina HISEQ 2000. L'analyse bioinformatique des données de séquence est basée sur le pipeline d'Illumina (CASAVA1.8.2). CASAVA réalise l'alignement des séquences sur le génome de référence (hg19). L'algorithme d'alignement utilisé est ELANDv2, qui réalise des alignements multi-seed avec GAP. Les lectures de séquences reads avec plus de 6 mésappariements et les doublons de PCR sont exclus.

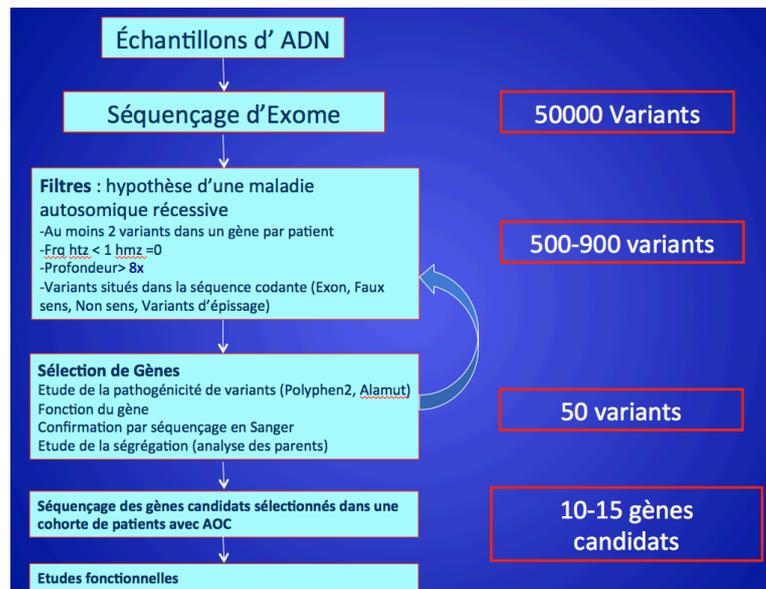
De l'ordre de 47000 variants sont identifiés chez chacun des patients.

Nous appliquons une série de filtres afin de restreindre le nombre de variants d'intérêt méritant d'être retenus. Des filtres stringents ont été appliqués dans un premier temps afin de réduire au maximum le nombre de variants candidats. Les filtres pourront être relâchés dans un second temps si aucun gène candidat n'est identifié. Ces filtres sont les suivants :

- L'hypothèse étant dans un premier temps que la maladie est récessive, seuls les gènes avec une mutation homozygote ou deux mutations hétérozygotes composites ont été retenus ; l'hypothèse de gènes localisés sur le chromosome X est également conservée pour les patients de sexe masculin.
- Dans un premier temps, nous n'avons retenu que les variants localisés dans les régions codantes des gènes ;
- Absence d'individus homozygotes dans des banques de données d'individus contrôles (non atteints de maladies génétiques, dont l'albinisme)
- Les variants déjà identifiés comme des polymorphismes dans les banques de données ont été écartés (dbSNP, 1000 Genomes Project et Exome Variation Sequence).
- Ne sont gardés que les variants qualifiés de pathogènes par des programmes de prédiction de pathogénicité (Alamut Software ; Polyphen2 ; SIFT).

Quand un gène candidat a été sélectionné, la présence des variants identifiés chez le patient est vérifiée par séquençage Sanger. L'analyse a été réalisée chez les parents quand ils sont disponibles afin de vérifier la ségrégation en *trans* des variants.

Les gènes sont séquencés dans une cohorte de patients.



**Figure 29. Description de la démarche d'analyse des données de séquençage d'exome chez les patients avec un AOC.**

#### Principaux Résultats :

Nous avons sélectionné 6 patients présentant un tableau d'albinisme oculocutané avec un nystagmus, une hypopigmentation rétinienne et une hypoplasie fovéale ainsi qu'une dépigmentation cutané-phanérienne. L'exome de ces 6 patients a été séquençé. Un des patients, 060675, présentait une mutation à l'état hétérozygote dans *TYR*. Les 5 autres patients n'avaient aucune mutation identifiée après analyse de *TYR*, *OCA2*, *TYRP1* et *SLC45A2*.

L'analyse de l'exome chez ces patients non apparentés nous a conduits à retenir des gènes candidats. Après croisement des résultats chez les 6 patients, nous avons observé que pour 18 gènes deux mutations sont trouvées chez au moins deux patients. Chez chacun des 6 patients, nous regardons également de façon ciblée l'ensemble des gènes connus pour être impliqués dans les différentes formes d'albinisme, et des gènes de pigmentation connus.

Nous avons pu retrouver la mutation hétérozygote déjà identifiée dans *TYR* chez le patient 060675. Aucune autre mutation n'a été mise en évidence dans ce gène chez ce patient par séquençage de l'exome, indiquant que ce patient n'est probablement pas atteint d'AOC1, et que la cause est à rechercher dans un autre gène. L'analyse des données de l'exome chez le patient 060675 a montré 2 variants dans le gène *GRIN2A*. Le premier variant est responsable d'un faux-sens c.810C>G/p.Asp166Glu. Ce premier variant est prédit comme probablement pathogène par les logiciels de prédiction (Polyphen ; SIFT). Il affecte

un acide-aminé conservé et est situé dans un domaine fonctionnel important de la protéine. Ce variant est rare et n'a jamais été décrit à l'état homozygote chez des individus contrôles. Le second variant c.1498-4C>G affecte l'épissage. Il n'a jamais été décrit à l'état hétérozygote ni homozygote dans les bases de données. Chacun des parents est porteur d'un des variants à l'état hétérozygote.

Aucun des 4 autres patients n'est porteur de mutation de *GRIN2A*.

Le gène *GRIN2A* code une protéine impliquée dans le métabolisme du glutamate. Il s'agit de la sous-unité  $\epsilon$ -1 d'un récepteur ionotropique au Glutamate (N-méthyl-D-aspartic acid, NMDA). Des mutations de ce gène ont été identifiées dans des anomalies neurodéveloppementales telles que des déficits intellectuels isolés, certaines formes d'autisme ou des épilepsies mais de façon intéressante récemment dans des mélanomes (Endele et al., 2010; Wei et al., 2013a). Le lien entre anomalies de signalisation de la voie du glutamate et mélanome n'est pas élucidée mais constituerait une piste intéressante dans la compréhension et le traitement du mélanome (Wangari-Talbot and Chen, 2012).

L'analyse de ce gène chez 22 patients supplémentaires ne nous a pas permis d'identifier de mutation.

L'analyse des données de l'exome du patient 091801 a mis en évidence la présence de 2 variants dans le gène *HPS1*. Un des variants p.Phe72ProfsX51 entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré et d'une protéine tronquée. L'autre variant est une mutation affectant l'épissage c.1744-2A>C. Les mutations affectant l'épissage peuvent permettre la production d'une protéine résiduelle, ce qui pourrait expliquer que le phénotype d'Hermansky-Pudlak soit modéré et passé inaperçu. Le diagnostic de syndrome d'Hermansky-Pudlak a conduit à rechercher des anomalies plaquettaires chez ce patient.

L'analyse des données de l'exome chez le patient 100446 montre 2 variants dans le gène *SLC7A13*. Le premier variant c.988C>T/p.Leu330Phe a une fréquence à l'état hétérozygote à 2% dans la population contrôle. Il est décrit comme probablement pathogène par les logiciels de prédiction. Le second variant est un faux-sens c.1172C>A/p.Pro390His, de fréquence à l'état hétérozygote à 0,02% dans la population contrôle. Ces deux variants concernent des nucléotides et des acides-aminés conservés et sont situés dans des domaines fonctionnels importants de la protéine.

Le gène *SLC7A13* code une protéine canal échangeuse d'ions. Elle serait exprimée au niveau de la rétine dans les cellules de Müller et a été impliquée dans le transport du glutamate. Elle intervient dans le maintien de l'homéostasie de l'excitabilité des cellules rétinienne (Sarchy et al., 2005). Le modèle murin *sut* (subtle gray) résulte de mutations dans

l'homologue murin du gène *SLC7A11*, codant une protéine membranaire impliquée dans le transport cystine/glutamate (Chintala et al., 2005).

Nous avons analysé ce gène chez 22 patients AOC et nous n'avons pas identifié de mutation.

L'analyse chez ce patient 100346 montre également deux variants dans le gène *NUDT14*. Les deux variants sont situés dans l'exon 3. Ils n'ont jamais été décrits dans les bases de données à l'état homozygote et sont prédits comme probablement pathogènes par les bases de données. Le gène *NUDT14* code une UDP-glucose pyrophosphatase, impliquée dans la glycosylation des protéines (Heyen et al., 2009). Ce gène pourrait être un bon candidat car les processus de glycosylation sont importants dans la mélanogenèse et en particulier dans la maturation de protéine comme la Tyrosinase. Ce gène n'a pas encore été étudié chez d'autres patients.

Chez le patient 070757, deux variants dans le gène *TRPM1* ont été identifiés. Il s'agit d'un variant faux-sens dans l'exon 17 et d'un autre faux-sens dans l'exon 27.

Le gène *TRPM1* code une protéine canal ionique (transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1). Des mutations de ce gène ont été identifiées chez des patients présentant une forme récessive de cécité nocturne congénitale (CNC) de transmission autosomique récessive (Audo et al., 2009; van Genderen et al., 2009). Un nystagmus ou une amblyopie accompagne parfois les autres signes. L'évolution est généralement stationnaire. L'acuité visuelle corrigée est modérément réduite et une myopie modérée à sévère peut être présente. L'électrorétinogramme montre l'absence de dépolarisation à la stimulation lumineuse (onde b) et les études physiologiques complètes montrent la dysfonction de la dépolarisation des cellules bipolaires ON activatrices, caractérisée par la présence de récepteurs métabotropiques du Glutamate couplés à une protéine G (mGLUR6) situées dans la couche nucléaire interne de la rétine (Nakamura et al., 2010). *TRPM1* initialement décrit comme melastatin, a également été impliqué dans la différenciation mélanocytaire terminale et la perte d'expression de *TRPM1* a été identifiée comme un marqueur diagnostique et pronostique du mélanome cutané primitif (Prawitt et al., 2000). *TRPM1* joue un rôle fondamental dans la physiologie mélanocytaire et dans le développement du mélanome (Guo et al., 2012). Des variants de *TRPM1* comme ceux de *EDNRB*, *KIT*, *MITF* et *PAX3* sont connus pour causer des phénotypes « white spotting » chez les chevaux, qui peut aller de marques blanches communes à une robe complètement blanche (Hauswirth et al., 2013). Les patients présentant une cécité nocturne et des mutations de *TRPM1* n'ont pas d'anomalie pigmentaire identifiée.

L'analyse de 22 patients n'a pas permis d'identifier de mutation de ces gènes. Nous avons choisi d'utiliser pour l'analyse de la cohorte de patients, le séquençage nouvelle-génération. Nous disposons sur notre plateau technique d'un séquenceur moyen-débit (PGM Ion Torrent, Life Technologies). Il est ainsi possible d'analyser plusieurs gènes de façon simultanée en multiplexant les couples d'amorces. Nous avons dérivé des amorces à l'aide du logiciel Ampliseq Designer développé par Life technologies, permettant l'analyse de 6 gènes candidats dont *SLC24A5* et *C10orf11* décrit précédemment et 4 gènes candidats identifiés après l'analyse de l'exome.

Patient	Gène	Variant 1	Htz/Hmz	Polyphen	SIFT	Variant 2	Htz/Hmz	Polyphen	SIFT	ségrégation
060675	GRIN2A	c.810C>G/p.Asp166Glu	0/0	PRB D	D	c.1498-4C>G	0/0	nd	nd	trans
091801	HPS1	p.Phe72ProfsX51	0/0	PRB D	nd	c.1744-2A>C	0/0	nd	nd	trans
100146	SLC7A13	c.988C>T/p.Leu330Phe	2%/0	PRB D	D	c.1172C>A/p.Pro391His	0,1%/0	PRB D	D	trans
100146	NUDT14	p.Arg52Trp	0/0	PRB D		p.Leu46Ile	0/0	PRB D		nd
071257	TMEM132a	p.Gly235Trp	0/0	PRB D	/	p.Arg278Gln	0/0	PRB D	/	cis
071257	GOLGA3	p.Tyr186Met	0/0	PRB D	/	p.Ile1044Tyr	0/0	PRB D	/	cis
071257	TRPM1	p.Ala695Pro	0,02%/0	PRB D	D	p.Ser1250Ala	0,03%/C	B	D	trans
090122	GPR113	p.Arg574Trp	0/0	PRB D	nd	p.Arg837X	0/0	PRB D	nd	nd
090122	C10orf71	p.Arg35Trp	0/0	PRB D	nd	p.Asp45Gly	0/0	PRB D	nd	nd

**TABLEAU IX. PRINCIPAUX GENES CANDIDATS ISSUS DE L'ANALYSE D'EXOME DE 5 PATIENTS. ABBREVIATIONS :HTZ :**

FREQUENCE DE L'ALLELE HETEROZYGOTE, HMZ : FREQUENCE DE L'ALLELE A L'ETAT HOMOZYGOTE, PRB D: PROBABLEMENT DELETERE ; D: DELETERE ; ND : NON DETERMINE. EN GRIS LES GENES ELIMINES DU FAIT DE L'ABSENCE DE SEGREGATION EN TRANS, VERIFIEE AVEC L'ANALYSE DES PARENTS. EN ROUGE, LES GENES DONT L'IMPLICATION DANS LE TABLEAU D'AOC EST CONFIRME.

### III.d Conclusion

L'albinisme oculo-cutané est hétérogène sur le plan génétique. Plus de 400 gènes sont impliqués dans la pigmentation et seuls 4% d'entre eux sont associés à l'albinisme (Montoliu et al., 2013). Récemment des mutations de *C10orf11* ont été décrites dans l'AOC de type 7 (Grønskov et al., 2013b). La fonction de ce gène qui semble impliqué dans la différenciation mélanocytaire n'était pas élucidée avant cette description. L'identification de mutations de *SLC24A5* chez 6 patients de notre cohorte conforte l'implication de ce gène dans l'AOC de type 6.

Ainsi même si les mutations dans les gènes connus d'AOC peuvent avoir été manquées en raison de techniques insuffisantes ou parce que ces mutations siègent dans des régions non explorées telles que les régions régulatrices, l'existence d'autres gènes impliqués dans l'AOC est très probable. L'identification de nouveaux gènes pourrait mettre en évidence de nouveaux mécanismes physiopathologiques induisant un phénotype de dépigmentation et permettre de mieux comprendre la mélanogenèse et les mécanismes qui la régulent.

L'identification de variants dans les gènes *GRIN2A* et *TRPM1*, tous deux impliqués dans la voie du glutamate pourrait constituer une piste intéressante. En effet des mutations de *GRIN2A* ont été retrouvées dans des mélanomes (Wei et al., 2011). La protéine TRPM1, initialement décrite comme mélastatine, est également associée à la mélanomagenèse mais semble jouer un rôle dans la pigmentation (Devi et al., 2013; Guo et al., 2012). Des récepteurs du Glutamate sont localisés sur les mélanocytes. Leur activation par le glutamate sécrété par les kératinocytes adjacents favorise la formation des dendrites mélanocytaires. L'expression de *MITF* serait également stimulée par l'activation des récepteurs au Glutamate (Hoogduijn et al., 2006). Le lien entre pigmentation et glutamate n'est pas élucidé.

L'identification de mutations de *GRIN2A* et de *TRPM1* chez d'autres patients avec AOC et la réalisation d'études fonctionnelles sont nécessaires pour confirmer le lien entre ces gènes et le phénotype des patients. D'autre part cette voie pourrait constituer une piste intéressante dans la compréhension de la mélanogenèse et également une cible thérapeutique pour le traitement du mélanome et l'atteinte visuelle chez les patients AOC.

## **IV. Etude d'un remaniement impliquant les gènes *OCA2* et *HERC2* chez un patient présentant un syndrome neurologique**

---

### **IV.a Contexte**

Nous avons présenté l'utilisation de la CGH array haute-résolution dans le cadre du diagnostic moléculaire chez les patients présentant un albinisme oculocutané. Nous avons ainsi pu caractériser de façon rapide et précise des remaniements intra-géniques dans les gènes *TYR*, *OCA2*, *SLC45A2* et *GPR143*. La puce haute résolution que nous avons mise au point permet l'analyse des gènes et de 0,5 Mb de part et d'autre, ce qui permet de caractériser des réarrangements s'étendant jusqu'aux gènes adjacents. Nous avons décrit plus haut une délétion hétérozygote impliquant les gènes *TYR* et *NOX4* adjacent, une délétion comprenant *SLC45A2*, *AMACR* et *C1QTNF3*, et une délétion hétérozygote impliquant *OCA2* et les 10 derniers exons de *HERC2*.

La puce haute résolution nous a également permis de révéler une délétion homozygote impliquant les gènes *HERC2* et *OCA2* chez un patient présentant un phénotype complexe associant un albinisme oculocutané, un tableau neurologique sévère comportant hypotonie, hypertonie périphérique et encéphalopathie convulsivante et des anomalies cardiaques.

*Ce travail fait l'objet d'une publication en préparation.*

### **IV.b Cas clinique**

Le cas index est un nouveau-né de sexe masculin. Il s'agit du quatrième enfant d'un couple de parents cousins germains, d'origine mauritanienne. Les trois premiers enfants du couple sont sains. La mère avait dans ses antécédents une fausse-couche tardive à 28 semaines d'aménorrhée, d'étiologie inconnue. L'histoire familiale révèle le décès précoce d'un frère et une sœur de la mère présentant un albinisme associé à une affection inconnue. Concernant le patient, les échographies anténatales avaient mis en évidence des anomalies cérébelleuses. A la naissance, le patient avait des mensurations standards et présentait à la naissance une hypopigmentation homogène de la peau et des cheveux faisant évoquer un albinisme oculocutané. L'examen ophtalmologique montrait une dépigmentation rétinienne modérée au fond d'œil. A 4 mois, un retard des acquisitions associé à des difficultés alimentaires était noté. L'échographie cardiaque révélait un canal artériel perméable, une dilatation du cœur gauche et une hypertension artérielle pulmonaire associés à un tableau

d'insuffisance cardiaque. L'examen neurologique montrait une hypotonie axiale, une hypertonie périphérique associée à des signes extrapyramidaux et à des mouvements désordonnés. L'IRM cérébrale montrait une hypoplasie cérébelleuse déjà identifiée en anténatal associée à une polymicrogyrie et à une hypoplasie du corps calleux. A l'âge de 14 mois, les difficultés alimentaires imposaient une gastrostomie. Les infections pulmonaires récurrentes ont nécessité des hospitalisations itératives en soins intensifs. Le patient est décédé à l'âge de 2 ans au décours d'une décompensation respiratoire. Le caryotype était normal (46XY).

Un diagnostic d'albinisme oculocutané était suggéré. Le tableau clinique associé ne ressemblait pas aux anomalies observées dans les différentes formes d'albinisme syndromiques. Nous avons évoqué un syndrome de gènes contigus transmis de façon récessive dans un contexte de consanguinité.

#### **IV.c Principaux résultats**

L'analyse de ce patient par CGH-array haute-résolution a identifié une délétion de 286 kb à l'état homozygote emportant les exons 1 à 12 d'*OCA2* et les exons 56 à 94 du gène *HERC2*. La haute-résolution de la CGH-array utilisée nous a permis de borner précisément la délétion (chr15:28429725.. 28142054) et de séquencer les points de cassure.

Cette délétion homozygote est selon toute vraisemblance responsable du phénotype d'AOC en rapport avec la délétion du gène *OCA2* et du tableau sévère neurodéveloppemental en rapport avec la probable perte de fonction d'*HERC2*. Aucune pathologie humaine n'ayant été associée à ce gène codant une protéine E3-ubiquitine ligase au moment de l'identification du remaniement, nous avons essayé de comprendre les conséquences fonctionnelles de cette anomalie génétique.

Le réarrangement prédit la production d'un transcrite de fusion *HERC2-OCA2* qui serait traduit en une protéine tronquée de *HERC2*. Nous avons extrait l'ARN des fibroblastes de patient et étudié la transcription du gène *HERC2* en utilisant des couples d'amorces situés dans la région non délétée (*HERC2-1F* et *HERC2-1R*) et délétée (*HERC2-2F* et *HERC2-2R*) et en utilisant un couple d'amorces à cheval sur les transcrit *HERC2* et *OCA2*, l'amorce F est située dans l'exon 55 d'*HERC2* et l'amorce R est située dans l'exon 23 d'*OCA2* (*HERC2-OCA2-55F* et *HERC2-OCA2-55R*). Le transcrite de fusion *HERC2-OCA2* est identifié et caractérisé par RT-PCR et séquençage (Figure 31).

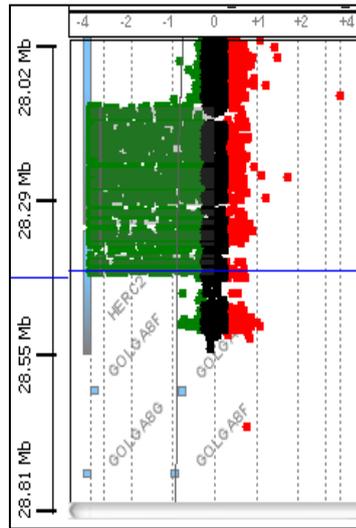


Figure 30. Vue de la délétion homozygote de 286 kb en CGH array.

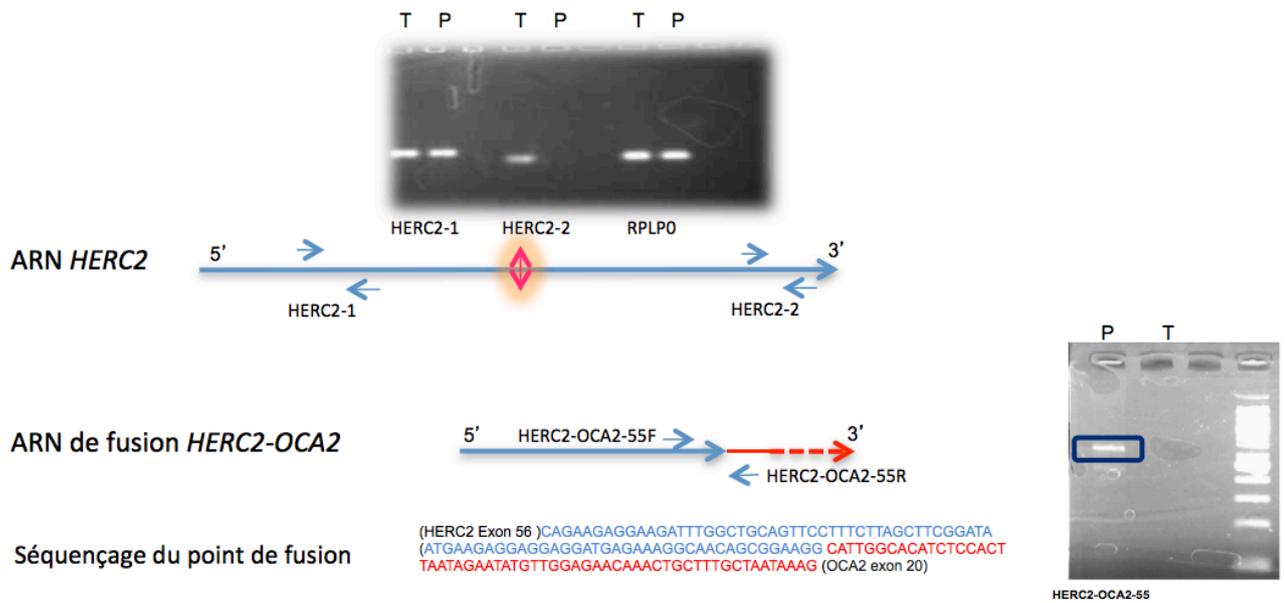


Figure 31. Etude du transcrit de *HERC2*. Amplification PCR de l'ADNc du patient et du témoin obtenu après RT-PCR. Absence de la partie 3' de l'ARN de *HERC2*. Amplification et séquençage d'un fragment fusionnant l'Exon 56 de *HERC2* (bleu) à l'Exon 20 d'*OCA2* (en rouge) avec les amorces *HERC2-OCA2-55F* et *HERC2-OCA2-55R*. Les flèches bleues indiquent la position des amorces utilisées sur le transcrit. (T) Témoin (P) Patient. *RPLP0* : gène de référence.

Nous avons ensuite étudié la protéine HERC2 et montré par Western blot et Immunofluorescence l'absence de la protéine chez le patient par rapport à des fibroblastes témoin.

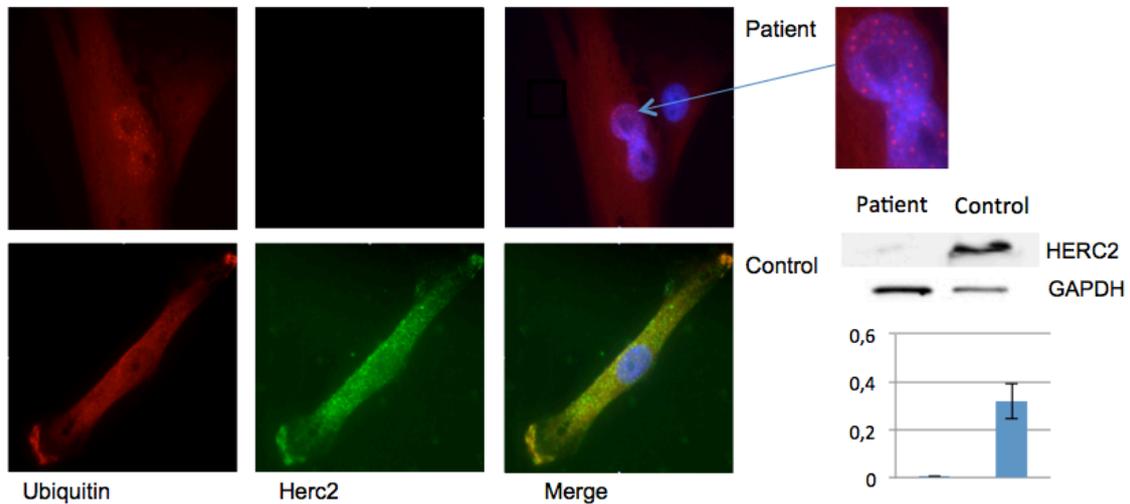


Figure 32. Absence d'HERC2 dans les fibroblastes du patient. HERC2 est recherchée par immunoblot avec un anticorps anti-HERC2. A gauche, marquage des cellules patients et contrôle avec un anticorps anti-ubiquitine en rouge et anti-HERC2 (vert). Des foci intranucléaires d'ubiquitine sont détectés dans les cellules du patient.

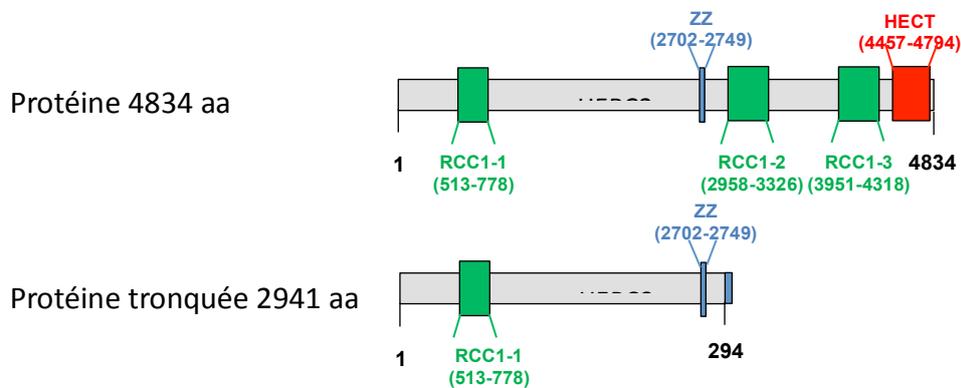


Figure 33. Représentation schématique de la protéine HERC2 et de ses domaines fonctionnels

HERC2 est une E3-ubiquitine ligase. Elle présente 3 domaines RCC1 pour et un domaine catalytique HECT (Homology to E6-AP in their carboxyl terminus catalytique) C-terminal impliqué dans les réactions d'ubiquitylation (Figure 33). Les substrats qui lui ont été associés incluent des facteurs de réparation de l'ADN : XPA et BRCA1 (Kang et al., 2011; Wu et al., 2010). HERC2 interagit avec E6AP (produit du gène *UBE3A*), une autre E3-ubiquitine-ligase, en l'activant par son domaine RLD2 (Kühnle et al., 2011).

L'étude du marquage de l'ubiquitine dans les cellules du patient montre l'existence d'agrégats intranucléaires d'ubiquitine traduisant une perturbation de l'ubiquitination et secondairement de la dégradation des protéines substrats (Figure 33).

Les substrats d'HERC2 impliqués dans la réparation de l'ADN, XPA et BRCA1, s'accumulent sous forme d'agrégats dans le cytoplasme des cellules comme cela est vu en Immunofluorescence. L'analyse en Western Blot de XPA montre une augmentation de la quantité de protéine.

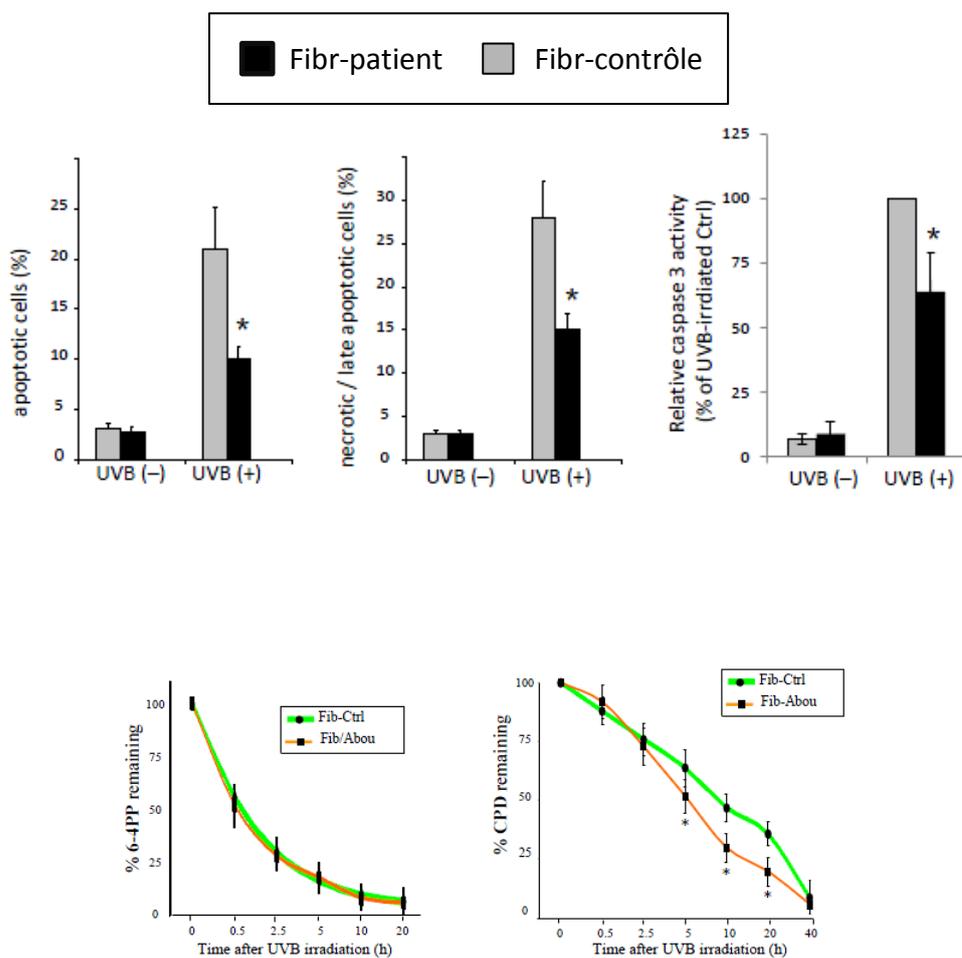
L'étude en Western-Blot et en immunofluorescence de la protéine E6AP codée par *UBE3A* montre une diminution significative de la quantité de protéines. De façon corolaire, nous avons observé une accumulation de l'un des substrats les mieux connus de E6AP, la protéine Arg3.1. Nous avons regardé les conséquences de l'accumulation d'Arg3.1 sur l'endocytose des fibroblastes en marquant la clathrine. Nous n'avons pas observé de différences significatives de marquage entre le patient et les contrôles (données non présentées).

Nous avons ensuite investigué si l'accumulation des substrats d'HERC2 impliqués dans la réparation de l'ADN comme XPA affectait la réponse des fibroblastes à l'irradiation aux UVB par la mesure de l'apoptose cellulaire et l'étude de la réparation de l'ADN (Figure 34). Ce travail a été fait en collaboration avec le Dr Rezvani (Unité INSERM 1035, Bordeaux).

Les fibroblastes de patients ont été exposés à une irradiation UVB et l'apoptose a été mesurée 16 heures après cette irradiation par cytométrie de flux. L'activation de la caspase, a également été mesurée après irradiation aux UV. L'analyse de la réparation de l'ADN a été réalisée en analysant la cinétique de réparation des photoproduits 6-4 (6-4PPs) et des dimères cyclobutaniques de pyrimidine (CPD), qui sont les lésions photo-induites les plus fréquentes retirées principalement par le système d'excision-réparation nucléotidique (NER) avec des cinétiques différentes (Moser et al., 2005).

Ces analyses ont montré que la sensibilité à l'apoptose des fibroblastes après irradiation aux UVB apparaît diminuée de même que l'activation de la caspase induite par les

UVB. L'étude de la réparation de l'ADN a montré une augmentation significative de la vitesse de réparation des CPD uniquement chez les patients par rapport aux contrôles. Il n'y a par contre pas de différences significatives concernant la réparation des 6,4PP.



**Figure 34.** Analyse de l'apoptose et de l'activité de la caspase-3 suivant l'irradiation UV des cellules et analyse de la cinétique de réparation des 6-4PPs et des CPD après irradiation UV. Une diminution de la sensibilité à l'apoptose est observée dans les cellules du patient avec une diminution relative de l'activité caspase et augmentation du taux de réparation des lésions CPD. Les résultats sont la moyenne de 4 expériences indépendantes.

#### IV.d Conclusion

Jusqu'à récemment le gène *HERC2* humain n'avait jamais été associé à une pathologie humaine. Le modèle murin *Rjs* présente un retard de croissance, des anomalies de coordination et une infertilité. Un de ces mutants exprime une forme tronquée de *HERC2* perdant son domaine C-terminal HECT. Ceci implique que la perte de l'activité E3 ligase de *HERC2* peut être responsable du phénotype murin.

La délétion homozygote identifiée chez notre patient prédit également la production d'une protéine tronquée perdant son domaine HECT C-terminal, conduisant à un phénotype sévère.

De façon intéressante, une mutation faux-sens a récemment été décrite chez des patients présentant un phénotype Angelman-like dans des communautés Amish et Memmonites (Harlalka et al., 2013; Puffenberger et al., 2012). Le phénotype observé chez ces patients était cependant moins sévère, probablement parce que la protéine *HERC2* mutée conserve en partie son activité.

L'ubiquitinylation est un mécanisme post-traductionnel fondamental qui permet la dégradation de protéines cibles et régule le turn-over protéique. *HERC2* stimule l'activité ubiquitine-ligase de E6AP via son domaine RLD2 (Kühnle et al., 2011). La diminution de

l'activation de l'activité E3 ligase d'*UBE3A* pourrait réduire l'ubiquitination et la dégradation des substrats d'E6AP. Ses substrats les mieux décrits, impliqués dans l'activité neuronale, sont *Arc/Arg3.1* et *Ephexin5* (Greer et al., 2010; Margolis et al., 2010). *Arc* est une protéine synaptique induisant l'internalisation des récepteurs AMPA, qui sont un sous-type de récepteurs glutamatergiques. L'accumulation d'*Arc/Arg3.1* dans les fibroblastes de patient pourrait conduire à une augmentation de l'endocytose des AMPAR perturbant la plasticité synaptique et la formation de la mémoire aversive. Le mécanisme physiopathologique peut être rapproché de celui du syndrome d'Angelman (AS) qui résulte d'une perte de fonction du gène *UBE3A* (Greer et al., 2010; Puffenberger et al., 2012). Cependant les anomalies secondaires à la perte de fonction d'*HERC2* pourraient impliquer non seulement *UBE3A* mais aussi d'autres substrats non identifiés. Ceci pourrait expliquer la sévérité du tableau clinique observé chez le patient.

L'accumulation des substrats d'*HERC2* impliqués dans la réparation de l'ADN tels que *XPA* et *BRCA1* pourrait affecter le système de réparation de l'ADN (Bekker-Jensen et al., 2010) (Kang et al., 2011)(Kang et al., 2010) (Wu et al., 2010). Nous observons *in vitro* une augmentation de la réparation de l'ADN et une diminution de la sensibilité à l'apoptose. La réparation de l'ADN est un processus étroitement contrôlé et sa perturbation pourrait

avoir des conséquences sur le développement embryonnaire et foetal et ainsi être impliqué, par un mécanisme demeurant indéterminé, dans le phénotype présenté par le patient (Brooks et al., 2008).

La perte de fonction de HERC2 est donc responsable d'un phénotype développemental sévère comme précédemment identifié dans le modèle murin *Rjs*. La sévérité du phénotype lié au déficit fonctionnel d'HERC2 peut être expliquée par le rôle central de cette protéine et la variété des substrats et des voies régulées par HERC2 : régulation de la réparation de l'ADN et du cycle cellulaire, régulation de l'activité de la protéine E6AP/UBE3A. D'autres E3 ligases ont déjà été impliquées dans des pathologies humaines comme la forme autosomique récessive de maladie de Parkinson (MIM 600116) (*PARK2*, MIM 602544), le syndrome de Johanson-Blizzard (MIM 243800) (*UBR1*, MIM 605981), le syndrome 3M (MIM 273750) (*CUL7*, MIM 609577) et le syndrome oculocérébrofacial de Kaufman (MIM 44450) (*UBE3B*, MIM 608047) (Huber et al., 2005; Kitada et al., 1998; Zenker et al., 2005). Cette observation met en évidence les effets délétères de la dérégulation de l'ubiquitinylation et son rôle clé au cours du développement embryonnaire et en particulier du développement du système nerveux central.

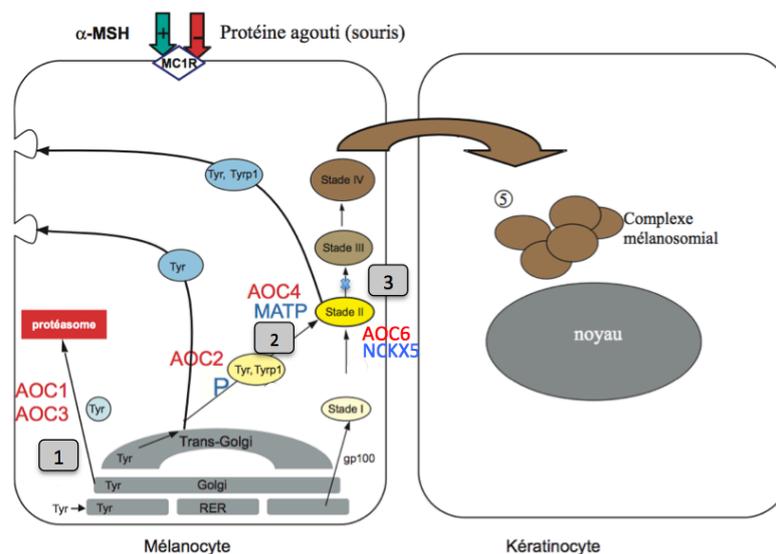
**IV.e Article: Severe developmental disorder phenotype associated with a homozygous HERC2 deletion.** Morice-Picard Fanny, Simon Delphine, Lasseaux Eulalie, François Stéphane, Levionnois Emeline, Cailley Dorothée, Rooryck Caroline, Rezvani Hamid Reza, Benard Giovanni, Lacombe Didier, Baumann Clarisse, Arveiler Benoit. (En préparation)

## **Conclusions et Perspectives**

## Conclusions et Perspectives

L'albinisme regroupe un ensemble hétérogène d'anomalies héréditaires associant une hypopigmentation variable de la peau, de l'iris et de la rétine, caractérisée par des défauts du nombre, de la structure et/ou de la fonction des mélanosomes. En outre, l'albinisme peut être associé à des défauts d'autres types cellulaires non pigmentés qui produisent des LRO, comme dans le HPS et le syndrome de Chediak-Higashi (CH).

Depuis l'identification de mutations du gène codant la Tyrosinase en 1986 dans l'albinisme oculocutané, d'autres gènes ont été impliqués dans cette condition : *OCA2*, *TYRP1* puis *SLC45A2* révélant ainsi sa grande hétérogénéité (Manga et al., 1997; Newton et al., 2001; Rinchik et al., 1993; Tomita et al., 1989b). Tous ces gènes codent pour des protéines transmembranaires du mélanosome dont les fonctions sont essentielles à la synthèse du pigment et à la maturation du mélanosome. L'étude des modèles murins a largement participé à la reconnaissance de gènes impliqués dans le développement et la régulation du système pigmentaire. A ce jour plus de 400 gènes sont impliqués dans la pigmentation et pourraient être impliqués dans des anomalies héréditaires de la pigmentation.



**Figure 35. Mélanogénèse et impact fonctionnel des gènes mutés dans les albinismes.**

Le taux relatif eumélanine-phéomélanine est contrôlé via le récepteur MC1R par l' $\alpha$ -MSH (melanin stimulating hormone), et une inhibition existe chez la souris par la protéine Agouti. (1) Les anomalies moléculaires dans Tyr pour l'AOC1 et dans Tyrp1 pour l'AOC3 sont responsables d'une maturation anormale de la tyrosinase et de défauts de formation du complexe Tyr-Tyrp1 et entraînent une dégradation de la tyrosinase dans le protéasome associé au RER. (2) Dans l'AOC2 et l'AOC4, les anomalies fonctionnelles des protéines P et MATP sont responsables d'un défaut de transport de la tyrosinase et des

protéines mélanosomales avec relargage aberrant de vésicules contenant la tyrosinase seule (AOC2) ou associée à la Tyrp1 (AOC4). (3) Dans l'AOC6, les anomalies de NCKX5 entraînent un défaut de maturation des mélanosomes.

Au cours de ce travail, j'ai étudié les aspects cliniques et moléculaires de l'AOC et décrit sa variabilité phénotypique et son hétérogénéité génétique. J'ai en particulier participé au développement des outils de diagnostic moléculaires de l'AOC et à la recherche de nouveaux gènes.

## 1- Evaluation de la variabilité du phénotype AOC

L'analyse de plus de 400 patients présentant un albinisme oculocutané nous a permis de mieux caractériser l'albinisme sur le plan clinique. L'étude du phénotype des patients montre la constance de l'atteinte ophtalmologique, qui est associée à une atteinte cutané-phanérienne hétérogène et d'intensité variable. Les corrélations génotype-phénotypes nous montrent que les AOC1 et AOC4 comportent une dépigmentation généralement sévère. L'AOC2 est hétérogène et peut comporter une dépigmentation modérée à sévère. L'AOC3 est très rare et les patients décrits présentent une atteinte oculocutanée modérée.

L'atteinte cutanée et phanérienne est variable selon les gènes impliqués mais également pour un même spectre mutationnel. L'AOC1 fait figure d'exception, les mutations stop ou mutations tronquantes aboutissant à une perte de fonction totale de la tyrosinase étant responsables d'un phénotype sévère, indépendamment du phototype du patient. En revanche, les variants faux-sens du gène *TYR* aboutissant à une diminution de la fonction de la protéine comme le variant thermosensible p.Arg402Gln associé en trans à une mutation délétère donnent généralement un phénotype variable, ce qui rend difficile son interprétation dans le diagnostic moléculaire (Oetting et al., 2009). Il a été montré que la pathogénicité de ce variant p.Arg402Gln était influencée par le phototype du patient (Chiang et al., 2009). Les patients de phototype clair présentent une dépigmentation et un tableau clinique globalement plus marqué que les patients de phototype foncé.

La variabilité phénotypique est également illustrée par les patients présentant des mutations dans *SLC24A5* responsable d'AOC6 que nous avons décrits au cours de ce travail et qui ont tous une atteinte ophtalmologique typique d'albinisme oculocutané et une atteinte cutané-phanérienne très variable allant d'un tableau évocateur d'AOC1 à une dépigmentation légère.

L'analyse du phénotype clinique des patients a été réalisée à partir des informations recueillies sur la fiche de renseignements cliniques complétée par le prescripteur permettant

la constitution d'une base de données clinicobiologiques. Les limites actuelles de cette base de données tiennent au fait que certaines informations sont manquantes, en particulier celle de l'examen ophtalmologique quand les sujets sont examinés à un âge très jeune. D'autre part les patients ne sont pas examinés par la même personne. Il existe un certain degré de subjectivité dans l'analyse de l'hypopigmentation cutanéophanéarienne. Ainsi il est prévu de faire évoluer cette étude avec plusieurs objectifs :

1/ Objectiver la description de la dépigmentation cutanéophanéarienne (ajout d'un nuancier de couleurs dans la fiche de renseignements cliniques).

2/ Obtenir un suivi de la cohorte et réaliser des études longitudinales grâce à l'obtention des données évolutives de chaque patient (en recontactant les prescripteurs) et la réévaluation des signes cliniques chez les patients (évolution de la pigmentation, apparition de lésions actiniques, type de lésions, évolution de l'examen ophtalmologique, apparition de nouveaux signes).

3/ Réévaluation des examens complémentaires ophtalmologiques nécessaires au diagnostic et au suivi des patients en collaboration avec l'équipe d'ophtalmologie du CHU de Bordeaux.

Un projet d'Hôpital de Jour des patients AOC, a été mis en place dans le cadre des Centres des Références Maladies Rares de la Peau et des Anomalies du Développement du CHU de Bordeaux. Le développement de ce parcours de soin a pour but d'améliorer la prise en charge et le suivi des patients et d'obtenir une évaluation standardisée des patients sur le plan dermatologique et ophtalmologique. L'examen ophtalmologique comportera de façon systématique une mesure de la réfraction, une analyse en tomographie optique de la rétine (OCT), des PEV si l'âge de l'enfant le permet. Un des autres objectifs est d'améliorer la connaissance et la description phénotypique des patients avec AOC permettant de mieux comprendre cette condition d'identifier des groupes de patients et d'orienter les analyses moléculaires.

Une meilleure connaissance et physiopathologique de l'affection est un prérequis au développement de thérapies ciblées. La L-DOPA constitue une approche intéressante dans la correction des anomalies visuelles. Son rôle majeur dans le développement rétinien a été mis en évidence par l'observation de modifications significatives de la fonction visuelle, de la modification des voies optiques et le nombre de photorécepteurs observés chez la souris albinos transgénique exprimant la tyrosine hydroxylase par rapport aux souris albinos non transgéniques (Lavado et al., 2006). Par ailleurs la Nitisone, un inhibiteur de la voie de dégradation de la tyrosine utilisé dans le traitement de la tyrosinémie de type 1, a été testée

chez des souris ayant une diminution de l'activité tyrosinase et a permis une augmentation des taux plasmatiques de tyrosine et une augmentation de la pigmentation avec une augmentation du contenu en mélanine dans les mélanocytes (Onojafe et al., 2011). Un essai clinique est en cours chez des patients OCA1-B dans l'équipe de Brian Brooks (Bethesda, USA).

## 2- Développement des outils de diagnostic moléculaire

L'étude moléculaire de notre grande série de patients montre qu'environ 15% des patients n'ont aucune mutation et que 6% des patients présentent une seule mutation dans l'un des 4 gènes OCA1-4. Ce défaut de détection de mutation chez les patients AOC nous a conduits à améliorer les méthodes diagnostiques. Nous avons montré l'intérêt de l'utilisation d'une puce à façon à la recherche de réarrangements avec l'identification de délétions dans *TYR*, *OCA2* et *SLC45A2*. Cet outil diagnostique fiable et robuste permet de borner finement les remaniements et de détecter des remaniements limités aux introns. Un réarrangement complexe du gène *OCA2* caractérisé en CGH-array par un profil anormal limité à première vue à des régions purement introniques a été caractérisé chez deux patients. Ce réarrangement complexe du gène *OCA2* met en évidence le fait que la CGH-array (locus spécifique ou pan-génomique) pourrait manquer des délétions, le fragment délété pouvant être réinséré ailleurs dans le gène ou dans le génome et donc être présent en double copies. L'identification au niveau du même locus de petites délétions séparées par un fragment ou plusieurs fragments présents en doubles copies doit donc faire penser à la possibilité d'un réarrangement complexe au niveau de ce locus.

Par ailleurs, la haute résolution de la puce sur les gènes d'intérêt et les 500 kb situés de part et d'autre de ces gènes a permis de mettre en évidence des délétions impliquant deux gènes et correspondant à un syndrome "gènes contigus". La délétion de *GPR143* et *SHROOM2* donne ainsi de façon inattendue un phénotype oculaire et cutané, *SHROOM2* codant une protéine liant l'actine et la myosine VIIa et jouant un rôle dans la régulation de la biogenèse des mélanosomes qui pourrait être responsable de la dépigmentation observée chez le patient.

D'autre part, la délétion homozygote incluant *OCA2* et *HERC2*, codant une E3 ligase explique vraisemblablement le tableau clinique d'un patient associant un albinisme oculocutané et une anomalie neurodéveloppementale liée à un défaut de l'ubiquitylation. *HERC2* n'avait jamais été impliqué dans des pathologies humaines jusqu'à récemment et le

tableau clinique présenté par ce patient montre l'importance des E3 ligases et des voies d'ubiquitylation dans le développement.

Chez les patients ne présentant qu'une mutation dans l'un des 4 gènes, une des hypothèses est que le deuxième événement moléculaire soit localisé dans les régions régulatrices ou introniques pouvant affecter la transcription (défaut d'expression, anomalie de l'épissage par exemple) et ne soit pas détecté par les techniques d'analyse classiques. Afin de rechercher de telles anomalies, le séquençage de l'intégralité des 4 gènes d'AOC (incluant les exons, les introns et 20-50 kb de séquences flanquantes) à la recherche d'un deuxième variant ou événement moléculaire a été entrepris chez 16 patients. L'interprétation des variants introniques et des variants situés dans les séquences régulatrices est difficile. Les variants situés dans les régions non codantes pourraient être responsables d'une altération de l'épissage, d'une modification de fixation d'éléments régulateurs altérant la transcription du gène (facteurs de transcription, miRNA). L'étude de l'ARNm constituerait une étape importante pour l'interprétation des conséquences de tels variants bien qu'elle reste difficile en routine du fait de l'expression restreinte des gènes d'AOC aux cellules pigmentaires. D'autre part le développement d'algorithmes pour l'interprétation des variants situés dans des régions conservées non codantes apparaît indispensable (Robinson et al., 2011).

L'autre hypothèse qui pourrait être émise serait celle d'un di- ou d'un oligogénisme, qui correspondrait à la présence d'au moins 2 mutations dans deux voire plusieurs gènes différents et qui n'a jamais été confirmée dans l'albinisme oculocutané. On pourrait supposer que ces variants hétérozygotes agissent comme des gènes modificateurs en association avec d'autres variants dans des gènes impliqués dans la mélanogenèse. Le grand nombre de gènes impliqués dans la pigmentation démontre la complexité du système pigmentaire et la probabilité de l'influence de gènes modificateurs. Ainsi le phénotype pigmentaire pourrait être influencé par l'accumulation de variants génétiques dans des gènes codants pour des protéines impliquées dans la pigmentation et jouant le rôle de gène "modificateur" (Chiang et al., 2009). Il pourrait être intéressant chez ces patients de séquencer l'ensemble des gènes impliqués dans la pigmentation afin de répertorier l'ensemble des variants présents dans ces gènes et d'en évaluer la conséquence. La modélisation des traits complexes est cependant difficile, et l'interprétation de telles données demeurerait complexe.

### 3- Hétérogénéité génétique

Le développement des nouvelles techniques et notamment le séquençage à haut débit de l'exome a considérablement accéléré le processus d'identification de nouveaux gènes. A ce jour près de 350 nouveaux gènes identifiés par séquençage d'exome ont été publiés, plus de 85% des mutations étant situées dans la séquence codante (Rabbani et al., 2012). Cette approche a notamment permis de mettre en évidence des mutations dans le gène *SLC24A5* chez un patient avec un AOC non syndromique. Nous avons confirmé l'implication de ce gène dans l'AOC et mis en évidence de nouvelles mutations chez 5 patients supplémentaires (Wei et al., 2013a; Morice-Picard et al., 2013). Nos données actuelles indiquent que des mutations de *SLC24A5* sont trouvées chez 1.25% des patients avec AOC.

Dans l'optique d'identifier un ou des nouveaux gènes d'AOC, un séquençage d'exome a ainsi été conduit chez 5 patients non apparentés au cours de mon travail. L'analyse des données a mis en évidence des variants dans des gènes candidats qui sont en cours d'analyse dans la population de patients AOC non mutés et dont l'implication est à confirmer. Nous n'avons pas identifié de variants dans des gènes communs aux 5 patients étudiés. Les principaux gènes candidats retenus mettent en avant des voies jusqu'alors non connues pour être impliquées dans des anomalies constitutionnelles de la pigmentation chez l'homme comme la voie du glutamate avec *TRPM1*, *GRIN2A* et *SLC7A13*. Des analyses fonctionnelles seront indispensables afin d'investiguer l'implication de ces gènes dans le développement de l'albinisme oculocutané. L'utilisation de shRNA dans des modèles cellulaires (mélanocytes en culture) ou par morpholino dans des modèles poissons zèbres pourraient permettre l'étude des conséquences de l'extinction de ces gènes sur la pigmentation, sur l'expression des protéines clés de la mélanogenèse ainsi que sur la structure et la maturation des mélanosomes.

L'hétérogénéité génétique de l'albinisme oculocutané et l'absence de familles avec plusieurs individus atteints augmente la difficulté de l'interprétation des données issues du séquençage d'exome. Malgré son efficacité, cette technique présente des limites et des « échecs d'exome » sont observés. La couverture des exons et la profondeur de lecture sur chaque exon n'est pas homogène. Les exons riches en GC ou comportant des éléments répétés sont plus difficiles à séquencer. Ainsi des variants situés dans des régions peu ou non couvertes ne seront pas détectés. Par ailleurs, le fait de disposer de plusieurs individus d'une même famille augmente la probabilité d'identifier des variations causales communes et ainsi d'identifier le gène responsable du phénotype (Robinson et al., 2011).

Nous avons prévu de poursuivre la recherche de nouveaux gènes avec l'analyse de l'exome de 6 nouveaux patients AOC. Parmi ces patients, deux sont apparentés. Il s'agit

d'une patiente issue de parents consanguins et d'un neveu de cette patiente. Dans cette famille, une des hypothèses est que la tante présente une mutation à l'état homozygote dans un gène et que le second patient présente cette mutation à l'état hétérozygote associée à une deuxième mutation hétérozygote dans le même gène. Deux autres patients sont issus de parents consanguins, ce qui pourrait nous aider dans le filtrage et l'interprétation des données.

Par ailleurs l'activité de diagnostic moléculaire se poursuit au Laboratoire de génétique moléculaire du CHU de Bordeaux. L'acquisition d'un séquenceur haut débit (PGM Ion Torrent) a conduit à faire évoluer la stratégie diagnostique avec la possibilité de séquencer de façon simultanée les gènes OCA1-4, le gène GPR143 mais également les gènes impliqués dans les albinismes syndromiques (HPS, CHS) et les gènes impliqués dans le syndrome de Waardenburg.

L'identification de nouveaux gènes a un intérêt pour le patient car elle permet d'apporter des réponses sur l'origine de l'affection et de préciser le conseil génétique. Le développement des nouvelles technologies comme le séquençage à haut débit apporte un grand nombre d'informations, permettant l'identification rapide de nouveaux gènes mais dont l'interprétation peut être complexe et difficile. Il semble important de bien redéfinir le phénotype d'AOC afin de mieux interpréter les données moléculaires et de ne pas en faire une interprétation erronée. Le développement de modèles fonctionnels cellulaires ou animaux constitue une étape indispensable à la confirmation et à la compréhension de l'implication de nouveaux gènes dans l'AOC. D'autre part, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et de la physiopathologie des anomalies pigmentaires et de façon spécifique de l'albinisme oculocutané est un préalable au développement des thérapeutiques ciblées comme la L-DOPA ou la Nitisone (Giménez et al., 2004; Lavado et al., 2006; Onojafe et al., 2011).

## Bibliographie

---

- Abbott, C., Jackson, I.J., Carritt, B., and Povey, S. (1991). The human homolog of the mouse brown gene maps to the short arm of chromosome 9 and extends the known region of homology with mouse chromosome 4. *Genomics* *11*, 471–473.
- Abdel-Malek, Z., Swope, V.B., Suzuki, I., Akcali, C., Harriger, M.D., Boyce, S.T., Urabe, K., and Hearing, V.J. (1995). Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 1789–1793.
- Abramov, I., Gordon, J., Hendrickson, A., Hainline, L., Dobson, V., and LaBossiere, E. (1982). The retina of the newborn human infant. *Science* *217*, 265–267.
- Ancans, J., Tobin, D.J., Hoogduijn, M.J., Smit, N.P., Wakamatsu, K., and Thody, A.J. (2001). Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp. Cell Res.* *268*, 26–35.
- Ando, H., Niki, Y., Ito, M., Akiyama, K., Matsui, M.S., Yarosh, D.B., and Ichihashi, M. (2012). Melanosomes Are Transferred from Melanocytes to Keratinocytes through the Processes of Packaging, Release, Uptake, and Dispersion. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 1222–1229.
- Anikster, Y., Huizing, M., White, J., Shevchenko, Y.O., Fitzpatrick, D.L., Touchman, J.W., Compton, J.G., Bale, S.J., Swank, R.T., Gahl, W.A., et al. (2001). Mutation of a new gene causes a unique form of Hermansky-Pudlak syndrome in a genetic isolate of central Puerto Rico. *Nat. Genet.* *28*, 376–380.
- Aquaron, R. (1990). Oculocutaneous albinism in Cameroon. A 15-year follow-up study. *Ophthalmic Paediatr. Genet.* *11*, 255–263.
- Aquaron, R. (2001). [Consideration of African albinos]. *Ann. Dermatol. Vénérologie* *128*, 1295–1298.
- Aspengren, S., Hedberg, D., Sköld, H.N., and Wallin, M. (2009). New insights into melanosome transport in vertebrate pigment cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *272*, 245–302.
- Asuquo, M.E., Ngim, O., Ebughe, G., and Basse, E.E. (2009). Skin cancers amongst four Nigerian albinos. *Int. J. Dermatol.* *48*, 636–638.
- Aubin-Houzelstein, G., Djian-Zaouche, J., Bernex, F., Gadin, S., Delmas, V., Larue, L., and Panthier, J.-J. (2008). Melanoblasts' proper location and timed differentiation depend on Notch/RBP-J signaling in postnatal hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* *128*, 2686–2695.

Audo, I., Kohl, S., Leroy, B.P., Munier, F.L., Guillonneau, X., Mohand-Said, S., Bujakowska, K., Nandrot, E.F., Lorenz, B., Preising, M., et al. (2009). TRPM1 Is Mutated in Patients with Autosomal-Recessive Complete Congenital Stationary Night Blindness. *Am. J. Hum. Genet.* *85*, 720–729.

Barton, D.E., Kwon, B.S., and Francke, U. (1988). Human tyrosinase gene, mapped to chromosome 11 (q14---q21), defines second region of homology with mouse chromosome 7. *Genomics* *3*, 17–24.

Basrur, V., Yang, F., Kushimoto, T., Higashimoto, Y., Yasumoto, K., Valencia, J., Muller, J., Vieira, W.D., Watabe, H., Shabanowitz, J., et al. (2003). Proteomic analysis of early melanosomes: identification of novel melanosomal proteins. *J. Proteome Res.* *2*, 69–79.

Becker, J., Semler, O., Gilissen, C., Li, Y., Bolz, H.J., Giunta, C., Bergmann, C., Rohrbach, M., Koerber, F., Zimmermann, K., et al. (2011). Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.* *88*, 362–371.

Bekker-Jensen, S., Rendtlew Danielsen, J., Fugger, K., Gromova, I., Nerstedt, A., Lukas, C., Bartek, J., Lukas, J., and Mailand, N. (2010). HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. *Nat. Cell Biol.* *12*, 80–86; sup pp 1–12.

Benathan, M., Virador, V., Furumura, M., Kobayashi, N., Panizzon, R.G., and Hearing, V.J. (1999). Co-regulation of melanin precursors and tyrosinase in human pigment cells: roles of cysteine and glutathione. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* *45*, 981–990.

Benko, S., Gordon, C.T., Mallet, D., Sreenivasan, R., Thauvin-Robinet, C., Brendehaug, A., Thomas, S., Bruland, O., David, M., Nicolino, M., et al. (2011). Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development. *J. Med. Genet.* *48*, 825–830.

Bentley, D.R. (2006). Whole-genome re-sequencing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *16*, 545–552.

Berson, J.F., Harper, D.C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M.S. (2001). Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell* *12*, 3451–3464.

Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T.J., Bille, K., Fisher, D.E., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1998). Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell Biol.* *142*, 827–835.

Bharti, K., Nguyen, M.-T.T., Skuntz, S., Bertuzzi, S., and Arnheiter, H. (2006). The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* *19*, 380–394.

Boissy, R.E., Zhao, H., Oetting, W.S., Austin, L.M., Wildenberg, S.C., Boissy, Y.L., Zhao, Y.,

Sturm, R.A., Hearing, V.J., King, R.A., et al. (1996). Mutation in and lack of expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) in melanocytes from an individual with brown oculocutaneous albinism: a new subtype of albinism classified as "OCA3." *Am. J. Hum. Genet.* *58*, 1145–1156.

Bondurand, N., Pingault, V., Goerich, D.E., Lemort, N., Sock, E., Le Caignec, C., Wegner, M., and Goossens, M. (2000). Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 1907–1917.

Bondurand, N., Fouquet, V., Baral, V., Lecerf, L., Loundon, N., Goossens, M., Duriez, B., Labrune, P., and Pingault, V. (2012). Alu-mediated deletion of SOX10 regulatory elements in Waardenburg syndrome type 4. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *20*, 990–994.

Branza-Nichita, N., Petrescu, A.J., Dwek, R.A., Wormald, M.R., Platt, F.M., and Petrescu, S.M. (1999). Tyrosinase folding and copper loading in vivo: a crucial role for calnexin and alpha-glucosidase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *261*, 720–725.

Brilliant, M., and Gardner, J. (2001). Melanosomal pH, pink locus protein and their roles in melanogenesis. *J. Invest. Dermatol.* *117*, 386–387.

Brooks, P.J., Cheng, T.-F., and Cooper, L. (2008). Do all of the neurologic diseases in patients with DNA repair gene mutations result from the accumulation of DNA damage? *DNA Repair* *7*, 834–848.

Byers, H.R., Yaar, M., Eller, M.S., Jalbert, N.L., and Gilchrist, B.A. (2000). Role of cytoplasmic dynein in melanosome transport in human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* *114*, 990–997.

Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P., and Bernstein, A. (1988). The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* *335*, 88–89.

Chiang, P.-W., Oiso, N., Gautam, R., Suzuki, T., Swank, R.T., and Spritz, R.A. (2003). The Hermansky-Pudlak syndrome 1 (HPS1) and HPS4 proteins are components of two complexes, BLOC-3 and BLOC-4, involved in the biogenesis of lysosome-related organelles. *J. Biol. Chem.* *278*, 20332–20337.

Chiang, P.-W., Spector, E., and McGregor, T.L. (2009). Evidence suggesting digenic inheritance of Waardenburg syndrome type II with ocular albinism. *Am. J. Med. Genet. A.* *149A*, 2739–2744.

Chintala, S., Li, W., Lamoreux, M.L., Ito, S., Wakamatsu, K., Sviderskaya, E.V., Bennett, D.C., Park, Y.-M., Gahl, W.A., Huizing, M., et al. (2005). Slc7a11 gene controls production of pheomelanin pigment and proliferation of cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10964–10969.

Chong, G.T., Farsiu, S., Freedman, S.F., Sarin, N., Koreishi, A.F., Izatt, J.A., and Toth, C.A.

(2009). Abnormal foveal morphology in ocular albinism imaged with spectral-domain optical coherence tomography. *Arch. Ophthalmol.* *127*, 37–44.

Collins, B., and Silver, J. (1990). Recent experiences in the management of visual impairment in albinism. *Ophthalmic Paediatr. Genet.* *11*, 225–228.

Costin, G.-E., Valencia, J.C., Vieira, W.D., Lamoreux, M.L., and Hearing, V.J. (2003). Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4. *J. Cell Sci.* *116*, 3203–3212.

Coupry, I., Taine, L., Goizet, C., Soriano, C., Mortemousque, B., Arveiler, B., and Lacombe, D. (2001). Leucodystrophy and oculocutaneous albinism in a child with an 11q14 deletion. *J. Med. Genet.* *38*, 35–38.

Cullinane, A.R., Curry, J.A., Carmona-Rivera, C., Summers, C.G., Ciccone, C., Cardillo, N.D., Dorward, H., Hess, R.A., White, J.G., Adams, D., et al. (2011). A BLOC-1 mutation screen reveals that PLDN is mutated in Hermansky-Pudlak Syndrome type 9. *Am. J. Hum. Genet.* *88*, 778–787.

Dell'Angelica, E.C., Shotelersuk, V., Aguilar, R.C., Gahl, W.A., and Bonifacino, J.S. (1999). Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol. Cell* *3*, 11–21.

Van Den Bossche, K., Naeyaert, J.-M., and Lambert, J. (2006). The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic Cph. Den.* *7*, 769–778.

Dessinioti, C., Stratigos, A.J., Rigopoulos, D., and Katsambas, A.D. (2009). A review of genetic disorders of hypopigmentation: lessons learned from the biology of melanocytes. *Exp. Dermatol.* *18*, 741–749.

Devi, S., Markandeya, Y., Maddodi, N., Dhingra, A., Vardi, N., Balijepalli, R.C., and Setaluri, V. (2013). Metabotropic glutamate receptor 6 signaling enhances TRPM1 calcium channel function and increases melanin content in human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* *26*, 348–356.

Le Douarin, N.M., and Dupin, E. (1993). Cell lineage analysis in neural crest ontogeny. *J. Neurobiol.* *24*, 146–161.

Durchfort, N., Verhoef, S., Vaughn, M.B., Shrestha, R., Adam, D., Kaplan, J., and Ward, D.M. (2012). The enlarged lysosomes in beige j cells result from decreased lysosome fission and not increased lysosome fusion. *Traffic Cph. Den.* *13*, 108–119.

Durham-Pierre, D., King, R.A., Naber, J.M., Laken, S., and Brilliant, M.H. (1996). Estimation of carrier frequency of a 2.7 kb deletion allele of the P gene associated with OCA2 in African-Americans. *Hum. Mutat.* *7*, 370–373.

Eller, M.S., Ostrom, K., and Gilchrist, B.A. (1996). DNA damage enhances melanogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 1087–1092.

Endele, S., Rosenberger, G., Geider, K., Popp, B., Tamer, C., Stefanova, I., Milh, M., Kortüm, F., Fritsch, A., Pientka, F.K., et al. (2010). Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nat. Genet.* *42*, 1021–1026.

Erickson, C.A., and Goins, T.L. (1995). Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. *Dev. Camb. Engl.* *121*, 915–924.

Fairbank, P.D., Lee, C., Ellis, A., Hildebrand, J.D., Gross, J.M., and Wallingford, J.B. (2006). Shroom2 (APXL) regulates melanosome biogenesis and localization in the retinal pigment epithelium. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 4109–4118.

Feng, G.H., Bailin, T., Oh, J., and Spritz, R.A. (1997). Mouse pale ear (ep) is homologous to human Hermansky-Pudlak syndrome and contains a rare “AT-AC” intron. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 793–797.

Forshew, T., Khaliq, S., Tee, L., Smith, U., Johnson, C.A., Mehdi, S.Q., and Maher, E.R. (2005). Identification of novel TYR and TYRP1 mutations in oculocutaneous albinism. *Clin. Genet.* *68*, 182–184.

Fukai, K., Oh, J., Karim, M.A., Moore, K.J., Kandil, H.H., Ito, H., Bürger, J., and Spritz, R.A. (1996). Homozygosity mapping of the gene for Chediak-Higashi syndrome to chromosome 1q42-q44 in a segment of conserved synteny that includes the mouse beige locus (bg). *Am. J. Hum. Genet.* *59*, 620–624.

Fukamachi, S., Shimada, A., and Shima, A. (2001). Mutations in the gene encoding B, a novel transporter protein, reduce melanin content in medaka. *Nat. Genet.* *28*, 381–385.

Gantz, I., Munzert, G., Tashiro, T., Schäffer, M., Wang, L., DelValle, J., and Yamada, T. (1991). Molecular cloning of the human histamine H<sub>2</sub> receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *178*, 1386–1392.

Gargiulo, A., Testa, F., Rossi, S., Di Iorio, V., Fecarotta, S., de Berardinis, T., Iovine, A., Magli, A., Signorini, S., Fazzi, E., et al. (2011). Molecular and clinical characterization of albinism in a large cohort of Italian patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *52*, 1281–1289.

Van Genderen, M.M., Bijveld, M.M.C., Claassen, Y.B., Florijn, R.J., Pearing, J.N., Meire, F.M., McCall, M.A., Riemsdag, F.C.C., Gregg, R.G., Bergen, A.A.B., et al. (2009). Mutations in TRPM1 Are a Common Cause of Complete Congenital Stationary Night Blindness. *Am. J. Hum. Genet.* *85*, 730–736.

Gershoni-Baruch, R., Rosenmann, A., Droetto, S., Holmes, S., Tripathi, R.K., and Spritz, R.A. (1994). Mutations of the tyrosinase gene in patients with oculocutaneous albinism from

various ethnic groups in Israel. *Am. J. Hum. Genet.* *54*, 586–594.

Gibbs, S., Murli, S., De Boer, G., Mulder, A., Mommaas, A.M., and Ponec, M. (2000). Melanosome capping of keratinocytes in pigmented reconstructed epidermis--effect of ultraviolet radiation and 3-isobutyl-1-methyl-xanthine on melanogenesis. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* *13*, 458–466.

Giebel, L.B., and Spritz, R.A. (1991). Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 8696–8699.

Giebel, L.B., Tripathi, R.K., Strunk, K.M., Hanifin, J.M., Jackson, C.E., King, R.A., and Spritz, R.A. (1991a). Tyrosinase gene mutations associated with type IB (“yellow”) oculocutaneous albinism. *Am. J. Hum. Genet.* *48*, 1159–1167.

Giebel, L.B., Strunk, K.M., and Spritz, R.A. (1991b). Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment. *Genomics* *9*, 435–445.

Gilchrest, B.A., Park, H.Y., Eller, M.S., and Yaar, M. (1996). Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem. Photobiol.* *63*, 1–10.

Giménez, E., Lavado, A., Giraldo, P., Cozar, P., Jeffery, G., and Montoliu, L. (2004). A transgenic mouse model with inducible Tyrosinase gene expression using the tetracycline (Tet-on) system allows regulated rescue of abnormal chiasmatic projections found in albinism. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* *17*, 363–370.

Ginger, R.S., Askew, S.E., Ogborne, R.M., Wilson, S., Ferdinando, D., Dadd, T., Smith, A.M., Kazi, S., Szerencsei, R.T., Winkfein, R.J., et al. (2008). SLC24A5 encodes a trans-Golgi network protein with potassium-dependent sodium-calcium exchange activity that regulates human epidermal melanogenesis. *J. Biol. Chem.* *283*, 5486–5495.

Giordano, F., Bonetti, C., Surace, E.M., Marigo, V., and Raposo, G. (2009). The ocular albinism type 1 (OA1) G-protein-coupled receptor functions with MART-1 at early stages of melanogenesis to control melanosome identity and composition. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 4530–4545.

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

Goud, B. (2002). How Rab proteins link motors to membranes. *Nat. Cell Biol.* *4*, E77–78.

Graf, J., Hodgson, R., and van Daal, A. (2005). Single nucleotide polymorphisms in the MATP gene are associated with normal human pigmentation variation. *Hum. Mutat.* *25*, 278–284.

Greer, P.L., Hanayama, R., Bloodgood, B.L., Mardinly, A.R., Lipton, D.M., Flavell, S.W., Kim, T.-

K., Griffith, E.C., Waldon, Z., Maehr, R., et al. (2010). The Angelman Syndrome-associated ubiquitin ligase Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating Arc. *Cell* *140*, 704–716.

Griscelli, C., Raux, M., Attal, C., Barthélémy, C., and Mozziconacci, P. (1970). [Syndrome associating anemia, hepatomegaly, dwarfism, late puberty and geophagia. Geophagia syndrome]. *Ann. Pédiatrie* *17*, 214–219.

Grønskov, K., Ek, J., and Brøndum-Nielsen, K. (2007a). Oculocutaneous albinism. *Orphanet J. Rare Dis.* *2*, 43.

Grønskov, K., Ek, J., and Brøndum-Nielsen, K. (2007b). Oculocutaneous albinism. *Orphanet J. Rare Dis.* *2*, 43.

Grønskov, K., Dooley, C.M., Østergaard, E., Kelsh, R.N., Hansen, L., Levesque, M.P., Vilhelmsen, K., Møllgård, K., Stemple, D.L., and Rosenberg, T. (2013a). Mutations in *c10orf11*, a melanocyte-differentiation gene, cause autosomal-recessive albinism. *Am. J. Hum. Genet.* *92*, 415–421.

Grønskov, K., Dooley, C.M., Østergaard, E., Kelsh, R.N., Hansen, L., Levesque, M.P., Vilhelmsen, K., Møllgård, K., Stemple, D.L., and Rosenberg, T. (2013b). Mutations in *c10orf11*, a melanocyte-differentiation gene, cause autosomal-recessive albinism. *Am. J. Hum. Genet.* *92*, 415–421.

Gross, L. (2008). A Molecular Link between Albinism and Visual Deficits. *PLoS Biol.* *6*.

Guillery, R.W. (1996). Why do albinos and other hypopigmented mutants lack normal binocular vision, and what else is abnormal in their central visual pathways? *Eye Lond. Engl.* *10 ( Pt 2)*, 217–221.

Guo, H., Carlson, J.A., and Slominski, A. (2012). Role of TRPM in melanocytes and melanoma. *Exp. Dermatol.* *21*, 650–654.

Halaban, R., Ghosh, S., and Baird, A. (1987). bFGF is the putative natural growth factor for human melanocytes. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* *23*, 47–52.

Halaban, R., Langdon, R., Birchall, N., Cuono, C., Baird, A., Scott, G., Moellmann, G., and McGuire, J. (1988). Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J. Cell Biol.* *107*, 1611–1619.

Hara, M., Yaar, M., Byers, H.R., Goukassian, D., Fine, R.E., Gonsalves, J., and Gilchrist, B.A. (2000). Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *J. Invest. Dermatol.* *114*, 438–443.

Harlalka, G.V., Baple, E.L., Cross, H., Kühnle, S., Cubillos-Rojas, M., Matentzoglou, K., Patton, M.A., Wagner, K., Coblentz, R., Ford, D.L., et al. (2013). Mutation of *HERC2* causes

developmental delay with Angelman-like features. *J. Med. Genet.* *50*, 65–73.

Hastings, P.J., Ira, G., and Lupski, J.R. (2009). A Microhomology-Mediated Break-Induced Replication Model for the Origin of Human Copy Number Variation. *PLoS Genet.* *5*.

Hauswirth, R., Jude, R., Haase, B., Bellone, R.R., Archer, S., Holl, H., Brooks, S.A., Tozaki, T., Penedo, M.C.T., Rieder, S., et al. (2013). Novel variants in the KIT and PAX3 genes in horses with white-spotted coat colour phenotypes. *Anim. Genet.*

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

Hearing, V.J., Jr (1987). Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed. *Methods Enzymol.* *142*, 154–165.

HERMANSKY, F., and PUDLAK, P. (1959). Albinism associated with hemorrhagic diathesis and unusual pigmented reticular cells in the bone marrow: report of two cases with histochemical studies. *Blood* *14*, 162–169.

Hertle, R.W., Anninger, W., Yang, D., Shatnawi, R., and Hill, V.M. (2004). Effects of extraocular muscle surgery on 15 patients with oculo-cutaneous albinism (OCA) and infantile nystagmus syndrome (INS). *Am. J. Ophthalmol.* *138*, 978–987.

Heyen, C.A., Tagliabracci, V.S., Zhai, L., and Roach, P.J. (2009). Characterization of mouse UDP-glucose pyrophosphatase, a Nudix hydrolase encoded by the Nudt14 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *390*, 1414–1418.

Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., and Barde, Y.A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* *344*, 339–341.

Hoogduijn, M.J., Hitchcock, I.S., Smit, N.P.M., Gillbro, J.M., Schallreuter, K.U., and Genever, P.G. (2006). Glutamate receptors on human melanocytes regulate the expression of Mitf. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* *19*, 58–67.

Hornyak, T.J., Hayes, D.J., Chiu, L.Y., and Ziff, E.B. (2001). Transcription factors in melanocyte development: distinct roles for Pax-3 and Mitf. *Mech. Dev.* *101*, 47–59.

Hou, L., and Pavan, W.J. (2008). Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? *Cell Res.* *18*, 1163–1176.

Huber, C., Dias-Santagata, D., Glaser, A., O’Sullivan, J., Brauner, R., Wu, K., Xu, X., Pearce, K., Wang, R., Uzielli, M.L.G., et al. (2005). Identification of mutations in CUL7 in 3-M syndrome. *Nat. Genet.* *37*, 1119–1124.

Huizing, M., Boissy, R.E., and Gahl, W.A. (2002). Hermansky–Pudlak Syndrome: Vesicle

Formation from Yeast to Man. *Pigment Cell Res.* *15*, 405–419.

Hunt, G., Kyne, S., Wakamatsu, K., Ito, S., and Thody, A.J. (1995). Nle4DPhe7 alpha-melanocyte-stimulating hormone increases the eumelanin:phaeomelanin ratio in cultured human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* *104*, 83–85.

Hutton, S.M., and Spritz, R.A. (2008a). A comprehensive genetic study of autosomal recessive ocular albinism in Caucasian patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *49*, 868–872.

Hutton, S.M., and Spritz, R.A. (2008b). Comprehensive analysis of oculocutaneous albinism among non-Hispanic caucasians shows that OCA1 is the most prevalent OCA type. *J. Invest. Dermatol.* *128*, 2442–2450.

Hyun, E., Ramachandran, R., Cenac, N., Houle, S., Rousset, P., Saxena, A., Liblau, R.S., Hollenberg, M.D., and Vergnolle, N. (2010). Insulin modulates protease-activated receptor 2 signaling: implications for the innate immune response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 2702–2709.

Imokawa, G., Miyagishi, M., and Yada, Y. (1995). Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* *105*, 32–37.

Imokawa, G., Kobayasi, T., and Miyagishi, M. (2000). Intracellular signaling mechanisms leading to synergistic effects of endothelin-1 and stem cell factor on proliferation of cultured human melanocytes. Cross-talk via trans-activation of the tyrosine kinase c-kit receptor. *J. Biol. Chem.* *275*, 33321–33328.

Inagaki, K., Suzuki, T., Shimizu, H., Ishii, N., Umezawa, Y., Tada, J., Kikuchi, N., Takata, M., Takamori, K., Kishibe, M., et al. (2004). Oculocutaneous albinism type 4 is one of the most common types of albinism in Japan. *Am. J. Hum. Genet.* *74*, 466–471.

D' Ischia, M., Wakamatsu, K., Napolitano, A., Briganti, S., Garcia-Borrón, J.-C., Kovacs, D., Meredith, P., Pezzella, A., Picardo, M., Sarna, T., et al. (2013). Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. *Pigment Cell Melanoma Res.*

Jannot, A.-S., Meziani, R., Bertrand, G., Gérard, B., Descamps, V., Archimbaud, A., Picard, C., Ollivaud, L., Basset-Seguin, N., Kerob, D., et al. (2005). Allele variations in the OCA2 gene (pink-eyed-dilution locus) are associated with genetic susceptibility to melanoma. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *13*, 913–920.

Jimbow, K., Park, J.S., Kato, F., Hirosaki, K., Toyofuku, K., Hua, C., and Yamashita, T. (2000). Assembly, target-signaling and intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stage of melanosome biogenesis. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* *13*, 222–229.

Jiménez-Cervantes, C., Martínez-Esparza, M., Solano, F., Lozano, J.A., and García-Borrón, J.C.

(1998). Molecular interactions within the melanogenic complex: formation of heterodimers of tyrosinase and TRP1 from B16 mouse melanoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *253*, 761–767.

Kang, T.-H., Lindsey-Boltz, L.A., Reardon, J.T., and Sancar, A. (2010). Circadian control of XPA and excision repair of cisplatin-DNA damage by cryptochrome and HERC2 ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4890–4895.

Kang, T.-H., Reardon, J.T., and Sancar, A. (2011). Regulation of nucleotide excision repair activity by transcriptional and post-transcriptional control of the XPA protein. *Nucleic Acids Res.* *39*, 3176–3187.

Kausar, T., Bhatti, M., Ali, M., Shaikh, R., and Ahmed, Z. (2013). OCA5, a novel locus for non-syndromic oculocutaneous albinism, maps to chromosome 4q24. *Clin. Genet.* *84*, 91–93.

King, R.A., Townsend, D., Oetting, W., Summers, C.G., Olds, D.P., White, J.G., and Spritz, R.A. (1991). Temperature-sensitive tyrosinase associated with peripheral pigmentation in oculocutaneous albinism. *J. Clin. Invest.* *87*, 1046–1053.

King, R.A., Pietsch, J., Fryer, J.P., Savage, S., Brott, M.J., Russell-Eggitt, I., Summers, C.G., and Oetting, W.S. (2003). Tyrosinase gene mutations in oculocutaneous albinism 1 (OCA1): definition of the phenotype. *Hum. Genet.* *113*, 502–513.

Kirkwood, B.J. (2009). Albinism and its implications with vision. *Insight Am. Soc. Ophthalmic Regist. Nurses* *34*, 13–16.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* *392*, 605–608.

Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C., and Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* *5*, 1084–1090.

Klebig, M.L., Wilkinson, J.E., Geisler, J.G., and Woychik, R.P. (1995). Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes, and yellow fur. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4728–4732.

Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., Tsukamoto, K., Brewington, T., Imokawa, G., Potterf, B., and Hearing, V.J. (1994). DHICA oxidase activity of TRP1 and interactions with other melanogenic enzymes. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* *7*, 227–234.

Koolen, D.A., Vissers, L.E.L.M., Pfundt, R., de Leeuw, N., Knight, S.J.L., Regan, R., Kooy, R.F., Reyniers, E., Romano, C., Fichera, M., et al. (2006). A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat. Genet.* *38*, 999–1001.

- Körner, A., and Pawelek, J. (1982). Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* 217, 1163–1165.
- Kromberg, J.G., Zwane, E., Castle, D., and Jenkins, T. (1987). Albinism in South African blacks. *Lancet* 2, 388–389.
- Kromberg, J.G., Castle, D.J., Zwane, E.M., Bothwell, J., Kidson, S., Bartel, P., Phillips, J.I., and Jenkins, T. (1990). Red or rufous albinism in southern Africa. *Ophthalmic Paediatr. Genet.* 11, 229–235.
- KUGELMAN, T.P., and VAN SCOTT, E.J. (1961). Tyrosinase activity in melanocytes of human albinos. *J. Invest. Dermatol.* 37, 73–76.
- Kühnle, S., Kogel, U., Glockzin, S., Marquardt, A., Ciechanover, A., Matentzoglou, K., and Scheffner, M. (2011). Physical and functional interaction of the HECT ubiquitin-protein ligases E6AP and HERC2. *J. Biol. Chem.* 286, 19410–19416.
- Kushimoto, T., Valencia, J.C., Costin, G.-E., Toyofuku, K., Watabe, H., Yasumoto, K.-I., Rouzaud, F., Vieira, W.D., and Hearing, V.J. (2003). The Seiji memorial lecture: the melanosome: an ideal model to study cellular differentiation. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* 16, 237–244.
- Kwon, B.S. (1993). Pigmentation genes: the tyrosinase gene family and the pmel 17 gene family. *J. Invest. Dermatol.* 100, 1345–1405.
- Lamason, R.L., Mohideen, M.-A.P.K., Mest, J.R., Wong, A.C., Norton, H.L., Aros, M.C., Jurynech, M.J., Mao, X., Humphreville, V.R., Humbert, J.E., et al. (2005). SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* 310, 1782–1786.
- Lamoreux, M.L., Zhou, B.K., Rosemblat, S., and Orlow, S.J. (1995). The pinkeyed-dilution protein and the eumelanin/pheomelanin switch: in support of a unifying hypothesis. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* 8, 263–270.
- Lander, E.S., and Botstein, D. (1987). Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 236, 1567–1570.
- Lavado, A., and Montoliu, L. (2006). New animal models to study the role of tyrosinase in normal retinal development. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 11, 743–752.
- Lavado, A., Jeffery, G., Tovar, V., de la Villa, P., and Montoliu, L. (2006). Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin. *J. Neurochem.* 96, 1201–1211.
- Lee, S.T., Nicholls, R.D., Schnur, R.E., Guida, L.C., Lu-Kuo, J., Spinner, N.B., Zackai, E.H., and Spritz, R.A. (1994). Diverse mutations of the P gene among African-Americans with type II (tyrosinase-positive) oculocutaneous albinism (OCA2). *Hum. Mol. Genet.* 3, 2047–2051.

- Leonhardt, R.M., Vigneron, N., Hee, J.S., Graham, M., and Cresswell, P. (2013). Critical residues in the PMEL/Pmel17 N-terminus direct the hierarchical assembly of melanosomal fibrils. *Mol. Biol. Cell* 24, 964–981.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237, 1154–1162.
- Lin, J.Y., and Fisher, D.E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445, 843–850.
- Lockwood, W.W., Chari, R., Chi, B., and Lam, W.L. (2006). Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 14, 139–148.
- Lookingbill, D.P., Lookingbill, G.L., and Leppard, B. (1995). Actinic damage and skin cancer in albinos in northern Tanzania: findings in 164 patients enrolled in an outreach skin care program. *J. Am. Acad. Dermatol.* 32, 653–658.
- Lopez, V.M., Decatur, C.L., Stamer, W.D., Lynch, R.M., and McKay, B.S. (2008). L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. *PLoS Biol.* 6, e236.
- Lund, P.M. (2005). Oculocutaneous albinism in southern Africa: population structure, health and genetic care. *Ann. Hum. Biol.* 32, 168–173.
- Luo, D., Chen, H., and Jimbow, K. (1994). Cotransfection of genes encoding human tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 prevents melanocyte death and enhances melanin pigmentation and gene expression of Lamp-1. *Exp. Cell Res.* 213, 231–241.
- Mabula, J.B., Chalya, P.L., Mchembe, M.D., Jaka, H., Giiti, G., Rambau, P., Masalu, N., Kamugisha, E., Robert, S., and Gilyoma, J.M. (2012). Skin cancers among Albinos at a University teaching hospital in Northwestern Tanzania: a retrospective review of 64 cases. *BMC Dermatol.* 12, 5.
- Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M., and Yancopoulos, G.D. (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247, 1446–1451.
- Mancini, A.J., Chan, L.S., and Paller, A.S. (1998). Partial albinism with immunodeficiency: Griscelli syndrome: report of a case and review of the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* 38, 295–300.
- Manga, P., Kromberg, J.G., Box, N.F., Sturm, R.A., Jenkins, T., and Ramsay, M. (1997). Rufous oculocutaneous albinism in southern African Blacks is caused by mutations in the TYRP1 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 1095–1101.
- Manga, P., Sato, K., Ye, L., Beermann, F., Lamoreux, M.L., and Orlow, S.J. (2000). Mutational analysis of the modulation of tyrosinase by tyrosinase-related proteins 1 and 2 in vitro.

Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc. *13*, 364–374.

Margolis, S.S., Salogiannis, J., Lipton, D.M., Mandel-Brehm, C., Wills, Z.P., Mardinly, A.R., Hu, L., Greer, P.L., Bikoff, J.B., Ho, H.-Y.H., et al. (2010). EphB-mediated degradation of the RhoA GEF Ephexin5 relieves a developmental brake on excitatory synapse formation. *Cell* *143*, 442–455.

Mártinez-García, M., and Montoliu, L. (2013). Albinism in Europe. *J. Dermatol.* *40*, 319–324.

Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., et al. (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. Genet.* *25*, 173–176.

Ménasché, G., Ho, C.H., Sanal, O., Feldmann, J., Tezcan, I., Ersoy, F., Houdusse, A., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2003). Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1). *J. Clin. Invest.* *112*, 450–456.

Merrill, K.S., Lavoie, J.D., King, R.A., and Summers, C.G. (2004). Positive angle kappa in albinism. *J. AAPOS Off. Publ. Am. Assoc. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus Am. Assoc. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus* *8*, 237–239.

Meyer, C.H., Lapolice, D.J., and Freedman, S.F. (2002). Foveal hypoplasia in oculocutaneous albinism demonstrated by optical coherence tomography. *Am. J. Ophthalmol.* *133*, 409–410.

Montoliu, L., Grønskov, K., Wei, A.-H., Martínez-García, M., Fernández, A., Arveiler, B., Morice-Picard, F., Riazuddin, S., Suzuki, T., Ahmed, Z.M., et al. (2013). Increasing the complexity: new genes and new types of albinism. *Pigment Cell Melanoma Res.*

Moser, J., Volker, M., Kool, H., Alekseev, S., Vrieling, H., Yasui, A., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H.F. (2005). The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions. *DNA Repair* *4*, 571–582.

Murase, D., Hachiya, A., Takano, K., Hicks, R., Visscher, M.O., Kitahara, T., Hase, T., Takema, Y., and Yoshimori, T. (2013). Autophagy has a significant role in determining skin color by regulating melanosome degradation in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 2416–2424.

Nakamura, M., Sanuki, R., Yasuma, T.R., Onishi, A., Nishiguchi, K.M., Koike, C., Kadowaki, M., Kondo, M., Miyake, Y., and Furukawa, T. (2010). TRPM1 mutations are associated with the complete form of congenital stationary night blindness. *Mol. Vis.* *16*, 425–437.

Newton, J.M., Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Gardner, J.M., Davisson, M.T., King, R.A., and Brilliant, M.H. (2001). Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (*uw*) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *Am. J. Hum. Genet.* *69*, 981–988.

Ng, S.B., Bigham, A.W., Buckingham, K.J., Hannibal, M.C., McMillin, M.J., Gildersleeve, H.I., Beck, A.E., Tabor, H.K., Cooper, G.M., Mefford, H.C., et al. (2010). Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat. Genet.* *42*, 790–793.

Nguyen, T., Novak, E.K., Kermani, M., Fluhr, J., Peters, L.L., Swank, R.T., and Wei, M.L. (2002). Melanosome morphologies in murine models of hermannsky-pudlak syndrome reflect blocks in organelle development. *J. Invest. Dermatol.* *119*, 1156–1164.

Oetting, W.S. (2000). The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): A model for understanding the molecular biology of melanin formation. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* *13*, 320–325.

Oetting, W.S., and King, R.A. (1999). Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Hum. Mutat.* *13*, 99–115.

Oetting, W.S., Fryer, J.P., Shriram, S., and King, R.A. (2003). Oculocutaneous albinism type 1: the last 100 years. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* *16*, 307–311.

Oetting, W.S., Pietsch, J., Brott, M.J., Savage, S., Fryer, J.P., Summers, C.G., and King, R.A. (2009). The R402Q tyrosinase variant does not cause autosomal recessive ocular albinism. *Am. J. Med. Genet. A.* *149A*, 466–469.

Okoro, A.N. (1975). Albinism in Nigeria. A clinical and social study. *Br. J. Dermatol.* *92*, 485–492.

Okulicz, J.F., Shah, R.S., Schwartz, R.A., and Janniger, C.K. (2003). Oculocutaneous albinism. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* *17*, 251–256.

Olivares, C., Jiménez-Cervantes, C., Lozano, J.A., Solano, F., and García-Borrón, J.C. (2001). The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochem. J.* *354*, 131–139.

Onojafe, I.F., Adams, D.R., Simeonov, D.R., Zhang, J., Chan, C.-C., Bernardini, I.M., Sergeev, Y.V., Dolinska, M.B., Alur, R.P., Brilliant, M.H., et al. (2011). Nitisinone improves eye and skin pigmentation defects in a mouse model of oculocutaneous albinism. *J. Clin. Invest.* *121*, 3914–3923.

Oostlander, A.E., Meijer, G.A., and Ylstra, B. (2004). Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin. Genet.* *66*, 488–495.

Opitz, S., Käsmann-Kellner, B., Kaufmann, M., Schwinger, E., and Zühlke, C. (2004). Detection of 53 novel DNA variations within the tyrosinase gene and accumulation of mutations in 17 patients with albinism. *Hum. Mutat.* *23*, 630–631.

Park, H.Y., Kosmadaki, M., Yaar, M., and Gilchrest, B.A. (2009). Cellular mechanisms

regulating human melanogenesis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 1493–1506.

Pasmant, E., Sabbagh, A., Masliah-Planchon, J., Haddad, V., Hamel, M.-J., Laurendeau, I., Soulier, J., Parfait, B., Wolkenstein, P., Bièche, I., et al. (2009). Detection and characterization of NF1 microdeletions by custom high resolution array CGH. *J. Mol. Diagn. JMD* 11, 524–529.

Pastural, E., Barrat, F.J., Dufourcq-Lagelouse, R., Certain, S., Sanal, O., Jabado, N., Seger, R., Griscelli, C., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (1997). Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat. Genet.* 16, 289–292.

Pettersson, E., Lundeberg, J., and Ahmadian, A. (2009). Generations of sequencing technologies. *Genomics* 93, 105–111.

Potterf, S.B., Furumura, M., Sviderskaya, E.V., Santis, C., Bennett, D.C., and Hearing, V.J. (1998). Normal tyrosine transport and abnormal tyrosinase routing in pink-eyed dilution melanocytes. *Exp. Cell Res.* 244, 319–326.

Potterf, S.B., Mollaaghababa, R., Hou, L., Southard-Smith, E.M., Hornyak, T.J., Arnheiter, H., and Pavan, W.J. (2001). Analysis of SOX10 function in neural crest-derived melanocyte development: SOX10-dependent transcriptional control of dopachrome tautomerase. *Dev. Biol.* 237, 245–257.

Prawitt, D., Enklaar, T., Klemm, G., Gärtner, B., Spangenberg, C., Winterpacht, A., Higgins, M., Pelletier, J., and Zabel, B. (2000). Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Hum. Mol. Genet.* 9, 203–216.

Puffenberger, E.G., Jinks, R.N., Wang, H., Xin, B., Fiorentini, C., Sherman, E.A., Degrazio, D., Shaw, C., Sougnez, C., Cibulskis, K., et al. (2012). A homozygous missense mutation in HERC2 associated with global developmental delay and autism spectrum disorder. *Hum. Mutat.* 33, 1639–1646.

Puri, N., Durbam-Pierre, D., Aquaron, R., Lund, P.M., King, R.A., and Brilliant, M.H. (1997). Type 2 oculocutaneous albinism (OCA2) in Zimbabwe and Cameroon: distribution of the 2.7-kb deletion allele of the P gene. *Hum. Genet.* 100, 651–656.

Pyott, S.M., Tran, T.T., Leistritz, D.F., Pepin, M.G., Mendelsohn, N.J., Temme, R.T., Fernandez, B.A., Elsayed, S.M., Elsobky, E., Verma, I., et al. (2013). WNT1 mutations in families affected by moderately severe and progressive recessive osteogenesis imperfecta. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 590–597.

Rabbani, B., Mahdieh, N., Hosomichi, K., Nakaoka, H., and Inoue, I. (2012). Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J. Hum. Genet.* 57, 621–632.

Rachel, R.A., Nagashima, K., O'Sullivan, T.N., Frost, L.S., Stefano, F.P., Marigo, V., and Boesze-Battaglia, K. (2012). Melanoregulin, product of the *dsu* locus, links the BLOC-pathway and OAI in organelle biogenesis. *PLoS One* 7, e42446.

Regales, L., Giraldo, P., García-Díaz, Á., Lavado, A., and Montoliu, L. (2003). Identification and Functional Validation of a 5' Upstream Regulatory Sequence in the Human Tyrosinase Gene Homologous to the Locus Control Region of the Mouse Tyrosinase Gene. *Pigment Cell Res.* 16, 685–692.

Riley, P.A. (1999). The great DOPA mystery: the source and significance of DOPA in phase I melanogenesis. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 45, 951–960.

Rinchik, E.M., Bultman, S.J., Horsthemke, B., Lee, S.T., Strunk, K.M., Spritz, R.A., Avidano, K.M., Jong, M.T., and Nicholls, R.D. (1993). A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature* 361, 72–76.

Robinson, P.N. (2010). Whole-exome sequencing for finding de novo mutations in sporadic mental retardation. *Genome Biol.* 11, 144.

Robinson, P.N., Krawitz, P., and Mundlos, S. (2011). Strategies for exome and genome sequence data analysis in disease-gene discovery projects. *Clin. Genet.* 80, 127–132.

Roméro-Graillet, C., Aberdam, E., Biagoli, N., Massabni, W., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1996). Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 28052–28056.

Roméro-Graillet, C., Aberdam, E., Clément, M., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1997). Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J. Clin. Invest.* 99, 635–642.

Rooryck, C., Roudaut, C., Robine, E., Müsebeck, J., and Arveiler, B. (2006). Oculocutaneous albinism with TYRP1 gene mutations in a Caucasian patient. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* 19, 239–242.

Rooryck, C., Morice-Picard, F., Elçioglu, N.H., Lacombe, D., Taieb, A., and Arveiler, B. (2008a). Molecular diagnosis of oculocutaneous albinism: new mutations in the OCA1-4 genes and practical aspects. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21, 583–587.

Rooryck, C., Morice-Picard, F., Elçioglu, N.H., Lacombe, D., Taieb, A., and Arveiler, B. (2008b). Molecular diagnosis of oculocutaneous albinism: new mutations in the OCA1-4 genes and practical aspects. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21, 583–587.

Rooryck, C., Morice-Picard, F., Lasseaux, E., Cailley, D., Dollfus, H., Defoort-Dhellemme, S., Duban-Bedu, B., de Ravel, T.J.L., Taieb, A., Lacombe, D., et al. (2011). High resolution mapping of OCA2 intragenic rearrangements and identification of a founder effect

associated with a deletion in Polish albino patients. *Hum. Genet.* *129*, 199–208.

Rosenthal, A., Goeddel, D.V., Nguyen, T., Lewis, M., Shih, A., Laramée, G.R., Nikolics, K., and Winslow, J.W. (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* *4*, 767–773.

Ruzicka, T. (1989). Leukotrienes in atopic eczema. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh.)* *144*, 48–49.

Sánchez-Martín, M., Rodríguez-García, A., Pérez-Losada, J., Sagrera, A., Read, A.P., and Sánchez-García, I. (2002). SLUG (SNAI2) deletions in patients with Waardenburg disease. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 3231–3236.

Sarangarajan, R., and Boissy, R.E. (2001). *Tyrrp1* and oculocutaneous albinism type 3. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* *14*, 437–444.

Sarthy, V.P., Pignataro, L., Pannicke, T., Weick, M., Reichenbach, A., Harada, T., Tanaka, K., and Marc, R. (2005). Glutamate transport by retinal Muller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice. *Glia* *49*, 184–196.

Sato, S., Roberts, K., Gambino, G., Cook, A., Kouzarides, T., and Goding, C.R. (1997). CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. *Oncogene* *14*, 3083–3092.

Sayed-yahosseini, S., Nini, L., Irvine, T.S., and Dagnino, L. (2012). Essential role of integrin-linked kinase in regulation of phagocytosis in keratinocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *26*, 4218–4229.

Schallreuter, K.U., Kothari, S., Chavan, B., and Spencer, J.D. (2008). Regulation of melanogenesis--controversies and new concepts. *Exp. Dermatol.* *17*, 395–404.

Schmitz, B., Käsmann-Kellner, B., Schäfer, T., Krick, C.M., Grön, G., Backens, M., and Reith, W. (2004). Monocular visual activation patterns in albinism as revealed by functional magnetic resonance imaging. *Hum. Brain Mapp.* *23*, 40–52.

Schnur, R.E., Sellinger, B.T., Holmes, S.A., Wick, P.A., Tatsumura, Y.O., and Spritz, R.A. (1996). Type I oculocutaneous albinism associated with a full-length deletion of the tyrosinase gene. *J. Invest. Dermatol.* *106*, 1137–1140.

Scott, G., Leopardi, S., Printup, S., Malhi, N., Seiberg, M., and Lapoint, R. (2004). Proteinase-activated receptor-2 stimulates prostaglandin production in keratinocytes: analysis of prostaglandin receptors on human melanocytes and effects of PGE2 and PGF2alpha on melanocyte dendricity. *J. Invest. Dermatol.* *122*, 1214–1224.

Scott, G., Jacobs, S., Leopardi, S., Anthony, F.A., Learn, D., Malaviya, R., and Pentland, A. (2005). Effects of PGF2alpha on human melanocytes and regulation of the FP receptor by

ultraviolet radiation. *Exp. Cell Res.* 304, 407–416.

Seiberg, M., Paine, C., Sharlow, E., Andrade-Gordon, P., Costanzo, M., Eisinger, M., and Shapiro, S.S. (2000). The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp. Cell Res.* 254, 25–32.

SEIJI, M., FITZPATRICK, T.B., and BIRBECK, M.S. (1961). The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 36, 243–252.

Sengupta, M., Chaki, M., Arti, N., and Ray, K. (2007). SLC45A2 variations in Indian oculocutaneous albinism patients. *Mol. Vis.* 13, 1406–1411.

Sharlow, E.R., Paine, C.S., Babiarz, L., Eisinger, M., Shapiro, S., and Seiberg, M. (2000). The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 17), 3093–3101.

Shaw-Smith, C., Pittman, A.M., Willatt, L., Martin, H., Rickman, L., Gribble, S., Curley, R., Cumming, S., Dunn, C., Kalaitzopoulos, D., et al. (2006). Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat. Genet.* 38, 1032–1037.

Simeonov, D.R., Wang, X., Wang, C., Sergeev, Y., Dolinska, M., Bower, M., Fischer, R., Winer, D., Dubrovsky, G., Balog, J.Z., et al. (2013). DNA variations in oculocutaneous albinism: an updated mutation list and current outstanding issues in molecular diagnostics. *Hum. Mutat.* 34, 827–835.

Sitaram, A., and Marks, M.S. (2012). Mechanisms of protein delivery to melanosomes in pigment cells. *Physiol. Bethesda Md* 27, 85–99.

Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S., and Wortsman, J. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 84, 1155–1228.

Spritz, R.A. (1998). Genetic defects in Chediak-Higashi syndrome and the beige mouse. *J. Clin. Immunol.* 18, 97–105.

Steel, K.P., Davidson, D.R., and Jackson, I.J. (1992). TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. *Dev. Camb. Engl.* 115, 1111–1119.

Stef, M., Simon, D., Mardirossian, B., Delrue, M.-A., Burgelin, I., Hubert, C., Marche, M., Bonnet, F., Gorry, P., Longy, M., et al. (2007). Spectrum of CREBBP gene dosage anomalies in Rubinstein-Taybi syndrome patients. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 15, 843–847.

Stefanato, C.M., Yaar, M., Bhawan, J., Phillips, T.J., Kosmadaki, M.G., Botchkarev, V., and Gilchrist, B.A. (2003). Modulations of nerve growth factor and Bcl-2 in ultraviolet-irradiated

human epidermis. *J. Cutan. Pathol.* *30*, 351–357.

Strom, M., Hume, A.N., Tarafder, A.K., Barkagianni, E., and Seabra, M.C. (2002). A family of Rab27-binding proteins. Melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport. *J. Biol. Chem.* *277*, 25423–25430.

Sturm, R.A., Teasdale, R.D., and Box, N.F. (2001). Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene* *277*, 49–62.

Sulem, P., Gudbjartsson, D.F., Stacey, S.N., Helgason, A., Rafnar, T., Magnusson, K.P., Manolescu, A., Karason, A., Palsson, A., Thorleifsson, G., et al. (2007). Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat. Genet.* *39*, 1443–1452.

Summers, C.G. (1996). Vision in albinism. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* *94*, 1095–1155.

Summers, C.G. (2009). Albinism: classification, clinical characteristics, and recent findings. *Optom. Vis. Sci. Off. Publ. Am. Acad. Optom.* *86*, 659–662.

Suzuki, T., and Tomita, Y. (2008). Recent advances in genetic analyses of oculocutaneous albinism types 2 and 4. *J. Dermatol. Sci.* *51*, 1–9.

Suzuki, I., Tada, A., Ollmann, M.M., Barsh, G.S., Im, S., Lamoreux, M.L., Hearing, V.J., Nordlund, J.J., and Abdel-Malek, Z.A. (1997). Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. *J. Invest. Dermatol.* *108*, 838–842.

Swank, R.T., Reddington, M., and Novak, E.K. (1996). Inherited prolonged bleeding time and platelet storage pool deficiency in the subtle gray (sut) mouse. *Lab. Anim. Sci.* *46*, 56–60.

Tada, A., Suzuki, I., Im, S., Davis, M.B., Cornelius, J., Babcock, G., Nordlund, J.J., and Abdel-Malek, Z.A. (1998). Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *9*, 575–584.

Theos, A.C., Tenza, D., Martina, J.A., Hurbain, I., Peden, A.A., Sviderskaya, E.V., Stewart, A., Robinson, M.S., Bennett, D.C., Cutler, D.F., et al. (2005). Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol. Biol. Cell* *16*, 5356–5372.

Thomas, A.J., and Erickson, C.A. (2009). FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 1849–1858.

Thomas, I., Kihiczak, G.G., Fox, M.D., Janniger, C.K., and Schwartz, R.A. (2004). Piebaldism: an update. *Int. J. Dermatol.* *43*, 716–719.

- Tomita, Y., Maeda, K., and Tagami, H. (1989a). Mechanisms for hyperpigmentation in postinflammatory pigmentation, urticaria pigmentosa and sunburn. *Dermatologica* 179 Suppl 1, 49–53.
- Tomita, Y., Takeda, A., Okinaga, S., Tagami, H., and Shibahara, S. (1989b). Human oculocutaneous albinism caused by single base insertion in the tyrosinase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 990–996.
- Toyofuku, K., Wada, I., Hirosaki, K., Park, J.S., Hori, Y., and Jimbow, K. (1999). Promotion of tyrosinase folding in COS 7 cells by calnexin. *J. Biochem. (Tokyo)* 125, 82–89.
- Tsao, A.S., Kantarjian, H., Cortes, J., O'Brien, S., and Talpaz, M. (2003). Imatinib mesylate causes hypopigmentation in the skin. *Cancer* 98, 2483–2487.
- Våge, D.I., Lu, D., Klungland, H., Lien, S., Adalsteinsson, S., and Cone, R.D. (1997). A non-epistatic interaction of agouti and extension in the fox, *Vulpes vulpes*. *Nat. Genet.* 15, 311–315.
- De Vijlder, H.C., de Vijlder, J.J.M., and Neumann, H.A.M. (2012). Oculocutaneous albinism and skin cancer risk. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV.*
- Vogel, P., Read, R.W., Vance, R.B., Platt, K.A., Troughton, K., and Rice, D.S. (2008). Ocular albinism and hypopigmentation defects in *Slc24a5*<sup>-/-</sup> mice. *Vet. Pathol.* 45, 264–279.
- Wangari-Talbot, J., and Chen, S. (2012). Genetics of melanoma. *Front. Genet.* 3, 330.
- Wei, A.-H., Zang, D.-J., Zhang, Z., Liu, X.-Z., He, X., Yang, L., Wang, Y., Zhou, Z.-Y., Zhang, M.-R., Dai, L.-L., et al. (2013a). Exome Sequencing Identifies SLC24A5 as a Candidate Gene for Nonsyndromic Oculocutaneous Albinism. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1834–1840.
- Wei, A.-H., Yang, X.-M., Lian, S., and Li, W. (2013b). Genetic analyses of Chinese patients with digenic oculocutaneous albinism. *Chin. Med. J. (Engl.)* 126, 226–230.
- Wei, A.-H., Zang, D.-J., Zhang, Z., Liu, X.-Z., He, X., Yang, L., Wang, Y., Zhou, Z.-Y., Zhang, M.-R., Dai, L.-L., et al. (2013c). Exome Sequencing Identifies SLC24A5 as a Candidate Gene for Non-syndromic Oculocutaneous Albinism. *J. Invest. Dermatol.*
- Wei, X., Walia, V., Lin, J.C., Teer, J.K., Prickett, T.D., Gartner, J., Davis, S., NISC Comparative Sequencing Program, Stemke-Hale, K., Davies, M.A., et al. (2011). Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat. Genet.* 43, 442–446.
- Widlund, H.R., and Fisher, D.E. (2003). Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 22, 3035–3041.
- Wilson, S., Ginger, R.S., Dadd, T., Gunn, D., Lim, F.-L., Sawicka, M., Sandel, M., Schnetkamp, P.P.M., and Green, M.R. (2013). NCKX5, a natural regulator of human skin colour variation,

regulates the expression of key pigment genes MC1R and alpha-MSH and alters cholesterol homeostasis in normal human melanocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* *961*, 95–107.

Winder, A., Kobayashi, T., Tsukamoto, K., Urabe, K., Aroca, P., Kameyama, K., and Hearing, V.J. (1994). The tyrosinase gene family--interactions of melanogenic proteins to regulate melanogenesis. *Cell. Mol. Biol. Res.* *40*, 613–626.

Wu, W., Sato, K., Koike, A., Nishikawa, H., Koizumi, H., Venkitaraman, A.R., and Ohta, T. (2010). HERC2 is an E3 ligase that targets BRCA1 for degradation. *Cancer Res.* *70*, 6384–6392.

Wu, X.S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J.R., Matesic, L.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Hammer, J.A., 3rd (2002). Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat. Cell Biol.* *4*, 271–278.

Xu, X., Thörnwall, M., Lundin, L.G., and Chhajlani, V. (1996). Val92Met variant of the melanocyte stimulating hormone receptor gene. *Nat. Genet.* *14*, 384.

Yaar, M., Grossman, K., Eller, M., and Gilchrist, B.A. (1991). Evidence for nerve growth factor-mediated paracrine effects in human epidermis. *J. Cell Biol.* *115*, 821–828.

Yada, Y., Higuchi, K., and Imokawa, G. (1991). Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* *266*, 18352–18357.

Yamada, M., Sakai, K., Hayashi, M., Hozumi, Y., Abe, Y., Kawaguchi, M., Ihn, H., and Suzuki, T. (2011). Oculocutaneous albinism type 3: a Japanese girl with novel mutations in TYRP1 gene. *J. Dermatol. Sci.* *64*, 217–222.

Yamamoto, H., Kudo, T., Masuko, N., Miura, H., Sato, S., Tanaka, M., Tanaka, S., Takeuchi, S., Shibahara, S., and Takeuchi, T. (1992). Phylogeny of regulatory regions of vertebrate tyrosinase genes. *Pigment Cell Res. Spons. Eur. Soc. Pigment Cell Res. Int. Pigment Cell Soc.* *5*, 284–294.

Yoshida, M., Takahashi, Y., and Inoue, S. (2000). Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H2 receptors in human normal melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* *114*, 334–342.

Yoshida-Amano, Y., Hachiya, A., Ohuchi, A., Kobinger, G.P., Kitahara, T., Takema, Y., and Fukuda, M. (2012). Essential Role of RAB27A in Determining Constitutive Human Skin Color. *PLoS ONE* *7*.

Yuasa, I., Umetsu, K., Harihara, S., Kido, A., Miyoshi, A., Saitou, N., Dashnyam, B., Jin, F., Lucotte, G., Chattopadhyay, P.K., et al. (2006). Distribution of the F374 allele of the SLC45A2 (MATP) gene and founder-haplotype analysis. *Ann. Hum. Genet.* *70*, 802–811.

Zemel, E., Loewenstein, A., Lei, B., Lazar, M., and Perlman, I. (1995). Ocular pigmentation

protects the rabbit retina from gentamicin-induced toxicity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 1875–1884.

Zenker, M., Mayerle, J., Lerch, M.M., Tagariello, A., Zerres, K., Durie, P.R., Beier, M., Hülkamp, G., Guzman, C., Rehder, H., et al. (2005). Deficiency of UBR1, a ubiquitin ligase of the N-end rule pathway, causes pancreatic dysfunction, malformations and mental retardation (Johanson-Blizzard syndrome). *Nat. Genet.* **37**, 1345–1350.

Zhang, F., Khajavi, M., Connolly, A.M., Towne, C.F., Batish, S.D., and Lupski, J.R. (2009). The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nat. Genet.* **41**, 849–853.

Zhang, K., Li, Z., Lei, J., Pang, T., Xu, B., Jiang, W., and Li, H. (2011). Oculocutaneous albinism type 3 (OCA3): analysis of two novel mutations in TYRP1 gene in two Chinese patients. *Cell Biochem. Biophys.* **61**, 523–529.

## **ABBREVIATIONS**

**6-4 PP** : 6-4 photoproduits

**ACTH** : Hormone adrénocorticotropique

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique

**AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique

**AOC** : Albinisme oculo-cutané

**AP-1** : Activator Protein-1 / Protéine activatrice-1

**ARN** : Acide ribonucléique

**AT** : Aminotyrosine

**ATP** : Adénosine triphosphate

**bFGF** : Facteur basal de croissance des fibroblastes

**BLOC** : Biogenesis of lysosome-related organelles complex

**BRCA1** : breast cancer 1, early onset

**CGH** : Comparative Genomic Hybridization

**CPD** : Dimère Cyclobutane de Pyrimidine

**DEM** : Dose érythémateuse minimale

**DHI** : Dihydroxyindole

**DHICA** : Acide dihydroxyindole carboxylique

**EDNRB** : Endothelin Receptor type B

**EGF** : Facteur de croissance épidermique

**ET-1** : Endothéline-1

**FISH** : Fluorescent in situ hybridization

**FoSTes** : Fork Stalling and Template Switching

**GPR113** : G protein-coupled receptor 113

**GRIN2A** : Glutamate Receptor Ionotropic N-methyl-D-aspartate 2A

**HERC2** : HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 2

**HPS1**: Hermansky-Pudlak Syndrome 1

**I-κB** : Inhibiteur de NF-κB

**L-DOPA** : L-3,4-dihydroxyphénylalanine

**LCR** : Low Copy Repeat

**LINE** : Line Intersperced Nuclear Elements

**MMBIR** : Microhomology mediated

**MMEJ** : Microhomology-Mediated End Joining

**MYO5A** : Myosin VA

**NAHR** : Non Allelic Homologous Recombination

**NER** : Réparation par excision-resynthèse

**NF-κB** : Facteur Nucléaire-κB

**NHEJ** : Non Homologous end Joining

**NMDA** : N-methyl-D-aspartate

**Mb** : Megabase

**OCA** : Oculocutaneous albinism

**OCA2** : Oculocutaneous albinism type 2

**OMIM** : Online Mendelian Inheritance in Man

**PAX3** : paired box 3

**pb** : paire de bases

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PCRq** : PCR quantitative

**PGE-2** : Prostaglandine E2

**POMC** : Protiomélanocortine

**QMF-PCR** : Quantitative Multiplex Fluorescente PCR

**RPLP0** : Ribosomal Protein Large P0

**SINE** : Short Intersperced Nuclear Elements

**SLC7A13** : Solute Carrier Family 7 (anionic amino acid transporter), member 13

**SLC24A5** : Solute Carrier Family 24 member 5

**SLC45A2** : Solute Carrier Family 45 member 2

**SPF** : Sun Protecting Factor

**SNP** : Single Nucleotide Polymorphism

**SOX10** : SRY (sex determining region Y)-box 10

**TRP-1** : Tyrosinase Related Protein 1

**TRP-2** : Tyrosinase Related Protein 2

**TRPM1** : Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1

**UBE3A** : Ubiquitin protein ligase E3A

**UVA** : Ultraviolet A

**UVB** : Ultraviolet B

**XPA** : Xeroderma Pigmentosum, complementation group A